

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción

“Estudio preliminar de la fermentación de suero lácteo empleando microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*”.

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIEROS DE ALIMENTOS

Presentada por:

Michelle Sandy Peralta Barba
Kevin Cristóbal Palma Barrionuevo

GUAYAQUIL – ECUADOR

2014

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme guiado con sabiduría e inteligencia durante toda mi carrera universitaria; a mis padres Cecibel y Giovanni, a mis hermanos Camila y Giovanni y al resto de mi familia, por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional que me han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora.

A una persona muy especial en mi vida Kevin Palma, con el que he compartido desde el inicio de mi carrera hasta ahora con la elaboración de nuestra tesis de grado, por su apoyo y amor incondicional en todo momento.

A mi directora de tesis, Dra. Olga Sánchez por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo, a la Dra. Ofelia Méndez por su ayuda brindada en la tesis de grado, al CIBE (Centro de Investigaciones Biomolecular del Ecuador) en especial al Ing. Jeffrey Vargas,

A mis amigos Gia, Karina y Alex por compartir conmigo toda mi carrera universitaria y a Chivería que permitieron el desarrollo de esta investigación.

Michelle Sandy Peralta Barba

AGRADECIMIENTO

A papito Dios y a mi fiel amigo y hermano Jesús por ser mi fuerza espiritual de cada día, sin la bendición de ellos éste logro jamás se hubiese llevado a cabo; a mis amados padres Cristóbal Palma y Marlene Barrionuevo quienes me han formado desde muy pequeño y han guiado mi vida, por su amor incondicional y su fiel apoyo, a mis hermanos José, Christian y Omar quienes me han ayudado y motivado a salir siempre adelante.

A mí amada enamorada Michelle Peralta quien día a día desde los inicios de la carrera ha sido mi fiel compañera de lucha para lograr pasar todas las materias de la malla curricular y que gracias a su incondicional apoyo hemos logrado culminar la tesis de grado.

A mis amigos Gia, Karina, Adán, Christian y Alex quienes de alguna manera u otra hemos compartido lindos momentos en la Universidad.

A mi directora de tesis Ph.D Olga Sánchez que gracias a sus conocimientos ha sido nuestra guía durante todo el desarrollo de este valioso proyecto, además gracias por confiar en Michelle y en mí desde el primer momento que nos conocimos y nos sentamos a realizar la tesis.

Kevin Cristóbal Palma Barrionuevo

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de grado a Dios, a mis padres Cecibel y Giovanni, a mi abuelita Laura y a mi enamorado Kevin. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes siempre han estado conmigo en buenos y malos momentos enseñándome día a día como luchar y vencer los obstáculos que se presentaron y que se presentarán a lo largo de mi vida. Es por ellos que soy lo que soy ahora, los amo mucho. A mi abuelita Laura por ser como una segunda madre para mí, cuidándome y dándome todo su amor. A kevincito quien ha sido mi amigo, compañero de curso y es mi enamorado le dedico este logro y felicidad mía.

Michelle Sandy Peralta Barba

DEDICATORIA

A Dios y a Jesús por permitir y bendecir esta tesis de grado, a mí amada familia, mis padres Marlene Barrionuevo y Cristóbal Palma a mis hermanos José, Christian y Omar quienes siempre unidos y en familia hemos salido adelante, a mi bella enamorada Michelle Peralta quien ha sido la mujer que ha estado durante toda mi etapa universitaria y ha sido siempre mi compañera de estudios y que juntos hemos compartido y nos hemos apoyado en esos duros y felices momentos que conlleva la vida universitaria y la elaboración de la tesis de grado, te amo amor.

Kevin Cristóbal Palma Barrionuevo

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN



Dr. Kleber Barcia V., Ph.D.

DECANO DE LA FIMCP

PRESIDENTE



Dr. Olga Sánchez C., Ph.D.

DIRECTORA DEL TFG



M.Sc. Maria Fernanda Morales R.

VOCAL

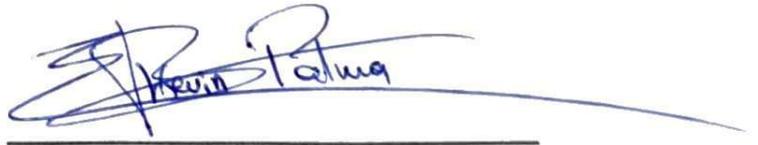
DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este Trabajo Final de Graduación, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Michelle Sandy Peralta Barba



Kevin Cristóbal Palma Barrionuevo

RESUMEN

Ecuador no dispone de una tecnología adecuada para usar eficientemente el lactosuero residual de la industria quesera. En la actualidad el Ecuador posee una producción anual de 4.6×10^8 litros de suero lácteo, que es utilizado como alimentación animal o es descargado en suelos, ríos y vertientes de agua, siendo altamente contaminantes, se genera cerca de 35 g/L de DBO y de 68 g/L de DQO (12), (52). Por lo tanto, resulta necesario proponer una alternativa de transformación de este subproducto, para que sea utilizado por la industria de alimentos del país, de manera que logre aprovechar el valor nutricional del mismo de forma eficiente. La fermentación del suero lácteo mediante el empleo de bacterias puede resultar una alternativa interesante para emplear el efluente de suero lácteo y proporcionar un valor nutricional extra en el futuro desarrollo de alimentos funcionales.

En el presente trabajo se realizó un estudio preliminar del comportamiento del **Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus** empleando suero lácteo como sustrato en la fermentación, realizándose corridas experimentales a nivel de laboratorio. Se efectuó la caracterización físico-química de suero lácteo procedente de una industria privada de la zona 5.

Se empleó un diseño experimental 2^3 y se realizaron pruebas estadísticas con 95% de confianza aplicando el programa Statgraphics Centurion XV 2014 al conjunto de resultados obtenidos de los experimentos planteados. El producto de la fermentación del lactosuero también se caracterizó físico-químicamente y se presenta el resultado favorable del empleo del microorganismo **Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus** para aumentar la cantidad de compuestos nitrogenados, correspondiéndose con un incremento en los conteos celulares para el rango de las condiciones estudiadas. Se recomienda en el futuro seguir profundizando en la investigación, para aplicar los resultados obtenidos en el desarrollo de alimentos funcionales que podrán fabricarse a partir de este efluente que le dará valor agregado, evitándose la contaminación ambiental.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	II
ÍNDICE GENERAL	IV
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES	5
1.1.Planteamiento del problema	5
1.2.Objetivos	7
1.2.1. Objetivos Generales	7
1.2.2. Objetivos Especificos	7
1.3.Metodología de Desarrollo	9

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO	10
2.1.Lactosuero: Definición, composición y características	10
2.2. Producción de suero lácteo en la Zona 5 del Ecuador	23
2.3. Contaminación ambiental por lactosuero	24
2.4. Procesos tecnológicos convencionales para extracción de la proteína del suero de leche	26
2.5. Procesos tecnológicos alternativos para concentrar la proteína del suero de leche	29

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1.Caracterización de la materia prima	47
3.2.Caracterización de Lactosuero fermentado	48
3.3.Diseño Experimental	49
3.4.Descripción del proceso	50

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
4.1.Resultados Estadísticos de pruebas realizadas a la materia prima	54

4.1.- .Resultados Estadísticos de pruebas realizadas al producto final	56
--	----

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
--------------------------------	----

5.1 Conclusiones	73
------------------	----

5.2-Recomendaciones	74
---------------------	----

APÉNDICES

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

g/L	Gramos/litros
pH	Potencial hidrógeno
DQO	Demanda química de oxígeno
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
g/mL	Gramos/mililitros
Kcal	Kilocalorías
g	Gramos
°C	Grados Celsius
MF	Microfiltración
UF	Ultrafiltración
NF	Nanofiltración
RO	Osmosis Inversa
atm	Atmósferas
mm	Milímetro
HCL	Ácido clorhídrico
N	Nitrógeno
rpm	Revoluciones por minutos
Kg	Kilogramos

AOAC	Association of Analytical Communities
mL	Mililitros
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitros
XV	15
h	Hora
T°	Temperatura

SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
μm	Micrómetro
nm	Nanómetro
μL	Micro-litros
α	Alfa
β	Beta
S	Desviación estándar
Gl	Grados de libertad

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2,1 Características bioquímicas de las bacterias ácido lácticas.....	31
Figura 2,2 Características fermentativas de las bacterias ácido lácticas.....	34
Figura 2,3 Fermentación láctica homofermentativa.....	37
Figura 4,1 Curva de acidificación del proceso de fermentación.....	57
Figura 4,2 Diagrama de Pareto estandarizada para la cantidad de compuestos nitrogenados	69
Figura 4,3 Efectos principales para la cantidad de compuestos nitrogenados	70

INDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Composición del lactosuero ácido (%).....	13
Tabla 2	Composición del lactosuero dulce (%).....	14
Tabla 3	Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido...	15
Tabla 4	Proteínas del suero de leche y sus propiedades.....	17
Tabla 5	Propiedades tecnológicas de las proteínas del lactosuero...	22
Tabla 6	Procesos tecnológicos aplicados para obtener proteína a partir del suero lácteo.....	27
Tabla 7	Microorganismos utilizados para la fermentación de lactosuero.....	31
Tabla 8	Conteos celulares iniciales con suero lácteo esterilizado...	50
Tabla 9	Diseño de experimentos.....	52
Tabla 10	Conteos celulares iniciales con suero lácteo esterilizado...	55
Tabla 11	Composición del suero lácteo (%) (Valores promedio).....	56
Tabla 12	Composición del lactosuero fermentado (%) (Valores promedio).....	57
Tabla 13	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado.....	58

Tabla 14	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado.....	58
Tabla 15	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado.....	59
Tabla 16	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado.....	59
Tabla 17	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado.....	60
Tabla 18	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado.....	60
Tabla 19	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado.....	61
Tabla 20	Conteos celulares realizados al lactosuero fermentado...	
	61	
Tabla 21	Análisis de varianza para la cantidad compuestos nitrogenados	68

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, la producción artesanal o industrial de queso representa una de las mayores fuentes de ingreso para los comerciantes de productos lácteos (30). El suero lácteo que se genera después del corte de la cuajada durante su proceso de elaboración, representa uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria, afectando de manera considerable al medio ambiente. En efecto, para producir un kilo de queso fresco, se requiere entre 6 y 7 litros de leche (4). Esto implica que se obtiene alrededor de 5 litros de suero (4), lo cual representa entre el 80 al 90 por ciento del volumen de leche que entra a los procesos de producción de queso (34); siendo así, que anualmente en el país se genera alrededor de $4,6 \times 10^8$ litros de suero lácteo, que es utilizado como alimentación animal o simplemente se agrede el medio ambiente porque es descargado en suelos, ríos y vertientes de agua (45). Además, al no usar el lactosuero eficientemente, es un desperdicio de nutrientes, debido a su elevada calidad proteica conformada por sus proteínas β -lactoglobulina, α -lactalbumina, inmunoglobulinas, glicomacropéptido, albúmina sérica bovina, lactoferrina y lactoperoxidasa, siendo estas proteínas fuente de aminoácidos esenciales y aminoácidos ramificados, aportando propiedades inmunoreguladoras, cumplen con funciones antioxidantes, antivirales, antibacterianas, antifúngica, promueven

El crecimiento de bacterias beneficiosas y regula la biodisponibilidad y absorción del hierro (15).

La composición del suero lácteo es 5 % lactosa (máximo), compuestos nitrogenados 0,8 % (mínimo), grasas 0,3 % (máximo), ácido láctico 0,16 % (máximo), cenizas 0,7 % (máximo) y pH 6,4- 6,8 (22).

Dentro del Ecuador una de las zonas de mayor generación de lactosuero, es la zona de planificación 5, la cual se encuentra conformada por las provincias de Bolívar, Guayas, Los Ríos y Santa Elena; debido a su alto índice de elaboración y comercialización de queso (30).

En la actualidad, las posibilidades tecnológicas para el aprovechamiento del suero líquido como materia prima son muy amplias. La más usual es la deshidratación, generalmente usando el sistema Spray-drying, para obtener suero en polvo o concentrado de proteínas de suero, en donde el suero debe ser previamente concentrado en equipos específicos de ultrafiltración; también se pueden generar aislados de proteínas que se obtienen por diafiltración o cromatografía de intercambio iónico (43), otras proteínas como la lactoalbúmina, lactoglobulina, lactoferrina y otras inmunoglobulinas. Otra tecnología que se suele aplicar es el proceso de separación por membrana, el

Cual consiste básicamente en hacer circular el suero líquido previamente tratado para evitar que las membranas se obstruyan por tubos de presión, donde se produce el fraccionamiento de los componentes que lo integran obteniendo de esta manera el concentrado de lactosa y proteína del suero de leche (47).

Se han realizado estudios, que muestran procesos de fermentación empleando microorganismos como hongos, bacterias y levaduras; los cuales degradan la lactosa presente en el suero de leche, obteniendo como producto de la fermentación ácido láctico y un incremento en la cantidad de compuestos nitrogenados, los cuales después de obtener extractos proteicos puedan servir como materia prima durante la elaboración de alimentos funcionales. Los microorganismos de mayor frecuencia utilizados para los procesos de fermentación empleando suero de leche como sustrato son las de bacterias ácido lácticas como **L. casei**, **L. helveticus**, **L. jensenii**, **L. acidophilus**, **L. bulgaricus**, **S. thermophilus** y levaduras como **Kluyveromyces marxianus var. marxianus** y **Kluyveromyces fragilis**, (1), (3), (5), (10), (11), (13), (12), (14), (17), (18), (19), (21), (26), (27), (29), (28), (32), (34), (36), (48), (51).

