

**EVALUACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDO POLILÁCTICO PROVENIENTE DEL  
SUERO DE QUESERÍA A NIVEL LABORATORIO**

**LAURA VIVIANA CUERVO GARCÉS  
JULIO CESAR ECHEVERRY VARGAS**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C  
2016**

**EVALUACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDO POLILÁCTICO PROVENIENTE DEL  
SUERO DE QUESERÍA A NIVEL LABORATORIO**

**LAURA VIVIANA CUERVO GARCÉS  
JULIO CESAR ECHEVERRY VARGAS**

**Proyecto Integral de Grado para optar al título de  
INGENIERO QUÍMICO.**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C  
2016**

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

Presidente de Jurado Elizabeth Torres Gamez

---

Jurado 1 Edubiel Salcedo

---

Jurado 2 Oscar Lombana

Bogotá D.C. agosto de 2016

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano General Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa Ingeniería química

Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis papás primero que todo, por haberme dado la vida, siempre apoyarme y ser un ejemplo a seguir permitiendo crear unas bases solidad de responsabilidad y compromiso en lo que me propongo. Mi papá Carlos Eduardo quien siempre ha estado ahí colaborándome, con sus consejos incluso elaboración de algunas partes del proyecto y en general de mi carrera, mi mamá Luz Perla quien también ha estado muy pendiente de toda la elaboración de este proyecto y durante toda mi carrera profesional.

Este trabajo es dedicado a mis hermanos Catalina y Andrés quienes me han brindado apoyo y consejo durante mi vida y carrera profesional además han compartido conmigo aunque en la distancia gran parte de los logros que me propongo.

También le dedico este trabajo a mi tía Gloria que ha sido como una segunda mamá para mí durante toda mi vida, y a mi prima Diana Carolina que es otra hermana más, ella es un ejemplo a seguir pues ha sentado unas bases muy sólidas de responsabilidad, superación y logro a nivel profesional.

Además le dedico este trabajo a mi tía Leonor quien es una persona muy especial, pues ella ha brindado muchos consejos y apoyo en mí.

Además les dedico esto a todos mis compañeros y amigos que estuvieron siempre a lo largo de mi formación profesional.

A mi compañero de trabajo de grado que aunque discutimos, hicimos todo lo posible para aprender de nuestro errores, mejorar y hacer un buen trabajo.

Y en general le dedico este trabajo a cada persona que ha conformado parte de mi formación profesional durante todo este tiempo.

Laura Viviana Cuervo Garcés

## DEDICATORIA

A la mujer que me dio la vida, la mujer que siempre está a mi lado, la que todo lo puede y a la que más amo, este logro fue alcanzado gracias a ella la mujer más grande que la vida me puede brindar.

A mi viejita, mi adorada abuela por hacer la persona que soy por esos consejos que toda la vida tendré, mi segunda madre, una gran fuente de inspiración en mi camino, y la alegría de saber que aun estas a mi lado.

A mi tío por siempre estar pendiente de mí, ser casi como un papa, estar siempre pendiente y brindar apoyo, ayudarme cada semestre en lograr estudiar, por ser la gran persona que es y un gran ejemplo para mi vida.

Al gordo, el papa que la vida me trajo con el tiempo, un buen amigo y consejero, una persona que ayudo a impulsarme en el camino y a la colaboración que brinda a mi madre, por hacerla feliz y completar mi hogar.

A mi Aleja mi gran amor, por siempre darme voces de ánimo y aliento, acompañarme en las buenas y en las malas, por todo lo que me brinda y la grandiosa compañía en estos años.

A mi tía, su esposo y mis primos por la compañía, por el apoyo y siempre estar pendientes.

A mi abuelo por las enseñanzas y valores inculcados, a pesar de todo me siento orgulloso de tenerlo como abuelo aprendí muy buenas cosas de pequeño estando a su lado.

A la familia Jiménez a todas esas mujeres que generalmente comparto todos los fines de semana, por todo lo que han hecho en este tiempo, por saber cómo alentar en momentos tristes y dejarme entrar en su hogar.

A Juan Gómez y Mariana García toda la carrera completa juntos, haber disfrutado de grandes compañías y buenos momentos, por siempre estar en común colaboración para salir adelante.

A todas esas personas que no menciono pero que han estado en el trayecto y que seguirán en el siendo una muy agradable compañía.