El propósito del presente trabajo es realizar un estudio preliminar sobre el comportamiento del microorganismo **Lactobacillus delbrueckii subsp**

.bulgaricus empleando suero lácteo proveniente de una industria privada de la Zona 5 del Ecuador, como sustrato en la fermentación, a escala de laboratorio.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del problema

Ecuador no dispone de una tecnología adecuada para usar eficientemente el suero lácteo residual de la industria quesera. Otro problema es la falta de higiene que existe en las industrias queseras del país y que se evidencia debido a la contaminación del suero lácteo con bacterias como coliformes fecales, coliformes totales, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*sp mohos y levaduras (52). La indisciplina tecnológica que causa la adición del suero en diversos productos lácteos a manera de adulteración, en especial en la leche pasteurizada o esterilizada, provoca que los consumidores adopten el paradigma negativo sobre el uso de este subproducto refiriéndose al mismo como un producto alimenticio no aceptado; por estas razones en la actualidad el suero lácteo que se genera en el país es utilizado como

alimentación animal o es descargado en suelos, ríos y vertientes de agua, ocasionando un impacto ambiental debido a que es altamente contaminante y tiene un alto contenido de DBO de 35 g/L y de DQO de 68 g/L (12). Por otro lado, se han realizado estudios que demuestran que el suero de lácteo, es un subproducto rico en aminoácidos esenciales y ramificados, ayuda a normalizar la flora intestinal por su efecto probiótico y aporta elementos depurativos y desintoxicantes, debido a la presencia de las proteínas β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, inmunoglobulinas, glicomacropéptido, albúmina sérica bovina, lactoferrina y lactoperoxidasa (15) (34), además contiene minerales como calcio, magnesio, manganeso, sodio, potasio, fósforo y vitaminas A, B1, B2, B3, B5, B6, C, E y D (17). Por lo tanto resulta necesario crear una alternativa de transformación de este subproducto, para que sea utilizado por la industria de alimentos del país, de manera que se logre aprovechar el valor nutricional del mismo de forma eficiente.

Hipótesis

La fermentación del suero lácteo mediante el empleo de Bacterias puede resultar una alternativa interesante para emplear el efluente de

suero lácteo y proporcionar un valor nutricional extra en el futuro desarrollo de alimentos funcionales.

Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Realizar un estudio preliminar del comportamiento del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* empleando suero lácteo como sustrato en la fermentación para en el futuro desarrollar alimentos funcionales.

1.2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar el suero lácteo procedente de una industria quesera privada perteneciente a la Zona 5.

Realizar corridas experimentales a nivel de laboratorio empleando suero lácteo como sustrato para la fermentación del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Incentivar el aprovechamiento productivo del efluente suero lácteo que contamina el medio ambiente, mediante la implementación de procesos fermentativos.

1.2. Metodología de Desarrollo

En el capítulo de materiales y métodos se expresan las determinaciones analíticas empleadas en el presente trabajo y el diseño experimental y tratamiento estadístico aplicados.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Lactosuero: Definición, composición y características

El lactosuero o también conocido como suero lácteo es un subproducto líquido que queda después de separar la cuajada, al elaborar el queso. También se lo define como el líquido obtenido después de la precipitación de la caseína.

El lactosuero está compuesto por un alto porcentaje de nutrientes, tales como lactosa, proteínas y péptidos presentes en la proteína del suero lácteo entre ellas la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, Inmunoglobulinas, glicomacropéptidos, lactoferrina, Albúmina de suero bovino y Lactoperoxidasa, siendo estas ricas en aminoácidos esenciales y aminoácidos de cadenas ramificadas, vitaminas y minerales

estos han sido uno de los principales factores que se han tomado en consideración para su aprovechamiento (34). Los minerales más destacados son potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio. Posee un alto nivel vitamínico como las del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico. Su principal componente nutritivo es la lactosa (4,5 % p/v); un azúcar relativamente insoluble, de bajo poder edulcorante, que no siempre puede ser absorbida por el sistema digestivo humano. De esta forma la hidrólisis de la lactosa es de vital importancia para el empleo del efluente en la industria alimentaria, ya que se produce glucosa y galactosa, una mezcla que presenta mayor solubilidad, mayor poder edulcorante y es de fácil absorción por la mucosa digestiva (40), compuestos nitrogenados (0,8% p/v), y lípidos (0,5%) (35).

Se puede caracterizar como un líquido fluido de color verdoso amarillento, turbio, de sabor fresco, ligeramente dulce, de característica ácido, su contenido de sólidos totales es del 4% al 6%. Su viscosidad es muy similar a la del agua cuyo valor es 1,14 centipoise y una densidad de 1,025 g/mL. El lactosuero posee un elevado valor energético que es casi similar a los de la harina de trigo con un valor

aproximado de 357 Kcal/100 gr (35), lo que hace que se convierta en un alimento con mucho potencial para la alimentación humana.

El tipo de leche, tipo de queso elaborado y el proceso de tecnología empleado son factores muy destacados que influyen en la composición y en el tipo de lactosuero (35). Existen dos tipos de lactosuero, ácido y dulce estos son diferenciados por el sistema de coagulación que se les da.

Lactosuero ácido

El lactosuero ácido es obtenido de la coagulación ácida o láctica de la caseína, se produce especialmente por acidificación química y/o bacteriana (30). Presenta un pH alrededor de 4,5; debido al punto isoeléctrico de la caseína en donde se anulan las cargas eléctricas que mantienen separadas a las moléculas de caseína por las fuerzas de repulsión que generan, e impiden la floculación. El ácido láctico secuestra el calcio del complejo de paracaseinato cálcico y produce lactato cálcico (4). En la tabla 1 se muestra la composición del lactosuero ácido.

TABLA 1:
COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO ÁCIDO

Componente	Lactosuero ácido	
	Min.	Máx.
Lactosa, %	...	4,3
Compuestos Nitrogenados, %	0,8	...
Grasa láctea, %	...	0,3
Ceniza, %	...	0,7
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	0,35	...
pH	5,5	4,8

Fuente: NTE INEN 2594, 2011

Lactosuero dulce

El lactosuero dulce es obtenido de la coagulación enzimática de la leche (30), mediante el uso de enzimas proteolíticas o cuajo, las cuales actúan sobre las proteínas de la leche (caseínas) y las cortan o rompen haciendo que estas se desestabilicen y precipiten, todo esto se da bajo condiciones específicas de temperatura (15- 50°C), pH ligeramente ácido (5,9-6,6) producto de la incorporación de cultivos lácteos y iones calcio (15), su contenido de lactosa es superior al del lactosuero ácido (30). En la tabla 2 se muestra la composición del lactosuero dulce.

TABLA 2:
COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO DULCE

Componente	Lactosuero dulce	
	Min.	Máx.
Lactosa, %	...	5,0
Compuestos nitrogenados, %	0,8	...
Grasa láctea, %	...	0,3
Ceniza, %	...	0,7
Acidez titulable,% (calculada como ácido láctico)	...	0,16
pH	6,8	6,4

Fuente: NTE INEN 2594, 2011

Parámetros de Inocuidad del Suero Lácteo

El suero de leche líquido de acuerdo con la norma INEN 2594 (22), debe cumplir con los siguientes requisitos microbiológicos establecidos en la tabla (3).

TABLA 3:

REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL SUERO DE LECHE LÍQUIDO

Requisito	n	m	M	c
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos UFC/g	5	30000	100000	1
Recuento de Escherichia coli UFC/g	5	<10	-	0
Staphylococcus aureus UFC/g	5	<100	100	1
Salmonella/25 g	5	ausencia	-	0
Detección de Listeria monocytogenes/25 g	5	ausencia	-	0

Dónde: n= Número de muestras a examinar.

m= índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M= índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

C= Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

Proteínas del lactosuero

Se las denomina proteínas solubles debido a que no se precipitan cuando se baja el pH de la leche a 4,6 (punto isoeléctrico de la caseína). Estas proteínas globulares pueden ser aisladas físicamente del suero de la leche, en el que fue obtenido por la separación del coágulo que se da por la adición del cuajo (25). Las proteínas presentes en el lactosuero poseen una elevada fuente de aminoácidos esenciales. Brindan ciertas características funcionales en soluciones acuosas, tales como solubilidad, emulsificación y congelación (40). Proporcionan una serie de efectos biológicos que van desde un efecto anticancerígeno hasta efectos en la función digestiva como apoyar a las bacterias intestinales beneficiosas (4). La proteína del suero lácteo es considerada una proteína de digestión rápida y de alta calidad. Resiste relativamente bien a la acidez del estómago y pasa rápidamente hasta el intestino, produciendo un aumento relativamente rápido de la concentración de aminoácidos disponibles en sangre. La calidad de la proteína del suero

de leche se debe a que contiene una mayor concentración de aminoácidos de cadena ramificada y de aminoácidos esenciales que otras fuentes de proteína. Además, la proteína del suero de leche contiene varios péptidos y fragmentos de proteína que pueden fomentar el bienestar y la salud en general (15). En la siguiente tabla se muestran las propiedades principales de cada una de las proteínas que componen en su conjunto a las proteínas del suero de leche:

TABLA 4:
PROTEÍNAS DEL SUERO DE LECHE Y SUS PROPIEDADES

Proteína de suero de leche	Porcentaje	Propiedades
β -lactoglobulina	50-55%	Proteína de mayor tamaño. Fuente rica en aminoácidos esenciales y aminoácidos de cadena ramificada, protege el músculo y ahorra glucógeno durante el ejercicio. Mejora la absorción de las vitaminas liposolubles.
α -lactoalbúmina	20-25%	Principal proteína encontrada en la leche humana. Fuente de aminoácidos esenciales y cadena ramificada. Rica en triptófano.
Inmunoglobulinas	10-15%	Principal proteína encontrada en el calostro. Mejoran la función inmune a cualquier edad.
Lactoferrina	1-2%	Es una glicoproteína que se encuentra en el calostro y en la leche. Es Antioxidante, antivírico, antibacteriano, antifúngico. Promueve el crecimiento de bacterias benéficas.

Lactoperoxidasa	0,5%	Es una glicoproteína que se encuentra de forma natural en el calostro, leche y otras secreciones, humanas o animales. Inhibe el crecimiento bacteriano.
Albúmina de suero bovino	5-10%	Fuente rica en aminoácidos esenciales. Capacidad de bloquear las grasas y quelar metales pesados.
glicomacropéptido	10-15%	Es un glicopéptido, se escinde de la K-caseína cuando se forma la cuajada. Fuente de aminoácidos de cadena ramificada, carece de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina), por lo tanto, buena fuente proteica para fenilcetonúricos (no pueden consumir fenilalanina).

Fuente: Franchi, 2010

Propiedades Funcionales de las Proteínas Séricas

Las proteínas y péptidos presentes en el suero lácteo presentan valores y actividades añadidas a la simple función nutricional de aportar aminoácidos.

β -lactoglobulina: Tiene actividad biológica antihipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, anticarcinogénica, inmunomoduladora, opioide, hipocolesterolémica y otras acciones de tipo metabólico (38).
 α -lactoalbúmina: El consumo de α -lactoalbúmina muestra acción antihipertensiva, antimicrobiana, anticarcinogénica, prebiótica,

inmunomoduladora y opioide. Esta proteína se ha relacionado con la disminución del estrés y la prevención de la alteración cognitiva (38).

Inmunoglobulinas. Actúan como anticuerpos protegiendo de infecciones y agentes patógenos. Son capaces de reducir la adhesión de microorganismos, el metabolismo bacteriano, eliminar bacterias así como neutralizar toxinas y virus (38).

Glicomacropéptido: El glicomacropéptido ha mostrado capacidad de neutralizar toxinas microbianas, inhibir la adhesión de bacterias cariogénicas y virus de la gripe, regula el sistema inmune, promueve el crecimiento de las bifidobacterias y regula la circulación sanguínea con acción antihipertensiva y antitrombótica. El glicomacropéptido reduce las secreciones gástricas y la movilidad estomacal y estimula la liberación de colecistoquinina (hormona relacionada con la saciedad). Presenta beneficios sobre el desarrollo cerebral y potencia el aprendizaje (38).

Albúmina sérica bovina. Tiene la capacidad de inhibir factores tumorales, unirse a grasas y movilizarlas en el organismo para realizar otras funciones como obtener energía o formar membranas. Posee capacidad antioxidante y protege a las grasas de la oxidación (38).

Lactoferrina: Se considera una molécula con acción defensiva, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y con propiedades sobre la regulación del sistema inmune.

Su mecanismo de acción parece estar relacionado con (38):

- Capacidad de bloquear el hierro del medio.
- Inhibir el crecimiento bacteriano (se une a la membrana bacteriana de los patógenos causando daños fatales) e inhibir la replicación de virus.
- Prevenir la adhesión de bacterias al epitelio del intestino.
- Mejorar la acción de algunos antibióticos.
- Estimular la proliferación de linfocitos y activación de células inmunitarias.
- Favorecer la producción de óxido nítrico y citoquinas.
- Acción como anticuerpo.

Lactoperoxidasa: Representa la enzima más abundante en la leche y genera compuestos capaces de inhibir el crecimiento de virus, hongos, protozoos y de bacterias.

Estos péptidos se han encontrado en proteínas hidrolizadas enzimáticamente y productos fermentados, aunque también pueden formarse durante la digestión gastrointestinal de las proteínas enteras. Las enzimas más importantes en la obtención de péptidos bioactivos son la pepsina, tripsina y quimotripsina (38).

Propiedades Tecnológicas de las Proteínas Séricas

En la tabla 5 se muestran ciertos alimentos en los que fueron utilizadas las proteínas del lactosuero y las funciones que desempeñan dichas proteínas (15).

TABLA 5:
PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LAS PROTEÍNAS DEL
LACTOSUERO EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS

Alimento	Funcionalidades de la Proteína de Suero.
Pan	Absorción de agua, adhesión- elasticidad.
Crema para Café	Emulsionante, estabilizante
Fórmula Infantil	Emulsificación, estabilidad térmica.
Pasta	Cohesión, absorción, absorción de agua.
Budín	Emulsificación, unión a agua, gelatinización, elasticidad.
Aderezo de ensaladas	Emulsificación, elasticidad.
Salchichas	Unión de agua, cohesión- adhesión, emulsificación, adsorción de grasa.
Crema Batida	Emulsificación, espumante, adsorción de agua.

Fuente: Franchi, 2010

Contenido medio de los principales aminoácidos en el suero lácteo

Los aminoácidos presentes en el suero lácteo son: Ácido aspártico (94.1 mg), Treonina (61.1 mg), Serina (38.8 mg), Ácido glutámico (141.4 mg), Prolina (46.7 mg), Glicina (13.8 mg), Alanina (42.1 mg), Valina (59.3 mg), Cisteina(22.8 mg), Metionina(19.4 mg), Isoleucina (57.3 mg), Leucina(79.8 mg), Tirosina(20.8 mg), Fenilalanina(21.3 mg), Lisina (76.1 mg), Histidina (18.7 mg) y Arginina(22.0 mg) valores por cada gramo de lactosuero(15).

2.2 Producción de suero lácteo en la zona 5 del Ecuador

La Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente (AGSO), manifiesta que el Ecuador posee una producción de 5'200.000 litros diarios de leche (31), con una producción anual de 1.898'000.000.

La producción de leche en el Ecuador se distribuye de la siguiente manera: 73% corresponde a la región sierra, el 19% a la región costa el 19% y el 8% a la amazonía (53). La provincia del Guayas posee una producción del 3.20% del total nacional (37), obteniendo una producción 166.400 litros diarios de leche.

Realizando un enfoque hacia la industria quesera en el país, se determina que existe un alto consumo de este producto en el mercado, pero la producción del mismo se da de mayor forma a nivel artesanal e informal, teniendo así que el 5 % de la leche nacional, es destinada a la producción de queso de tipo industrial, mientras que un 25% para queso de tipo artesanal (4); logrando un estimado de 569'400.000 litros anuales de leche destinados solo para la producción quesera.

Por cada kilo de queso fresco a producir se requiere entre 6 y 7 litros de leche. Esto implica que se obtiene alrededor de 5 litros de suero lácteo, estos valores varían dependiendo del tipo de queso a producir (4). A partir de estos datos se establece que el Ecuador posee una producción anual de 4.6×10^8 litros de suero.

2.1.1 Contaminación ambiental por lactosuero

El lactosuero es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria. La lactosa es el principal agente contaminante, ya que se encuentra en una concentración de aproximadamente 50 gramos por litro, su poder contaminante se establece mediante dos parámetros: la demanda biológica de oxígeno

(DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO). El primer parámetro mide el grado de contaminación del efluente cuantificando el oxígeno requerido por determinados microorganismos para poder oxidar el efluente en cuestión (lactosuero), es decir mientras mayor sea el oxígeno requerido por los microorganismos, mayor será el nivel de contaminación del residuo. Mientras que el segundo parámetro nos indica la cantidad de materia orgánica susceptible a ser oxidada por medios químicos, al igual que la DBO, a mayor oxígeno utilizado en la oxidación del residuo, mayor es su nivel de contaminación. Normalmente la DQO tiende a ser el doble del valor de la DBO (15). Se generan cerca de 35 g/L de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 g/L de demanda química de oxígeno (DQO) (52). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (19).

En muchas queserías el lactosuero es arrojado sin ningún tratamiento, causando un problema de contaminación grave. Cuando la descarga de lactosuero es en el agua provoca un elevado consumo de oxígeno, empobreciéndola y turbando la vida animal y vegetal, esto es debido a la oxidación de la materia orgánica presente en el lactosuero. Dicho

consumo se mide principalmente a través de la determinación de la demanda biológica de oxígeno en 5 días (9).

Según las estadísticas muestran que una gran cantidad de lactosuero es descartada como efluente, provocando grandes consecuencias y problemas ambientales, esto afecta física y químicamente al suelo en varios aspectos, como en su estructura y en la disminución del rendimiento de cultivos agrícolas (35). Más aún, no usar el lactosuero como alimento es un enorme desperdicio de nutrientes; el lactosuero contiene un poco más del 25% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y cerca del 95% de la lactosa. Por lo menos el 50% en peso de los nutrientes de la leche se quedan en el lactosuero (18).

2.2 Procesos tecnológicos convencionales para extracción de la proteína del suero de leche.

Debido a las propiedades nutricionales y el alto valor proteico que ofrece el suero de leche, se han desarrollado durante varios años procesos o métodos que permitan aprovechar este subproducto de la industria láctea. Como parte de este propósito se ha logrado concentrar la proteína del suero mediante tecnologías convencionales y alternativas.

En la tabla 6 se muestran los procesos tecnológicos para concentrar la proteína del suero de leche.

TABLA 6:
PROCESOS TECNOLÓGICOS APLICADOS PARA OBTENER PROTEÍNA A PARTIR DEL SUERO LÁCTEO.

PROCESOS TECNOLÓGICOS	
Convencionales	Alternativos
Tecnología de membranas: - Microfiltración (MF) - Ultrafiltración (UF) - Nanofiltración (NF)	Procesos de fermentación: - Hongos - Levaduras - Bacterias

Fuente: Camacho, 2010

Tecnología de membrana

El principio de funcionamiento consiste en la utilización de unas membranas semipermeables que actúan como filtro o como una pared de separación selectiva, en la cual solo la pueden atravesar aquellas sustancias que poseen un tamaño molecular menor al de las porosidades de la membrana, estas sustancias reciben el nombre de “permeado”, mientras que los sólidos o sustancias que no logran atravesar la membrana quedando retenidas en la misma, se las denominan “retenido”. Dentro de este proceso existen varios métodos que facilitan el paso de las sustancias a través de una membrana, como

la aplicación de alta presión, el mantenimiento de un gradiente de concentración en ambos lados de la membrana y la introducción de un potencial eléctrico (34).

Microfiltración (MF)

En este proceso se emplean membranas porosas de 0,1 a 5 μm , con un rango de precisión de operación 0,68 a 3,40 atm (43). La microfiltración se realiza con el objetivo de retener micropartículas de tamaño superior a 5 μm entre las que se encuentran sustancias como células somáticas, glóbulos grasos, bacterias, esporas y micelas de caseína (6).

Ultrafiltración (UF)

La ultrafiltración es la secuencia lógica de la microfiltración cuando se requiere retener fragmentos de materia aún más pequeños, utilizan membranas porosas de tamaño entre 5 a 100 nm (43), puesto que las partículas a retener no son partículas en suspensión sino compuestos de tipo macromolecular o coloidal como polisacáridos, proteína, taninos y virus (41). En la industria láctea es utilizada tanto para retener y purificar compuestos de medio y alto peso molecular como las proteínas

lácteas del suero de leche. Las presiones empleadas son de 0,9869-9,87 atm (43).

Nanofiltración (NF)

Considerada como un proceso único entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa, utiliza membranas con tamaños de poro de 1 a 5 nm y presiones entre 9,87-49,35 atm, especialmente diseñada para conseguir separaciones específicas de compuestos de bajo peso molecular como azúcares, minerales disueltos y sales. Aplicaciones típicas incluyen de-salinización de productos lácteos, recuperación de proteínas hidrolizadas, lactosa y concentración de azúcares (4).

2.2.1 Procesos tecnológicos alternativos para concentrar la proteína del suero de leche

En la industria láctea, se han desarrollado diferentes tecnologías o métodos que permiten aprovechar los diversos subproductos que se generan diariamente en la industria láctea, entre uno de los subproductos más representativos se encuentra el suero de leche

proveniente de la industria quesera, para lo cual se han diseñado procesos de fermentación empleando microorganismos como hongos, bacterias y levaduras; los cuales degradan la lactosa presente en el suero de leche, obteniendo como resultado final compuestos nitrogenados y ácido láctico, los cuales puedan servir como materia prima durante la elaboración de alimentos funcionales. Los microorganismos generalmente usados en la fermentación del lactosuero se encuentran en la tabla 7.

TABLA 7:
MICROORGANISMOS UTILIZADOS PARA LA FERMENTACIÓN DE
LACTOSUERO.

Bacterias Ácido Lácticas	Levaduras	Hongos
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus delbruckii ssp. bulgaricus.</i> - <i>Lactobacillus casei.</i> - <i>Lactobacillus jensenii.</i> - <i>Lactobacillus acidophilus.</i> - <i>Lactobacillus helveticus.</i> - <i>Streptococcus thermophilus.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Kluyveromyces fragilis.</i> - <i>Kluyveromyces marxianus.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Aspergillus carbonarius.</i> - <i>Aspergillus niger.</i>

Fuente: (McKay, 2007; Holt, 2000; Lyhs, 2012; Urribarrí, 2011; Cabeza, 2009; Sánchez, 2010; Shene, 2010; Escobar, 2012; Panesar, 2010; Mende, 2012; García, 2013).

Fermentación por bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas, han sido utilizadas durante muchos años en los procesos de fermentación industrial, debido a su gran atención al ser empleadas en la industria de alimentos, especialmente para la

obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los productos alimenticios y el bajo costo energético de su producción. Además, durante la última década se ha incrementado el número de estudios sobre el rol de que algunas cepas de bacterias ácido lácticas pudieran ser empleadas como cultivos probióticos (49).

Las bacterias ácido lácticas son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares, y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ (28). En términos generales estas bacterias tienen complejas necesidades de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones del porqué abundan en un medio tan rico nutricionalmente como la leche. Otra característica de este grupo de bacterias es su tolerancia al pH ácido (pH = 5, incluso a veces menores), pero conforme el medio se va acidificando, resultan inhibidas un mayor número de especies (27).

Clasificación de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas han sido clasificadas en base a sus características bioquímicas y fermentativas.

Se observa en la figura 2.1 las características bioquímicas de las bacterias ácido lácticas.

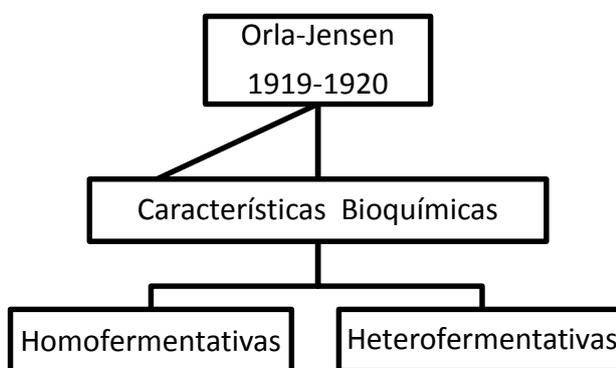


FIGURA 2.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

En la figura 2.2 se observa las características fermentativas de las bacterias ácido láctico.

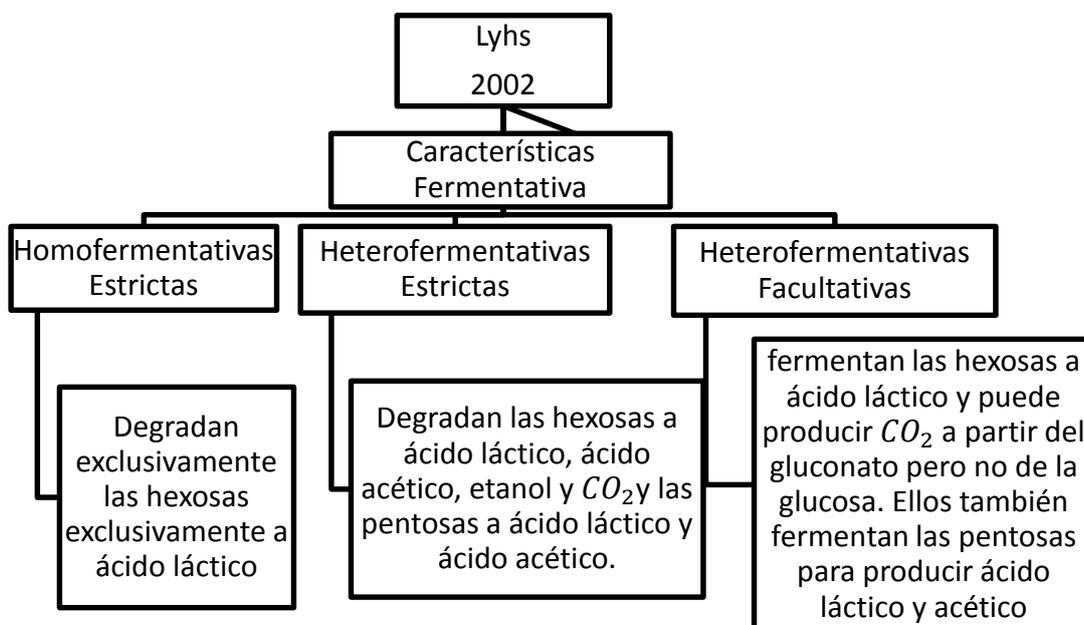


FIGURA 2.2. CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Bacterias ácido lácticas usadas en la industria láctea

La industria láctea, ha aprovechado durante muchos años los diferentes tipos de microorganismos entre los que se destacan las bacterias ácido lácticas, las cuales son usadas para la obtención de diversos

subproductos fermentados. En efecto hoy en día se puede encontrar en la mayoría de los supermercados productos como quesos, yogures y mezclas de leches y granos fermentados.