A mi compañera de grado por aguantar tanto, y por esas discusiones que no sacaron ganador o perdedor solo sacaron conocimientos.

Y a la vida por hacer posible este sueño.

Julio Cesar Echeverry Vargas

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a:

- La empresa Quesos del Vecchio y su personal por todo su apoyo en el desarrollo del documento.
- A Ahudrey Leal Quintero por sus enseñanzas y acompañamiento en la culminación de este proyecto.
- A todo el personal de Nodo Tecnoparque del Sena Bogotá por su colaboración, el préstamo de las aulas y disposición de ayuda con el proyecto de grado.
- A Carlos Eduardo Cuervo por su dedicación, colaboración y ayuda en la elaboración de todo el proyecto.
- A Oscar Eduardo Rojas por su colaboración y aporte a lo largo de la realización del proyecto.
- A todos nuestros compañeros Alejandra Ardila, Santiago Cordon, Nicholl Ramírez, Lina Gonzales, Alejandra Salinas y Felipe García por su ayuda y colaboración en el desarrollo del documento.
- A todas las personas que siempre brindaron sus palabras de ánimo y dieron sus buenos deseos para continuar arduamente con este proyecto de grado.



## CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVOS	22
1. GENERALIDADES	23
1.1 LECHE	23
1.2 QUESO	24
1.2.1 Caseína.	25
1.3 SUERO	26
1.4 BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL)	28
1.4.1 Lactococos	32
1.4.2 Lactobacilos	32
1.5 ÁCIDO LÁCTICO	32
1.5.1 Definición y características	32
1.5.2 Usos y obtención	33
1.6 ACIDO POLILÁCTICO	34
1.6.1 Definición y características	34
1.6.2 Usos y obtención	36
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	39
2.1 MATERIALES	39
2.1.1 Suero	39
2.1.2 Bacterias ácido - lácticas	39
2.2 EQUIPOS	40
2.3 REACTIVOS	44
2.4 MÉTODOS	45
2.4.1 Activación, cultivo e inóculo microbiano	46
2.4.2 Fermentación	47
2.4.3 Separación	48
2.4.4 Polimerización.	48
2.5 CARACTERIZACIÓN	49
2.5.1 Acidez titulable	49
2.5.2 Densidad	49
2.5.3 pH	49
2.5.4 Método de Biuret para cuantificación de proteínas	50
2.5.5 Prueba de Fehling para azúcares reductores	50
2.5.6 Método de diluciones y conteo en placa	51
2.5.9 Espectroscopia infrarroja	52
2.5.10 Difracción de rayos X	52

2.6 DEFINICIÓN DE PARÁMETROS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.	53
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	56
3.1 ACTIVACIÓN, CULTIVO E INÓCULO MICROBIANO	56
3.2 FERMENTACIÓN	58
3.3 SEPARACIÓN	62
3.4 POLIMERIZACIÓN	63
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
4.1 FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO MICROBIANO	66
4.2 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ACIDO LÁCTICO	70
4.3 POLIMERIZACIÓN	74
5. CONCLUSIONES.	76
6. RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFIA.	78
ANEXOS	82

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición de la leche.	23
Tabla 2. Composición de la leche procedente de diferentes especies animales	24
Tabla 3. Clasificación de los quesos	25
Tabla 4. Composición aproximada del lactosuero	27
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico	33
Tabla 6. Propiedades Físicas del Ácido Poliláctico	35
Tabla 7. Especificaciones del solvente	54
Tabla 8. Conteo de colonias durante la fermentación	61
Tabla 9. Mililitros de suero gastados en prueba de Fehling para azúcares reductores	61
Tabla 10. Titulación con NaOH al iniciar y finalizar la fermentación	61
Tabla 11. Tabla de resultados de conteo microbiano	66
Tabla 12. Promedio de conteos microbianos	67
Tabla 13. Producción promedio de ácido láctico de los dos tipos de suero	68
Tabla 14. Densidad de las soluciones utilizadas en la extracción	73
Tabla 15. Balance de masa suero sin proteínas	73
Tabla 16. Balance de masa suero con proteínas	73
Tabla 17. Concentraciones de albumina de suero bobino con respecto a la absorbancia	84
Tabla 18. Porcentaje de azúcares reductores	86
Tabla 19. Producción de ácido láctico	86
Tabla 20. Ajuste cinético método de Hanes	87
Tabla 21. Lectura de Grupos funcionales con respecto a las longitudes de onda	89

## LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Grafica 1 Promedio del crecimiento microbiano del suero sin desproteinizar y del suero desproteinizado	67
Grafica 2 Ajuste lineal método Hanes para suero desproteinizado	69
Grafica 3 Ajuste método Hanes para suero sin desproteinizar.	70
Grafica 4 Concentración vs absorbancia de albumina de suero bobino	84

## LISTA DE IMÁGENES

pág.