Las bacterias ácido lácticas dentro de la industria láctea, son aplicadas primordialmente como cultivos iniciadores para la elaboración de yogurt y diversos quesos madurados.

En la producción del yogurt se suele emplear una mezcla de cepas termófilas entre las que se destaca el **Streptococcus salivarius sbsp. thermophilus** y el **Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus**. La fermentación se lleva a cabo a 45°C y se considera que esta etapa termina una vez que el pH de los yogures alcanza un valor por debajo de 4,6. El tiempo de fermentación es aproximadamente entre 2 y 4 horas, pero no es un valor fijo sino que varía constantemente. Esto se debe a que el metabolismo de las bacterias lácticas depende de muchos factores como las características físico-químicas de la leche, la presencia de sustancias contaminantes que interfieran en la fermentación, la calidad del cultivo usado, entre otros (3).

Fermentación de lactosuero por Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus descripción, características y condiciones de trabajo

El Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (también conocido por su abreviatura como L. bulgaricus) es un bacilo Gram positivo, no esporulado, largo simple y en cadenas Gram positivo y por sus características macroscópicas en cuanto a su tamaño es 1-3 mm, forma circular, aspecto untuoso, color blanco crema, borde dentado y elevación plana (14); en base a sus características microscópicas presenta forma de bastoncillo relativamente alargados con tendencia a formar cintas; de acuerdo a su característica fermentativa se la describe como una bacteria homofermentativa, debido a que produce ácido láctico como mayor producto final de la fermentación de los azúcares (en este caso de la lactosa presente en el suero de leche), mediante vía Embden-Meyer-glucólisis-(3), (fermentación láctica homofermentativa, figura 2.3).

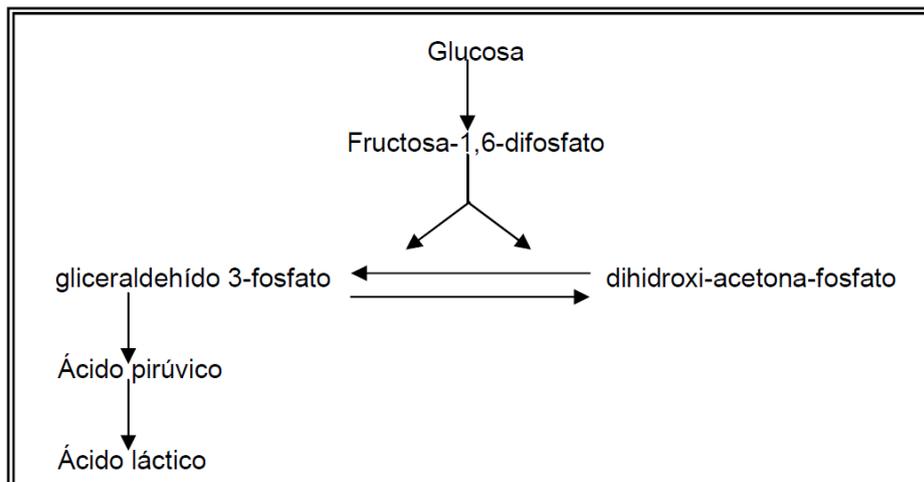


FIGURA 2.3. FERMENTACIÓN LÁCTICA HOMOFERMENTATIVA

Refiriéndose a las características de trabajo, esta bacteria ácido láctica se desarrolla en un intervalo de temperatura entre los 35 y 45°C, siendo la óptima entre 42 a 45°C y con pH que oscila entre 5,5 – 6,0 (32); su metabolismo se detiene a temperaturas por debajo de los 10°C (20).

El ***L. bulgaricus***, se desarrolla por una simbiosis en la cual el ***S. thermophilus*** es aquel microorganismo que inicia la fermentación láctica y que se desarrolla muy intensamente hasta un pH de 5,5. Debido a la acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles, que se generan durante el proceso de fermentación, crean las

condiciones perfectas para que el *L. bulgaricus* se desarrolle. Por lo general los *Lactobacillus* al desarrollar su actividad proteolítica, producen una estimulación al crecimiento y a la acción acidificante de los *Streptococcus* y durante su actividad lipolítica liberan ácidos grasos y producen además acetaldehído, el diacetilo y la acetoina. También se obtienen ácidos volátiles que originan el aroma característico del yogurt (1), (5).

Preparación y acondicionamiento del medio de cultivo

El suero lácteo utilizado como medio de cultivo debe ser acondicionado o adecuado al tipo de bacteria ácido láctica que se vaya a emplear, con el fin de garantizar el proceso de fermentación y se llegue al máximo rendimiento del microorganismo. El acondicionamiento se divide en tres fases: desproteización, suplementación y esterilización del suero.

La desproteización del suero, por lo general se la realiza por calentamiento elevando la temperatura a 115 °C o 90°C durante 10 y 20 minutos respectivamente (32), (51), otros autores para reducir el consumo de energía y garantizar el proceso de desproteización, primero ajustan el pH a un valor de 5.5 con HCL 10N (equivalente a su punto isoelectrico), logrando la precipitación de las proteínas en forma

de coágulos (46), (13). Posteriormente las proteínas precipitadas son removidas por centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos (32), (13), también se suelen remover mediante filtración (51).

Luego de la desproteinización, el suero de leche puede ser suplementado con extractos de levaduras, carbonato de calcio, sulfato de manganeso (10) (32) y peptona trípica de caseína (51), con el objetivo de enriquecer el medio de cultivo, de manera que el *Lactobacillus* tenga mayor fuentes de nutrientes que favorezcan su crecimiento y reproducción. Finalmente el suero es esterilizado en una autoclave a 115 o 121 °C durante 20 minutos (51), (32).

PROCESO DE FERMENTACIÓN

El proceso de fermentación comienza con la mezcla del suero esterilizado junto con el *Lactobacillus* en erlenmeyers. Posteriormente se incuba en un shaker (zaranda) para darle la oxigenación que requiere esta bacteria ácido láctica ya que el oxígeno sirve para que el microorganismo bajo condiciones aeróbicas se multiplique adecuadamente, teniendo los siguientes parámetros iniciales: pH 5.5, temperatura de 43°C con una velocidad de agitación de 125 rpm (45);

bajo estos parámetros se obtiene la máxima conversión de lactosa a ácido láctico.

Las bacterias ácido lácticas como el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* durante el proceso de fermentación precipitan las proteínas lactoséricas presentes en el suero que no reaccionan inicialmente con el cuajo durante la elaboración del queso. El proceso de fermentación permite recuperar un 7-10% del residuo de lactosuero, con un aumento en la cantidad de compuestos nitrogenados en la fase precipitada, esto se debe a la capacidad que tienen estos microorganismos de absorber nitrógeno que se encuentra en forma de sales en el suero. El nitrógeno es metabolizado por el *L. bulgaricus* propiciando una reacción de sustitución, donde los grupos hidroxílicos de las moléculas polilácticas son reemplazadas por grupos aminos, aumentando la cantidad de nitrógeno proteico en la fase sólida o precipitada (45).

Durante el proceso de fermentación se denota que el *L. bulgaricus* posee un crecimiento exponencial durante las primeras 75 horas de fermentación, en la mayoría de ellas sufren un descenso en el crecimiento, permaneciendo de forma constante durante un lapso de tiempo, para luego volver a subir. Respecto a su velocidad de crecimiento se denota que es menor cuando las concentraciones de

azúcares y porcentaje de inóculo son mayores, pero no obstante el rendimiento celular del *L. bulgaricus*, es mayor (14).

Productos obtenidos del proceso de fermentación

Debido a la característica homofermentativa que posee el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, como resultado final de la degradación de la lactosa, se va a obtener la producción de ácido láctico generando esto a su vez un incremento en el valor proteico en la parte sólida del fermentado.

Concentrado de proteína y sus usos industriales

El suero como alimento animal

Antes de la segunda guerra mundial, las mayores salidas de lactosuero desde granjas en Europa y los Estados Unidos eran para la alimentación porcina y ganado vacuno, debido a que los grandes productores de queso tenían sus propios criaderos de cerdos y ganado; en la actualidad aún se opta por seguir aprovechando el lactosuero de esta manera. Además estudios realizados en Winsconsin, Illinois y California (Estados Unidos), indican que los cerdos que pesan sobre 45 Kg, tienen

excelentes ganancias de peso cuando son alimentados solamente con suero y cebada o trigo, debido que el lactosuero actúa como un suplemento proteico adicional a su habitual alimentación.

Investigadores de las universidades de Utah, Vermont y USDA, Estados Unidos han comprobado que al alimentar las vacas con lactosuero en el periodo de lactancia, la producción de leche han sido beneficiosas y no se ha visto afectada. Las vacas que recibieron el lactosuero como su única fuente de líquido, obtuvieron un 29% de su masa seca en forma de suero. Por lo tanto, se concluyó que el lactosuero reduce significativamente el consumo de agua u otros nutrientes tanto para el ganado como para los cerdos, así se podrá reducir gastos en la alimentación de estos animales y se aumentará las utilidades al momento de comercializar sus derivados (15).

El suero, como base para formulaciones infantiles

Durante muchas décadas, ha crecido el interés de mejorar el rendimiento biológico y nutricional de la leche que es modificada para asemejarse a la humana, con la finalidad de ser usada en formulaciones infantiles, basadas principalmente en proteínas de suero de leche, debido a que las proteínas del lactosuero pertenecen al grupo de

proteínas de más alta calidad disponible para uso comercial. La calidad de la proteína del suero de leche se debe a que contiene una mayor concentración de amino ácidos de cadena ramificada y de amino ácidos esenciales que otras fuentes de proteína. Además, la proteína del suero de leche contiene varios péptidos y fragmentos de proteína que pueden fomentar el bienestar y la salud en general (15).

El suero y su uso en productos dietéticos

Uno de los principales componentes del lactosuero utilizado para la elaboración de productos dietéticos, son sus proteínas. Se ha demostrado que las proteínas séricas tienen propiedades beneficiosas como por ejemplo, en la presión arterial y en la regulación del consumo energético de las personas, mediante regulaciones hormonales en el tracto digestivo. Todos los productos dietéticos deben contener bajas cantidades de sodio, debido a que este promueve la retención en el cuerpo y como consecuencia de esto el aumento de peso en la persona. Estos productos deben ser bajos en lactosa, ya que existen muchos consumidores que son intolerantes a ella y será rechazado al momento de su consumo (15).

Las proteínas de suero como ingredientes esenciales en productos alimenticios

Las proteínas del lactosuero tienen propiedades físico-químicas muy importantes y beneficiosas en ciertos alimentos al momento de generar productos texturizados. Además del valor nutricional que poseen, una de las características más destacadas de estas proteínas es la capacidad emulsionante que brinda, es decir la capacidad para incorporar glóbulos de grasa en una solución (15).

El suero de leche y la elaboración de pan

En la elaboración de pan, se puede reemplazar el agua por suero de leche directamente, de esta manera se puede economizar los gastos de agua y se obtendría un producto con nutrientes adicionales. En muchas ocasiones se utiliza el suero en polvo como complemento a la harina para la elaboración de pan, obteniendo un pan más nutritivo es decir con mayor cantidad de proteínas y con propiedades organolépticas distintas al pan tradicional (15).

Productos cárnicos

Los concentrados de proteína de suero de leche se utilizan como sustitutos parciales de carne, aglutinantes, intensificadores de sabor, emulsionantes, ingredientes de salmuera y análogos de carne que contribuyen a la nutrición, al sabor y a las propiedades funcionales críticas. Son parcialmente utilizados para incrementar la producción de cocción, reducir la eliminación del producto, reducir los costos de formulación, mejorar la textura del producto o intensificar el sabor del producto. Los concentrados de proteína de suero de leche se aplican en carnes emulsionadas como es la mortadela y salchichas, por su humedad y aglutinamiento de grasa, emulsionante y propiedades de emulsión estabilizadoras. También son aplicados en el área de molido grueso como barra de carne, hamburguesas y embutidos, debido a las propiedades que presenta (15).

Bebidas a base de suero de leche entero

Para elaborar una bebida a base de lactosuero por medio de un método barato y eficiente se debe drenar el suero desde la tinaja de queso, luego pasteurizarlo, desodorizarlo si lo amerita, darle sabor adecuadamente y, por último, empacarlo para su consumo.

En 1898, Graeff patentó un proceso simple en donde el suero era calentado, desairado, y cargado con dióxido de carbono y formaldehído bajo presión. En 1913 Jolles describió la preparación de un refresco saludable a partir del suero de leche. El suero se decolora y desodora con carbón activado y se esteriliza mediante la adición de ácido. Sales, medicamentos, y/o dióxido de carbono puede ser añadido para producir una bebida final. El suero de leche ácido tiene un sabor que es compatible con los sabores cítricos, en particular con el sabor a naranja. El desarrollo de muchas bebidas con sabor a cítricos ha tenido una alta aceptabilidad en el consumidor (15).