Imagen 1. Liofilizado cultivo para yogurt con Streptococcus thermophilus Lactobacillus delbrueckii y bifidobacterium	39
Imagen 2. Microorganismos separados Streptococcus thermophilus liofilizado 1 y liofilizado 2	57
Imagen 3. Microorganismos separados Lactobacillus delbrueckii liofilizado 1 y 2	57
Imagen 4. Filtración de suero desproteinizado	58
Imagen 5. Fermentación microbiana en shacker	59
Imagen 6. Conteo en cajas de Petri primera replica suero sin desproteinizar pasadas las 48 horas de fermentación.	60
Imagen 7. Conteo en cajas de Petri primera replica suero desproteinizado pasadas las 48 horas de fermentación.	60
Imagen 8. Extracción liquido-liquido en embudos de decantación	63
Imagen 9. Obtención de lactida	64
Imagen 10 Polímero Obtenido	65
Imagen 11 Polímero Seco	65
Imagen 12. Fases recuperadas de la extracción	71
Imagen 13. Fases recuperadas de la extracción suero sin proteínas	72

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 Vía metabólica fermentación hemolítica	30
Figura 2. Ruta metabólica heterofermentativa	31
Figura 3. Isómeros de ácido láctico	33
Figura 4. Reacción de polimerización del ácido láctico por lo métodos policondensación directa y apertura abierta del anillo (ROP)	37
Figura 5 Procedimiento del método de diluciones para el conteo en placa	51

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo A.</b> Caracterización del suero	83
<b>Anexo B.</b> Cinética Microbiana	86
<b>Anexo C.</b> Separación y purificación del ácido láctico	88
<b>Anexo D.</b> Espectros Ácido Láctico	89
<b>Anexo E.</b> Espectros Ácido Poliláctico	91
<b>Anexo f.</b> Difractogramas Ácido Poliláctico	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AOAC:** association of analytical communities

**AR:** Aazúcar reductores

**Cps:** centipoise

**f:** factor de fehling.

**g:** gramos.

**Gpa:** giga pascales

**Kda:** kilo Dalton

**M:** kolaridad.

**Mpa:** mega Pascales

**mL:** mililitros.

**N:** Normalidad

**NTC:** norma técnica Colombiana

**pH:** potencial de hidrógeno.

**PLA:** ácido poliláctico.

**RC:** sustrato con proteínas.

**RS:** sustrato sin proteínas.



## GLOSARIO

**ÁCIDO LÁCTICO:** el ácido láctico es un compuesto químico que forma parte del grupo de los ácidos carboxílicos, conocido por su nomenclatura oficial ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido  $\alpha$ -hidroxi-propanoico, es un compuesto químico que desempeña importantes roles en varios procesos bioquímicos, como la fermentación láctica..

**ÁCIDO POLILÁCTICO:** es un polímero constituido por moléculas de ácido láctico, con propiedades semejantes a las del tereftalato de polietileno (PET) que se utiliza para hacer envases, pero que además es biodegradable. Se degrada fácilmente en agua y óxido de carbono.

**BIOPOLÍMERO:** son sustancias poliméricas naturales de alto peso molecular y forma predominantemente alargada, sustituye a los materiales tradicionales plásticos, además es un polímero obtenido de fuentes renovables.

**DESPROTEINIZAR:** proceso mediante el cual se elimina las proteínas de una mezcla, se puede realizar por medio de disolventes orgánicos.

**DISOLVENTE:** es una sustancia en la que se diluye un soluto (un sólido, líquido o gas químicamente diferente), resultando en una solución; normalmente es el componente de una solución presente en mayor cantidad.

**EXTRACCIÓN:** es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interface.

**FERMENTACIÓN:** es un proceso que degrada moléculas para transformarlas en otras moléculas más simples, es un proceso catabólico de oxidación que tiene lugar de forma incompleta, siendo además un proceso totalmente anaeróbico.

**INÓCULO:** sustancia que se introduce en el organismo para producir o aumentar su inmunidad frente a determinada enfermedad o proceso.