Jarabe de lactosa de suero hidrolizada

El lactosuero ha sido usado en investigaciones para producir jarabes de lactosa hidrolizada. Desdoblado la molécula de lactosa en glucosa y galactosa, por medio de lactasa libre o inmovilizada, con esto se espera darle más importancia en cuanto a la aplicación con respecto a los alimentos y también darle valor agregado a la materia prima de fermentación en comparación al suero no hidrolizado. Por medio de la hidrólisis parcial de la lactosa, la cristalización en los alimentos podría ser menor y así se reduciría el problema. En cuanto a la elaboración de pan, se utiliza la lactosa hidrolizada y se obtiene un producto más deseable en comparación con la sacarosa. Este presenta un sabor más dulce que la lactosa, además el jarabe de lactosa hidrolizada es un endulzante bajo en calorías. Este jarabe podría ser consumido por los humanos y animales intolerantes a la lactosa sin ningún problema. Los microorganismos que no son capaces de fermentar lactosa podrían fermentar la lactosa hidrolizada, pudiendo generar una amplia variedad de productos (15).

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Caracterización de la materia prima

El suero lácteo utilizado como materia prima, para el desarrollo del presente trabajo, proviene de una industria láctea privada de la provincia del Guayas, ubicada en el Kilómetro 32,5 vía Daule (“Chivería”).

Para cumplir con los objetivos planteados el lactosuero se caracterizó físico-químicamente, previo al proceso de fermentación, para lo cual se emplearon los siguientes ensayos bromatológicos, siguiendo los métodos y especificaciones que establecen cada una de las normas relacionadas a continuación, según el parámetro a analizar.

- Determinación de Carbohidratos (por diferencia)

Carbohidratos se realizó por diferencia entre cenizas y humedad

- Determinación de Cenizas (AOAC 18th 940.26)

La determinación de cenizas es importante por varias razones, entre ellas proporciona el porcentaje de minerales presentes en el alimento

- Determinación de Humedad(AOAC 18th 950.46)
- Determinación de Nitrógeno Total (AOAC 18th 991.20)

El contenido total de proteína en los alimentos se determina mediante el método Kjeldhal. Este procedimiento determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (23). Para referirlo a proteína se multiplica por el factor correspondiente.

- Determinación de Grasas (Soxhlet) (NMX-AA005-SCFI-2000)
- Determinación de pH (Thermo Scientific Orion 5 star)

3.2. Caracterización del lactosuero fermentado

El producto fermentado se centrifugó y se procedieron a realizar las determinaciones de ceniza, humedad, compuestos nitrogenados, grasas y carbohidratos empleando los mismos métodos que se aplicaron anteriormente.**Conteos Inicial y Final del lactosuero**

Se realizaron conteos iniciales y finales. Se prepararon diluciones de 10^{-2} en tubos de ensayos y de ahí se tomó 1 μ L de dilución y se

colocó en la cámara Neubauer (improved bright-line Marienfeld modelo Tiefe Depth Profondeur 0.100mm - 0.0025 mm²) para su respectivo conteo. Los conteos iniciales se realizaron por triplicado a la materia prima suero lácteo esterilizado.

Se realizaron conteos celulares a las tres cantidades (0,6 g, 1,0 g y 1,5 g) del **Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus**. Se realizó la curva de acidificación del microorganismo graficándose el pH en función del tiempo.

3.3 . Diseño Experimental

Para las corridas experimentales se estableció un diseño 2³, tomando en cuenta dos cantidades del microorganismo **Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus** (0,6 g y 1,0 g), dos valores en cuanto a la agitación y aireación (80 rpm y 100 rpm) y dos temperaturas de fermentación (30 ° C y 37 ° C).

Es decir tres variables independientes (cantidad del microorganismo, rpm y temperatura) y dos niveles para cada uno y como variable dependiente el contenido de compuestos nitrogenados.

En la Tabla 8 se muestran las cantidades del microorganismo equivalentes a los siguientes conteos celulares efectuados por triplicado.

TABLA 8:
CONTEOS CELULARES INICIALES CON SUERO LÁCTEO
ESTERILIZADO

0,6 g	1,0 g
$7,1 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$	$7,3 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$
$7,2 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$	$7,4 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$
$7,0 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$	$7,3 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$

3.4. Descripción del Proceso

Proceso Fermentativo

Etapas de Pre- Inóculo

Se activó el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (en polvo) en erlenmeyers de 500 mL, conteniendo 250 mL de lactosuero esterilizado. Se inocularon 0,6 g y 1,0 g, respectivamente del microorganismo por triplicado. Se agitaron en un shaker (zaranda)

(New Brunswick scientific modelo Excella E24 incubator) por 24h a 80 y 100 rpm y a 30 y 37 ° C, respectivamente. El medio de cultivo fue agitado debido a que el microorganismo es facultativo y para tener un aumento de biomasa se le dio oxigenación. La fermentación se realizó bajo condiciones aerobias y bajo condiciones de temperatura, oxígeno y pH. Las vías metabólicas que sigue esta bacteria ácido láctica son: glucólisis, proteólisis y lipólisis.

Etapas de Fermentación

Inóculo: Se tomaron 50 mL del pre-inóculo y se añadieron a 150 mL de lactosuero esterilizado en erlenmeyers de 500 mL bajo condiciones asépticas.

Respondiendo al diseño experimental 2³ se montaron las siguientes corridas:

TABLA 9:
DISEÑO DE EXPERIMENTOS

	Temperatura (° C)	Agitación (rpm)
0,6 g (x3)	30 ° C	80 rpm
	37 ° C	80 rpm
	30 ° C	100 rpm
	37 ° C	100rpm

	Temperatura (° C)	Agitación (rpm)
1,0 g (x3)	30 ° C	80 rpm
	37 ° C	80 rpm
	30 ° C	100 rpm
	37 ° C	100rpm

El análisis de los resultados se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XV 2014 para determinar si existen diferencias significativas entre las variables estudiadas.

CAPÍTULO 4

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Resultado estadístico de pruebas realizadas a la materia prima

Para evitar posibles riesgos de contaminación con la materia prima suero lácteo, a pesar de venir pasteurizado de una industria privada proveniente de la zona 5 del Ecuador, se decidió trabajar con suero esterilizado.

Se observó que para las tres cantidades del microorganismo los conteos celulares eran aproximadamente similares. Se continuó trabajando con 0,6 g y 1,0 g.

En la tabla 10 se muestran los valores de los conteos realizados por triplicado de las tres cantidades del microorganismo.

TABLA 10:
CONTEOS CELULARES INICIALES CON SUERO LÁCTEO
ESTERILIZADO

0,6 g	1,0 g	1,5 g
<i>7,1 x 10⁵ UFC/mL</i>	<i>7,3 x 10⁵ UFC/mL</i>	<i>7,5 x 10⁵ UFC/mL</i>
<i>7,2 x 10⁵ UFC/mL</i>	<i>7,4 x 10⁵ UFC/mL</i>	<i>7,6 x 10⁵ UFC/mL</i>
<i>7,0 x 10⁵ UFC/mL</i>	<i>7,3 x 10⁵ UFC/mL</i>	<i>7,5 x 10⁵ UFC/mL</i>

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma, 2014

En la Tabla 11 se aprecian los resultados de la caracterización de la materia prima (suero lácteo) procedente de una industria privada láctea de la Zona 5 del Ecuador, efectuadas previamente a la realización de cada corrida experimental de fermentación.

**TABLA 11:
COMPOSICIÓN DEL SUERO LÁCTEO (%) (VALORES
PROMEDIO)**

Parámetros	Suero de leche
Compuestos nitrogenados	0.85 %
Carbohidratos	3,51 %
Grasa Total	1,33 %
Cenizas	0,57%
Humedad	93,58 %
Ph	6,4

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

4.2. Resultados estadísticos de pruebas realizadas al producto final

En la curva de acidificación se corrobora que el pH disminuye a medida que transcurre la fermentación, coincidiendo con lo reportado en la ficha técnica del microorganismo YC-380 (8).

En la figura 4.1 se observa la curva de acidificación del proceso de fermentación.

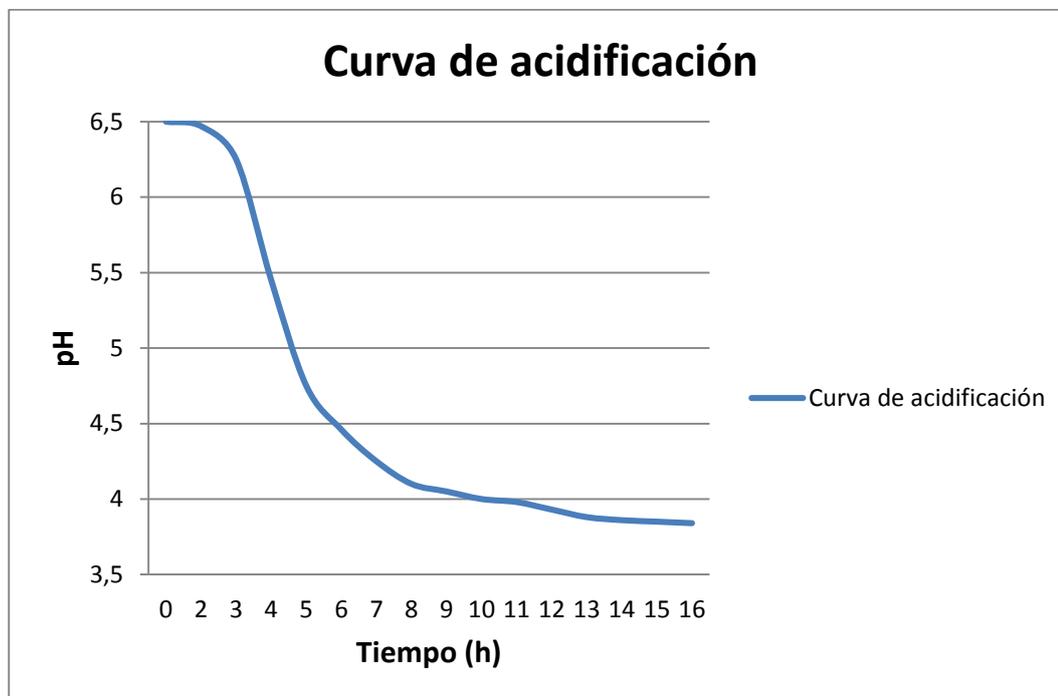


FIGURA 4.1. CURVA DE ACIDIFICACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Se determinaron los parámetros físico- químicos del lactosuero fermentado, la tabla 12 muestra los resultados obtenidos.

TABLA 12:
COMPOSICIÓN DEL LACTOSUERO FERMENTADO
(%) (VALORES PROMEDIO)

Parámetros	Lactosuero fermentado
Compuestos nitrogenados	1,5 %
Carbohidratos	1,21 %
Grasa Total	0,58 %
Cenizas	0,56 %
Humedad	91,72 %
pH	3,4

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

Se realizaron conteos celulares al lactosuero fermentado y se demostró un incremento en dichos conteos celulares después del proceso fermentativo. En las siguientes tablas se muestran los resultados de los conteos celulares que se realizaron al lactosuero fermentado.

TABLA 13:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 30 ° C RPM: 80 pH: 6,4 inicial y final 3,4	0,6	5,56x 10 ⁶	1,06
	0,6	5,45x 10 ⁶	1,05
	0,6	5,31 x 10 ⁶	1,04

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

TABLA 14:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 37 ° C RPM: 80 pH: 6,4 inicial y final 3,4	0,6	6,93x 10 ⁶	1,21
	0,6	6,87x 10 ⁶	1,22
	0,6	6,97x 10 ⁶	1,23

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

TABLA 15:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 30 ° C RPM: 100 pH: 6,4 inicial y final 3,4	0,6	6,05x 10 ⁶	1,08
	0,6	6,10x 10 ⁶	1,09
	0,6	6,17 x 10 ⁶	1,10

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

TABLA 16:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de Fermentación	Cantidad inicial de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 37 ° C RPM: 100 pH: 6,4 inicial y final 3,4	0,6	7,23x 10 ⁶	1,40
	0,6	7,19x 10 ⁶	1,41
	0,6	7,24 x 10 ⁶	1,42

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

TABLA 17:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de fermentación	Cantidad de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 30 °C RPM: 80 pH: 6,4 inicial y final 3,4	1,0	5,65 x 10 ⁶	1,24
	1,0	5,98 x 10 ⁶	1,25
	1,0	5,82 x 10 ⁶	1,26

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

TABLA 18:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de fermentación	Cantidad de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 37 °C RPM: 80 pH: 6,4 inicial y final 3,4	1,0	7,03 x 10 ⁶	1,44
	1,0	7,15 x 10 ⁶	1,45
	1,0	7,08 x 10 ⁶	1,46

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

TABLA 19:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de fermentación	Cantidad de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 30 ° C RPM: 100 pH: 6,4 inicial y final 3,4	1,0	6,76x 10 ⁶	1,10
	1,0	6,41x 10 ⁶	1,11
	1,0	6,72 x 10 ⁶	1,12

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

TABLA 20:

CONTEOS CELULARES REALIZADOS AL LACTOSUERO FERMENTADO

Condiciones de fermentación	Cantidad de Lactobacillus (g)	Conteo final del fermentado (48h) (UFC/mL)	Compuestos nitrogenados (%)
T: 37 ° C RPM: 100 pH: 6,4 inicial y final 3,4	1,0	7,55 x 10 ⁶	1,49
	1,0	7,65 x 10 ⁶	1,50
	1,0	7,75 x 10 ⁶	1,51

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

La fermentación del suero lácteo por bacterias ácido lácticas se convirtió en una alternativa favorable para darle un aprovechamiento adecuado a este efluente con un valor nutricional adicional. En el presente trabajo se destaca como novedoso la caracterización del suero lácteo de la zona 5 del Ecuador y el aprovechamiento eficiente de este efluente mediante el uso de un microorganismo que aparece poco reportado en la literatura, para estos fines, aunque sí aparece reportado para otras producciones como yogurt y otras bebidas fermentadas. Según Franchi (2010) la caracterización del suero lácteo presenta los siguientes valores, compuestos nitrogenados 0,6-1,0%, grasa 0,05- 0,37%, cenizas 0,5% y pH 6,4, también Camacho (2010) reporta compuestos nitrogenados 0,8-1,0%, grasa 0,2-0,7%, humedad 93-94% y pH 6,0-6,6. La caracterización del suero lácteo (materia prima) en el presente trabajo dieron valores similares a los reportados en la tabla 11 (composición del suero lácteo).

Este estudio muestra el comportamiento del **Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus** en un medio de cultivo que tiene como sustrato el suero lácteo, el cual se demostró en la tablas (13-20) que al aumentar los conteos celulares en el proceso de fermentación las características

físico-químicas del suero lácteo fermentado cambiaron, en las tablas (13-20) se mostró un aumento en el contenido de compuestos nitrogenados del lactosuero fermentado con respecto a la del suero lácteo inicial (materia prima) tabla 10.

En las tablas (13-20), se reportan los valores de los conteos finales del lactosuero fermentado. Se observa que tanto para la cantidad de 0,6 g y 1, 0 g del microorganismo la temperatura es una variable influyente en el proceso de fermentación. Según (Panesar, 2010), la temperatura de incubación del lactosuero a 40 ° C para el proceso de fermentación, fue favorable para la multiplicación de otro microorganismo **Lactobacillus casei**, obteniéndose mayor conteo celular en el suero lácteo fermentado, lo cual conlleva al incremento del compuesto nitrogenado. En el presente trabajo se observa que evidentemente en la tabla 21 (análisis de varianza para cantidad de compuestos nitrogenados) la variable temperatura es la condición de mayor efecto en el proceso fermentativo, siendo uno de los factores más importantes, para la eficiente multiplicación del microorganismo estudiado y obteniéndose los mejores resultados con la temperatura de 37 ° C. Esto coincide con el fundamento microbiológico ya que el microorganismo es termófilo,

cuyo intervalo recomendado de temperatura de incubación está entre 35 ° C – 45 ° C de acuerdo a su ficha técnica YC- 380.

Las condiciones de temperatura empleadas para un proceso de fermentación usando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* fue 45° C (Panesar, 2010) (Buchta, 2010). *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus acidophilus* usaron temperaturas comprendidas en un rango de 37 ° C - 45° C (Panesar, 2010). De acuerdo a las temperaturas empleadas en el presente trabajo, la temperatura de 37 ° C se demostró que fue la temperatura más adecuada, la cual coincide con los rangos de temperatura estudiados por los autores anteriormente citados.

En las Tablas (13-20) se observa que la cantidad del microorganismo también tiene importancia influyente en el mismo proceso. Se observó que la cantidad de compuestos nitrogenados del lactosuero inicial (materia prima) valor promedio (s = 0,01) 0,85 %, se incrementó cuando la cantidad del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* fue de 1,0 g, obteniéndose una cantidad final de compuestos nitrogenados valor promedio (s = 0,01) 1,5%, similar a los resultados obtenidos por Feoli (2010) y Escobar (2012).

Durante el proceso de fermentación del **Lactobacillus casei** se estudió el efecto de agitación de un cultivo bacteriano, comparando el medio de cultivo bajo condiciones de control en una zaranda a 100 rpm con aireación. La agitación no tuvo ningún efecto en el proceso de fermentación debido a que el microorganismo es microaerófilo por naturaleza (Panesar, 2010). Otros estudios utilizaron condiciones estacionarias en el proceso de fermentación (Gandhi, 2000) empleando diferentes cultivos de lactobacillus (**L. delbrueckii subsp. bulgaricus**, **L. acidophilus**, **L. casei** etc.). También las condiciones de crecimiento y el efecto de agitación en un proceso de fermentación fue reportado y analizado en estudios anteriores (Roy et al., 2010). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, ya que no se observó ninguna diferencia significativa en el efecto de agitación durante el proceso de fermentación según tabla 21.

Se demuestra según la tabla 20 los mejores resultados obtenidos fueron con condiciones de 37 ° C, 100 rpm y 1,0 g del microorganismo dando un valor promedio del conteo realizado al producto fermentado de 7,65 x 10⁶ UFC/mL. La cantidad de compuestos nitrogenados fue de 1,50% (valor promedio).

Para demostrar la diferencia entre el compuesto nitrogenado de la materia prima con el compuesto nitrogenado obtenido en el producto final de la mejor variante se realizó una prueba t de student empleando el programa Statgraphics Centurion XV 2014, los resultados obtenidos muestran que hay una diferencia significativa con un 95% de confianza.

Se demostró en el análisis estadístico empleando el mismo programa estadístico que los resultados obtenidos en la tabla 21 en cuanto a las variables empleadas en el proceso de fermentación, la temperatura y la cantidad del microorganismo, presentaron diferencias significativas en ambos casos con un 95% de confianza. El análisis realizado para los valores de rpm no dieron significativos lo que demuestra que no tuvieron influencia en los resultados obtenidos.

De acuerdo al coeficiente de variables de la tabla 21, la temperatura fue la que tuvo un mayor valor de todos los coeficientes, con valor de 0,145. Esto demuestra que la temperatura es la condición influyente más importante en el proceso de fermentación del *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, Siguiendo en orden de importancia la

cantidad del microorganismo y también se demostró por el valor de coeficiente que la variable rpm no resultó influyente en el proceso

.En la siguiente tabla 21 se muestra el análisis de varianza para la cantidad de compuestos nitrogenados.

TABLA 21:

**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CANTIDAD COMPUESTOS
NITROGENADOS**

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor- P
A: Cantidad del microorganismo	0,036	1	0,036	182,25	0,047
B:rpm	0,002	1	0,002	12,25	0,177
C:Temperatura	0,146	1	0,146	729,00	0,023
AB	0,013	1	0,013	64,00	0,079
AC	0,001	1	0,001	6,25	0,242
BC	0,014	1	0,014	72,25	0,074

Elaborado por Michelle Peralta y Kevin Palma

En el diagrama de Pareto se observa que la temperatura es la condición más importante y sobresaliente comparada con las otras variables. Se observa que la cantidad del microorganismo es importante aunque la anterior es la más determinante.

En la figura 4.2 se muestra el diagrama de Pareto estandarizada para la cantidad de compuestos nitrogenados.

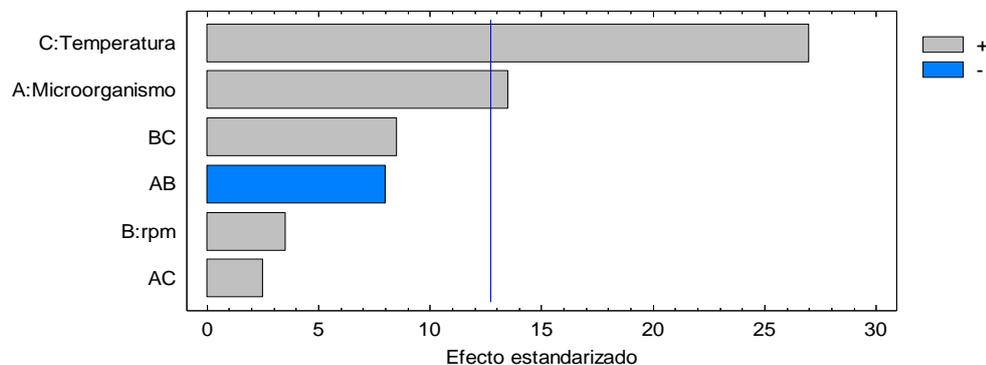


FIGURA 4.2. DIAGRAMA DE PARETO ESTANDARIZADA PARA LA CANTIDAD DE COMPUESTO NITROGENADOS

En la figura 4.3 se hace evidente la influencia de las tres variables estudiadas, la temperatura es la que tiene la mayor pendiente, demostrando que ésta es la variable de mayor importancia, siguiendo en orden de importancia la cantidad del microorganismo y la variable rpm no presentó inclinación alguna, por lo que no resultó significativa.

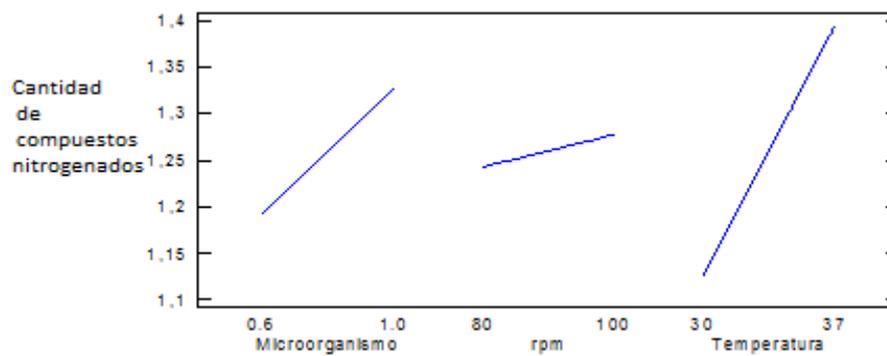


FIGURA 4.3. EFECTOS PRINCIPALES PARA LA CANTIDAD DE COMPUESTOS NITROGENADOS

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se caracterizó el suero lácteo procedente de una industria quesera privada perteneciente a la zona 5 del Ecuador y se demostró mediante análisis físico- químicos que la composición de este lactosuero coinciden con los valores reportados por la norma INEN 2594, 2011 (suero de leche líquido). Los parámetros analizados fueron: carbohidratos 3,51%, compuestos nitrogenados 0,85%, grasa total 1,33%, cenizas 0,57%, humedad 93,58% y pH 6,4.

El microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* se adaptó al sustrato (lactosuero) de una forma eficiente, a pesar de que el medio de cultivo empleado no fue acondicionado previo al proceso de fermentación mediante operaciones de desproteinización y suplementación citadas por otros autores, se obtuvo un crecimiento favorable durante el proceso fermentativo de $7,65 \times 10^6$ UFC/mL (valor

promedio), logrando un incremento en la cantidad de compuestos nitrogenados de 0,85 % (lactosuero materia prima) (valor promedio) a 1,5% (lactosuero fermentado) (valor promedio), al cabo de 48 horas bajo las condiciones de temperatura 37 °C, cantidad del microorganismo 1,0 g y 100 rpm.

Se demostró estadísticamente que durante el proceso de fermentación, la temperatura (37° C) fue la condición más importante e influyente para la reproducción del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, seguido de la cantidad del microorganismo (1g). Se observó que las rpm no eran determinantes en el rango estudiado (80 y 100 rpm), corroborándose las características termófilas y facultativas propias del microorganismo.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda en el futuro seguir profundizando en la investigación en el campo de Ciencias de Ingeniería en Alimentos, para establecer los parámetros optimizados aplicables al proceso de fermentación y llegar a obtener compuestos nitrogenados que podrán emplearse para el desarrollo de alimentos funcionales, obtenidos a partir de este efluente

evitando la contaminación ambiental. También se debe realizar un análisis técnico- económico sobre el posible empleo del proceso 73 fermentativo después de haber optimizado los parámetros de fermentación y poder escalar a nivel de planta piloto.

APÉNDICE

Ficha técnica del

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

- Su análisis es beneficioso para la evaluación nutricional de un alimento. Las cenizas son fundamentales en la preparación de una muestra de alimentos para análisis elemental específico.
- Proporciona el porcentaje de minerales presentes en el alimento.
- Sirve como índice de calidad en algunos alimentos.
- Da a conocer adulteraciones, contaminación o fraudes en alimentos.

Principio

La eliminación de la sustancia orgánica se lleva a cabo por medio de incineración seca, el cual consiste en quemar la muestra en la mufla a temperaturas superiores a 500°C, la eliminación de la sustancia orgánica se da por combustión formándose CO_2 , agua y sustancia inorgánica (sales minerales) se lleva a cabo hasta obtener una ceniza de color gris o gris claro (23).

Procedimiento

- Se calienta la muestra (usualmente 5-10 g) en una cápsula de platino a 100°C hasta el agua sea expulsada.

FD-DVS YC-380 Yo-Flex®**Información de Producto**

Versión: 3 PI-EU-ES 23-11-2011

Descripción	Cultivo termófilo Yo-Flex®														
Taxonomía	Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus Streptococcus thermophilus														
Envase	No Material: 100253	Tamaño 10X50 U	Tipo Sobre (s) en caja												
Propiedades Físicas	Color:	Blanco a ligeramente rojizo o marrón													
	Aspecto Físico:	Granulado													
Aplicación	Uso El cultivo producirá un yogur con un aroma fuerte, viscosidad media y alguna post-acidificación. Adecuado para la fabricación de yogur firme, batido y líquido.														
	Dosis de inoculación recomendada <table border="1" data-bbox="422 1170 1364 1320"> <tr> <td>Cantidad de leche a inocular</td> <td>250 l 70 gal</td> <td>1.000 l 250 gal</td> <td>2.500 l 660 gal</td> <td>5.000 l 1.300 gal</td> <td>10.000 l 2.600 gal</td> </tr> <tr> <td>Cantidad de cultivo DVS</td> <td>50 U</td> <td>200 U</td> <td>500 U</td> <td>1.000 U</td> <td>2.000 U</td> </tr> </table>			Cantidad de leche a inocular	250 l 70 gal	1.000 l 250 gal	2.500 l 660 gal	5.000 l 1.300 gal	10.000 l 2.600 gal	Cantidad de cultivo DVS	50 U	200 U	500 U	1.000 U	2.000 U
Cantidad de leche a inocular	250 l 70 gal	1.000 l 250 gal	2.500 l 660 gal	5.000 l 1.300 gal	10.000 l 2.600 gal										
Cantidad de cultivo DVS	50 U	200 U	500 U	1.000 U	2.000 U										
	Directivas para su uso Sacar el cultivo del congelador justo antes de su utilización. Limpiar la parte superior del sobre con cloro. Abrir el sobre y añadir los gránulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita suavemente. Agitar la mezcla durante 10-15 minutos para distribuir el cultivo homogéneamente. La temperatura recomendada de incubación es de 35-45°C (95-113°F). Para más información sobre aplicaciones específicas, por favor, consulte nuestros catálogos técnicos y recetas recomendadas.														
Gama	La gama de cultivos Yo-Flex® de inoculación directa a cuba, Direct Vat Set (DVS®) varían desde cultivos muy suaves que aportan características distintivas de aroma de yogur con perfiles distintos de viscosidad.														
Almacenaje y manipulación	< -18 °C / < 0 °F														

FD-DVS YC-380 Yo-Flex®

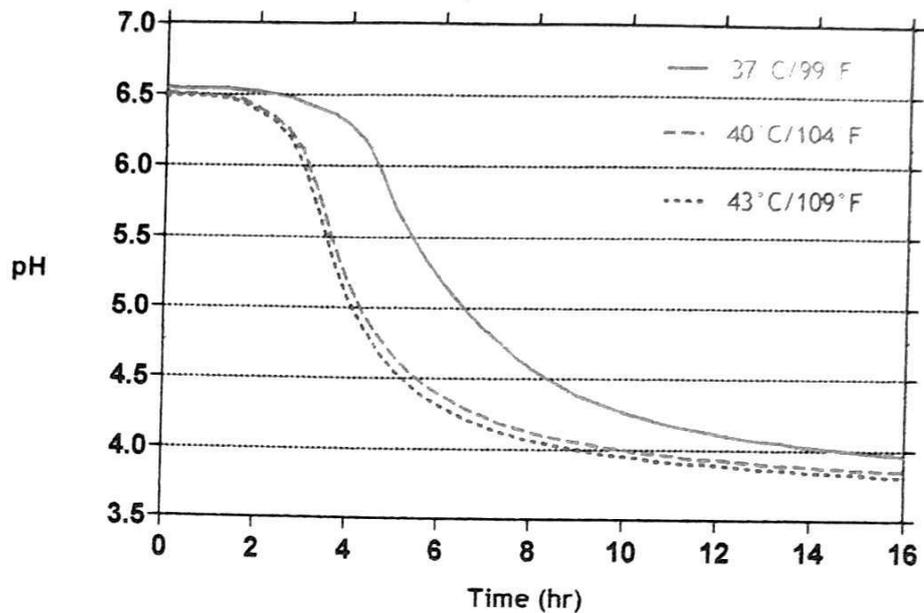
Información de Producto

Versión: 3 PI-EU-ES 23-11-2011

Vida útil

Como mínimo 24 meses desde la fecha de fabricación cuando se almacena siguiendo las recomendaciones.

A +5°C (0°F) la caducidad es de como mínimo 6 semanas.

Información técnica**Curva de acidificación**

Condiciones de fermentación:

Leche entera +2 % leche desnatada en polvo (85°C/185°F, 30 minutos)

Inoculación: 500U/2500L

Métodos analíticos

Los métodos de referencia y analíticos están disponibles bajo petición.

Legislación

Chr. Hansen cumple con los requerimientos generales de seguridad alimentaria establecidos por el Reglamento 178/2002/EC. Las bacterias ácido lácticas son reconocidas de forma general como seguras y pueden ser utilizadas en alimentos, sin embargo, para aplicaciones específicas recomendamos que consulte la legislación nacional.

El producto está destinado a ser utilizado en alimentos.

FD-DVS YC-380 Yo-Flex®

Información de Producto

Version: 3 PL-EU-ES 23/11/2011

Información sobre Alérgenos

List of common allergens in accordance with the US Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 (FALCPA) and EU labeling Directive 2000/13/EC with later amendments	Presente como Ingrediente en el producto
Cereales que contengan gluten* y productos derivados	No
Crustáceos y productos a base de crustáceos	No
Huevos y productos a base de huevo	No
Pescado y productos a base de pescado	No
Cacahuetes y productos a base de cacahuetes	No
Soja y productos a base de soja	No
Leche y sus derivados (incluida la lactosa)	Si
Frutos de cáscara* y productos derivados	No
Lista de alérgenos de acuerdo con la Directiva sobre etiquetado 2000/13/EC de la UE, exclusivamente	
Apio y productos derivados	No
Mostaza y productos derivados	No
Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo	No
Altramucos y productos a base de altramucos	No
Moluscos y productos a base de moluscos	No
Anhidrido sulfuroso y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro expresado como SO ₂	No

* Please consult the EU Labeling Directive 2000/13 Annex IIIa for a legal definition of common allergens, see European Union law at: www.eur-lex.europa.eu

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS (POR DIFERENCIA ENTRE CENIZAS Y HUMEDAD).

Los glúcidos, azúcares o carbohidratos, son químicamente hablando, aldehídos o cetonas polihidroxílicos, o productos derivados de ellos por oxidación, reducción, sustitución o polimerización. Los carbohidratos presentan diversas funciones en los organismos, ya sea como fuente energética o como material estructural de las membranas. Los carbohidratos se pueden clasificar en monosacáridos simples y compuestos, oligosacáridos y polisacáridos simples y compuestos (39).

Determinación de Cenizas (AOAC 18th 940.26)

Se define las cenizas de un alimento como un residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica existente en una muestra. Las cenizas no tienen los mismos elementos que las muestras intactas (alimento original), ya que hay pérdidas de volatilización y por conversión e interacción entre los constituyentes químicos. La cantidad de residuos inorgánicos representa el contenido total de minerales en los alimentos.

La determinación de cenizas es importante por varias razones:

- Su análisis es beneficioso para la evaluación nutricional de un alimento. Las cenizas son fundamentales en la preparación de una muestra de alimentos para análisis elemental específico.
- Proporciona el porcentaje de minerales presentes en el alimento.
- Sirve como índice de calidad en algunos alimentos.
- Da a conocer adulteraciones, contaminación o fraudes en alimentos.

Principio

La eliminación de la sustancia orgánica se lleva a cabo por medio de incineración seca, el cual consiste en quemar la muestra en la mufla a temperaturas superiores a 500°C, la eliminación de la sustancia orgánica se da por combustión formándose CO_2 , agua y sustancia inorgánica (sales minerales) se lleva a cabo hasta obtener una ceniza de color gris o gris claro

(23)

Procedimiento

- Se calienta la muestra (usualmente 5-10 g) en una cápsula de platino a 100°C hasta el agua sea expulsada.

- Se coloca la cápsula en la mufla a una temperatura aproximada de 525°C y se deja hasta obtener cenizas libres de residuos carbonosos.
- Sacar la cápsula y colocar en el desecador, enfriar y pesar.

Cálculos

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

Dónde:

m = masa de la cápsula vacía, en g;

m_2 = masa de la cápsula con la leche (antes de la desecación), en g.

m_3 = masa de la cápsula con las cenizas (después de la incineración), en g.

Determinación de Humedad (AOAC 18th 950.46)

Los alimentos poseen altos contenidos de agua el cual varían entre un 60% y 95%. En los tejidos vegetales y animales se encuentra en dos formas, como agua libre y agua ligada. El agua libre o absorbida, es aquella que se puede extraer fácilmente de los alimentos exprimiendo, cortando o presionando, mientras que el agua ligada es difícil de extraer. El agua ligada es aquella

que se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales. (23)

Principio

La determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de muestra, pesado, secado a una temperatura de $103 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta peso constante y tiene una duración de 2-3 horas, enfriado y pesado nuevamente de la muestra (33).

Procedimiento

- Pesar de 2 a 5 g de muestra, en una capsula de aluminio previamente tarada.
- Secar la muestra hasta peso constante en la estufa por un tiempo de 4 horas a una temperatura de 125°C .
- Enfriar en desecadora hasta temperatura ambiente y pesar.

Cálculos

$$\% \text{ SS} = \left(\frac{m_2 - m}{m_1 - m} \right) * 100$$

Donde:

% SS = sustancia seca en porcentaje en masa

m = masa de la cápsula en gramos

m_1 = masa de cápsula de la muestra en gramos

m_2 = masa de la cápsula con la muestra después

Humedad (%) = 100 - % SS

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL (AOAC 18th 991.20)

El contenido total de proteínas en los alimentos se determina mediante el método Kjeldahl. Este procedimiento determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (23). Como consecuencia de su estructura a base de aminoácidos individuales, el contenido de nitrógeno de las proteínas varía sólo entre unos límites muy estrechos (15 a 18% y como promedio 16%) (50).

Principio

Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en: Ácido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo, Ácido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico (23).

Determinación de Grasas (Soxhlet) (NMX-AA005-SCFI-2000)

Los lípidos se encuentran en los alimentos en forma de moléculas de triglicéridos (3 ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol), y presentan diferente composición dependiendo de su fuente de obtención. Su estructura química varía debido a que son un grupo complejo de moléculas. Entre sus características una de la más principal es su insolubilidad en el agua y su alta solubilidad en disolventes no polares, tales como el éter etílico, hexano, benceno, cloroformo y derivados líquidos del petróleo. Existen métodos volumétricos y físicos para la determinación de grasas, pero los más usados para la extracción y cuantificación de grasas de los alimentos consisten en la extracción directa con uno o varios disolventes, utilizando un equipo de extracción (24).

Principio

La grasa se extrae con una mezcla de éteres desde la muestra con un peso ya conocido. El extracto etéreo se decanta y el éter es evaporado. La grasa extraída es secada hasta peso constante.

Procedimiento

- Preparación de la muestra: En muestras con mucha humedad homogeneizar y secar a 103 ± 0.5 °C en estufa de aire considerando el tipo de muestra.

Procedimiento

- Se pesa 2 g de la muestra de ensayo sobre un papel filtro de 7 cm de tamaño y son transferidos en un tubo de digestión de 250 mL.
- Se coloca los tubos en la campana de gases y se adiciona 2 o 3 perlas de vidrio, 2 tabletas Kjeldahl, 15 mL H_2SO_4 y lentamente 3 mL al 30-35% H_2O_2 .
- La digestión se realiza a 410 ° C hasta que la mezcla esté clara alrededor de 45 minutos.
- Se remueve los tubos y se deja enfriar alrededor de 10 minutos.
- Se coloca solución de NaOH- $Na_2S_2O_3$ en un tanque alcalino de destilación de vapor. Asegurarse que los 50- 75 mL se dispensen de la unidad antes de realizar la destilación.
- Se adjunta sobre la plataforma uno de los tubos del digestor en la unidad destiladora y un Erlenmayer de 250 mL que contiene 25 mL de la solución H_3BO_3 con un indicador mixto en el extremo final del condensador. La

destilación de vapor recoge hasta 100- 125 mL (la solución absorbida se vuelve verde debido a la liberación de NH_3).

- Se titula la solución absorbida con 0.2 M HCL hasta un extremo gris neutro y se lee el volumen de ácido requerido para 0.01 mL. Titular el reactivo blanco de la misma manera.

Cálculos

Porcentaje de Nitrógeno

$$\% N = (V_A - V_B) * 1.4007 * M / \text{g porción de ensayo}$$

Porcentaje de Proteína

$$\% P = (V_A - V_B) * 1.4007 * M * 6.38 / \text{g porción de ensayo}$$

Donde:

V_A y V_B = Volumen de ácido requerido para la porción de ensayo y el blanco, respectivamente.

1.4007 = Peso mili-equivalente

M = Molaridad del ácido estandarizada

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE GRASAS (SOXHLET) (NMX-AA005-SCFI-2000)

Los lípidos se encuentran en los alimentos en forma de moléculas de triglicéridos (3 ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol), y presentan diferente composición dependiendo de su fuente de obtención. Su estructura química varía debido a que son un grupo complejo de moléculas. Entre sus características una de la más principal es su insolubilidad en el agua y su alta solubilidad en disolventes no polares, tales como el éter etílico, hexano, benceno, cloroformo y derivados líquidos del petróleo. Existen métodos volumétricos y físicos para la determinación de grasas, pero los más usados para la extracción y cuantificación de grasas de los alimentos consisten en la extracción directa con uno o varios disolventes, utilizando un equipo de extracción (24).

Principio

La grasa se extrae con una mezcla de éteres desde la muestra con un peso ya conocido. El extracto etéreo se decanta y el éter es evaporado. La grasa extraída es secada hasta peso constante.

Procedimiento

- Preparación de la muestra: En muestras con mucha humedad homogeneizar y secar a 103+ ° C en estufa de aire considerando el tipo de muestra.
- Moler y pasar por tamiz de malla de 1 mm
- Pesar en duplicado 2 a 5 gramos de muestra preparada en el dedal de extracción o papel filtro previamente pesado y tapado con algodón desgrasado.
- Secar el matraz de extracción por 30 min a 103+ 2°C.
- Pesar el matraz de extracción
- Poner el matraz de extracción en el sistema Soxhlet el dedal en el tubo de extracción y adicionar el solvente al matraz.
- Extraer la muestra con el solvente por 6 a 8 horas a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/s.
- Una vez terminada la extracción eliminar el solvente por evaporación en-rotavapor o baño María bajo campana. Hasta que no se detecte olor a éter.

- Secar el matraz con la grasa en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 min, enfriar en desecador y pesar.

Cálculos

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m_2 - m_1}{m} * 100$$

Dónde:

m = peso de la muestra

m_1 = tara del matraz solo

m_2 = peso matraz con grasa.

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DE pH (pH-metro Thermo Scientific Orion 5 star)

El pH es la concentración de iones hidronio $[H_3O^+]$ presentes en determinada sustancia.

Principio

Se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (potenciómetro), un instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia (generalmente de plata /cloruro de plata) y un electrodo de vidrio que es sensible al ion hidrógeno (33)

Procedimiento

- Calibrar el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, pH 7 y pH 10 según la acidez del producto.
- Tomar una porción de la muestra ya preparada, mezclarla bien por medio de un agitador.
- Sumergir él electrodo en la muestra de manera que los cubra perfectamente. Hacer la medición del pH. Sacar el electrodo y lavarlo con agua.

BIBLIOGRAFÍA

1. Briceño, Ana; Raúl, Martínez; y Karely, García. Viabilidad y actividad de la flora láctica (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) del yogurt en Venezuela. *Tecnología de Alimentos, Acta Científica Venezolana*, Venezuela, 2010, vol 52, no 1, p. 46–54.
2. Buchta, Klever. Lactic acid. *Biotechnology Microbial products*, Alemania, 2010, vol 50, no 5, p. 409- 417.
3. Cabeza, Enrique. Bacterias ácido-lácticas (BAL): Aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. *Biotechnology Microbial products. Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, Pamplona, Colombia, 2009, vol 24, no 2, p. 1-12
4. Camacho, Margarita. Obtención de un concentrado proteico del suero de la leche de vaca utilizando tecnología de membranas. *Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria*. Quito, Ecuador, 2010, p. 23-26.
5. Cayré, María; Graciela, Vignolo; y Oscar, Garro. Modelo dinámico para el crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones

- cárnicas. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Chacabuco, Argentina, 2010, vol 4, no 3, p. 1-4.
6. Chacón, Alejandro. Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana*, San José, Costa Rica, 2010, vol 17, no 2, p. 243-264.
 7. Chóez, Johanna; y Morales, María Fernanda. Elaboración de una bebida hidratante a base de lactosuero y enriquecida con vitaminas. Publicación de la Escuela Superior Politécnica del Litoral- Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil, Ecuador 2010, vol 1, no 2, p. 1-8. CHR HANSEN. Ficha técnica FD-DVS YC-380 Yo- Flex, 2011, V.O. 3, p. 1-4
 8. Cocha, Luis. Elaboración de una bebida fermentada utilizando suero de queso mozzarella enriquecida con harina de maíz germinado. *Rev. Ciencia y Tecnología UTEQ*, Ibarra, Ecuador 2011, p. 5-13.
 9. Córdor, Rocío; Víctor, Meza; y Fanny, Ludeña. Obtención de una bebida fermentada a partir de suero de queso utilizando células

nmovilizadas de *Kluyveromyces fragilis*. Revista peruana de biología. Lima, Perú, 2012, vol 7, no 3, p. 160-180.

10. Cori, Marta; Nilo, Rivas; Blas, Dorta; Emperatriz, Pacheco; y Antonio, Bertsch. Obtención y caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* cultivada en suero de lácteo desproteínizado. *Revista Científica FCV/LUZ*, Maracaibo, Venezuela, 2010, vol 15, no 3, p. 315-324.
11. Erguder, Tuba; y Ulas, Tezel. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *In Elsevier*, Ankara, Turquía, 2011, vol 21, no 2, p. 643-650.
12. Escobar, Luis; Carlos, Rojas; Antonio, Germán; y Leonardo Padilla. Evaluación del Crecimiento De *Lactobacillus casei* y Producción de Ácido Láctico usando como Sustrato el Suero de Leche de Vacuno. *Rev. Quindío, Colombia*, 2012, vol 20, no 5, p. 42-49.
13. Feoli, Miguel; Carlos, Escobar; y Rodrigo, Marín. Obtención de Ácido Láctico por Fermentación con *Lactobacillus delbrueckii*

- Politécnica del Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba, Ecuador, 2011, p. 4-10.
19. Hernández, Alicia; Ileana, Alfaro; y Ronald, Arrieta. *Microbiología Industrial*. Primera edición. UNED, San José, Costa Rica, 2010, p. 40-70
20. Holt. John. *Bergey's Manual of Determination Bacteriology*. Ninth Edition. Illustration Planner, Philadelphia, USA, 2000, p. 23-37.
21. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. Norma Técnica Ecuatoriana para el suero de leche líquido requisitos. Quito: INEN, 2011. 8 págs. NTE INEN 2594.
22. Laboratorio de alimentos I. procedimientos. Facultad de química UNAM. *Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos*, México D.F, México, 2008, p. 5-12.
23. Lagos, Peña. Métodos para determinación de grasas. *Laboratorio de Bromatología*, Guadalajara, México, 2009, vol 1, no 2, p. 2-7.
24. Laguna, Hugo. Elaboración de una Bebida Nutritiva a partir de la Pulpa de Maracuyá (*pasiflora incarnata*), y Suero Láctico, en la

- bulgaricus**. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, Bogotá, Colombia, 2010, vol 20, no 23, p. 18-24.
14. Franchi, Oscar. Suero de leche, Propiedades y usos. *Innovación en la Industria*, Quillota, Chile, 2010, vol 3, no 2, p. 16-28.
15. Gandhi, Dinesh; Rajan, Patel; Bharat, Wadhwa; y Neena, Bansal. Effect of agro-based by- products on production of lactic acid in whey permeate medium. *Food Science Technology*, Mysore, India, 2010, vol 37, no 4, p. 292-295.
16. García, Carlos; Guillermo, Arrázola; y Marcela Villalba. Producción de Ácido Láctico de lactosuero Suplementado utilizando ***Lactobacillus casei***. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, Córdoba, España, 2013, vol 11, no 1, p. 136-143.
17. Gil, Mauricio. Industrialización de Proteínas del Lactosuero. Revista: Revisiones de la Ciencia, *Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, Cali, Colombia, 2007, vol 7, no 2, p. 6-9.
18. Gonzáles, Joanna. Elaboración y Evaluación Nutricional de una Bebida Proteica a Base de Lactosuero y Chocho ***Lupinus mutabilis*** como Suplemento Alimenticio. Escuela Superior

Planta Procesadora de Frutas y Hortalizas de la Universidad Estatal de Bolívar. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Guaranda, Ecuador, 2011, p. 24-26.

25. Larpent, John. Las bacterias lácticas. *En ICMSF, Microbiología Alimentaria, Las fermentaciones alimentarias, Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España, 2010, vol 2, no 1, p. 3-17.*
26. Lyhs, Ulrike. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. *Academic Dissertation, Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finlandia, 2002, vol 76, no 12, p. 952- 966.*
- 27.- McKay, Larry; y Kathleen, Baldwin. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews, Minneapolis, Estados Unidos, 2007, vol 87, no 2, p. 3 -14.*
28. Mende, Susann; Leona Krzyzanowski; Jost Weber; Doris Jaros; y Harald Rohm. Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus DSM 20081* in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. *Journal of*

Bioscience and Bioengineering, Berlín, Alemania, 2012, vol 113, no 2, p. 185-191.

29. Ministerio de Industrias y Productividad, septiembre 2013, *Políticas Industriales en el Sector de Alimentos*, Recuperado el 28 de Abril del 2014, de <http://www.scpm.gob.ec/wp-content/uploads/2013/09/2.6-David-Villegas-MIPRO-Politica-Industrial-de-Desarrollo-en-el-Sector-de-Alimentos.pdf>

30. Moreira, Juan. Esperamos exportar 150 mil litros diarios de leche, Diario El Telégrafo, Guayaquil, Ecuador, 2013, de: www.eltelegrafo.com.ec.

31. Panesar, Parmjit; John Kennedy; Charles Knill; y María Kosseva. Production of L (+) Lactic Acid Using *Lactobacillus casei* from Whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, Brazil, 2010, vol 53, no 1, p. 219-226.

32. Papine, Jorge. Técnicas de análisis de alimentos. *Folleto de Fundamentos y técnicas para análisis de alimentos*, México, México, 2010, vol 1, no 1, p. 1-20.

33. Parzanese, Magali. Procesamiento de lactosuero. *Revista Alimentos Argentinos*, Buenos Aires, Argentina, 2010, vol 10, no 13, p. 1-9.
34. Parra, Ricardo. Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Escuela de Ciencias Químicas*, Tunja, Colombia, 2009, vol 62, no 1, p. 4967-4982.
35. Pescuma, Micaela; Elvira Herbert; Fernanda Mozzi; y Graciela Font de Valdez. Whey Fermentation by Thermophilic Lactic Acid Bacteria: Evolution of Carbohydrates and Protein Content. *Food Microbiology*, Buenos Aires, Argentina, 2010, vol 25, no 4, p. 442-451.
36. Pezo, Joffre. Determinación de las Principales Malezas en Potreros y su Relación con las Prácticas de Manejo Realizadas en las Ganaderías Bovinas de la Provincia del Guayas. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil, Ecuador, 2011, p. 5.
37. Proteína del suero de leche.
<https://www.nutritienda.com/es/wiki/proteina-de-suero.pdf>. Documento sin autor. Fecha de la consulta: 4/08/2014

- 38.- Ramírez, María. Determinación de Carbohidratos. *Revistas de análisis de alimentos*, México D.F, México, 2011, vol 1, no 3, p.1-6.
- 39.- Recinos, Lissette; y Oscar Saz. Caracterización del Suero Lácteo y Diagnóstico de Alternativas de sus Potenciales en el San Salvador. Universidad de el Salvador. Escuela de Ingeniería Química, San Salvador, El Salvador 2009, p. 18-20.
- 40.-Romero, Jorge. Control Avanzado en Procesos Industriales de Microfiltración y Ultrafiltración tangencial. Universidad politécnica de Valencia, Valencia, España 2010, p. 8.
- 41.- Roy, Denis; Jacques Goulet; y Anh LeDuy. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Quebec, Canadá, 2010, vol 24, no 2, p. 206-213.
- 42.- Ruales, Jenny. Obtención de una bebida láctea a partir del concentrado proteico de la mazada o suero de la mantequilla por medio de tecnología de membranas. Escuela politécnica nacional. Facultad de Ingeniería química y agroindustria, Quito, Ecuador, 2011.

- 43.- Salazar, María. Desarrollo de una compota de zapallo con harina de maíz tostado y estudio de su tratamiento térmico. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil, Ecuador, 2008, p. 23.
- 44.-Sánchez, Guillermo; Miriam Gil; Maritza Gil; Francisco Giraldo; Leónidas Millán; y María Villada. Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes. *Producción + Limpia*, Medellín, Colombia, 2012, vol. 4, no 2, p. 66-74.
- 45.-Sánchez, Nedher; Diana Ramírez; y Arley Zapata. Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Medellín, Colombia*, 2010, vol 14, no 2, p. 27-34.
- 46.-Schaller, Aníbal. Sueros de lechería. *Dirección Nacional de Agroindustria-Alimentos Argentinos*, Buenos Aires, Argentina, 2011, Vol 2, No 3, p. 20-24.
- 47.-Shene, Carlos; y Sussan Bravo. Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* for

exopolysaccharide production in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*, Temuco, Chile, 2010, vol. 40, no 5, p. 1578-1584.

48.-Topisirovic, Ljubisa; Milan Kojic; Djordje Fira; Natasa Golic; Ivana Strahinic; y Jelena Lozo. Potential of lactic bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, Portoroz, Eslovenia, 2012, vol 112, no 3, p. 230-235.

49.-Ureña, Francisco. Análisis químico de alimentos, *Revista de análisis de alimentos*, Córdoba, España, 2011, vol 3, no 2, p. 1-11.

50.-Urribarrí, Lauris; Alex Vielma; Gisela Paéz; José Ferrer; Zulay Mármol; y Eduardo Ramones. Producción de Ácido Láctico a Partir de Suero de Leche, Utilizando *Lactobacillus helveticus* en Cultivo Continuo. *Revista Científica*, Maracaibo, Venezuela, 2011, vol 14, no 4, p. 297-302.

51.-Valencia, Elizabeth; y María Ramírez. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Instituto Tecnológico de Puebla*, México D.F, México, 2009, Vol 14, No 73, p. 27-31.

52.-Zambrano, Andrés. Buenos datos para la producción de leche en Ecuador. *Agro noticias América Latina y el caribe*, Ecuador, 2013, de: www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/196507/