**LIOFILIZADO:** es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida.

**MICROORGANISMOS:** es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el Microscopio. La ciencia que estudia a los microorganismos es la Microbiología. «Micro» del griego (diminuto, pequeño) y «bio» del griego (vida) seres vivos diminutos. Son organismos dotados de individualidad que presentan, a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental. En su mayoría son

unicelulares, aunque en algunos casos se trate de organismos cenóticos compuestos por células multinucleadas, o incluso multicelulares.

**POLIMERIZAR:** es una reacción química en la que los monómeros, que son pequeñas moléculas con unidades estructurales repetitivas, se unen para formar una larga molécula en forma de cadena, un polímero.

**POLÍMERO:** se definen como macromoléculas compuestas por una o varias unidades químicas (monómeros) que se repiten a lo largo de toda una cadena.

**PROTEÍNAS:** se trata de un biopolímero compuesto por aminoácidos que aparecen encadenados. Estos aminoácidos, a su vez, se forman por enlaces peptídicos.

**SIMBIOSIS:** es la asociación por parte de dos o más individuos de especies diferentes con el fin de recibir provecho mutuo para todos ellos.

**SÍNTESIS:** es el proceso por el cual se producen compuestos químicos a partir de simples o precursores químicos. La síntesis química hace lo opuesto al análisis, es decir, construye compuestos químicos a partir de los precursores que lo constituyen.

## RESUMEN

El presente trabajo determina la polimerización de ácido láctico producido de la fermentación del suero de quesería, el cual es realizado con los microorganismos *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*. Con el reporte realizado en el trabajo de grado titulado “Evaluación de la separación de ácido láctico obtenido a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticas” se determina la separación del ácido láctico por una extracción líquido-líquido y el solvente que reportó la mejor separación en dicho trabajo fue éter dietílico, por lo cual es usado en este trabajo de grado.

La primera etapa consistió en la activación de la cepa microbiana, la cual fue comprada a modo de liofilizado y en el cual estaban presentes *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium* por lo que se realizaron purificaciones de las cepas, en donde se utilizó el *Lactobacillus delbrueckii* y el *Streptococcus thermophilus* para la síntesis de ácido láctico a partir del suero, puesto que estos microorganismos son utilizados comúnmente en la elaboración del yogurt y del queso, estos microorganismos son homofermentativos. La fermentación se realizó con dos tipos de sustratos: suero desproteínizado y suero sin desproteínizar con el fin de observar el efecto que tiene en la producción de ácido láctico, arrojando valores de 9.81g/L y 11.0475g/L respectivamente. La separación se realizó por el método de extracción líquido-líquido con el uso de éter dietílico donde los porcentajes de recuperación fueron: 78.9% para suero desproteínizado y 79.1% para el suero sin desproteínizar, para demostrar la presencia de ácido láctico se realizó una prueba de espectroscopia infrarroja la cual demostró en el espectro los grupos funcionales correspondientes

La polimerización es realizada por el método ROP (apertura abierta del anillo) con la síntesis de un diéster de ácido láctico denominado lactida, en presencia de metanol y cloruro de estaño II como catalizador, a una temperatura de 60°C. Además se determinó y caracterizó dicho polímero por el método de espectroscopia infrarroja y difracción de rayos x, dando lugar en el espectro a los grupos funcionales del PLA, y en el difractograma el pico característico a la cristalinidad del PLA.

Este trabajo se lleva a cabo en el Nodo Bogotá Tecnoparque del Sena, con la colaboración de la empresa Quesos del Vecchio quien proporcionaba el suero como sustrato.

**Palabras clave:** Ácido poliláctico, ácido láctico, polimerización, fermentación, extracción líquido-líquido y bacterias ácido lácticas.

## INTRODUCCIÓN

En la industria quesera el queso es elaborado por la acidificación de la leche, lo que produce la precipitación de proteínas conocidas como caseína, lo que se denomina cuajada. En este proceso se obtiene un subproducto denominado suero, el cual contiene otras proteínas como lactoalbumina, lactoferrina y lactoglobulina, adicionalmente tiene lactosa, grasa y minerales como calcio y hierro que se encuentran presente en la leche.

El suero es contaminante debido a su alta demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO)<sup>1</sup>, en la actualidad se han hecho estudios e investigaciones debido a sus múltiples compuestos y a su facilidad de transformación en otro producto útil, esto con el fin de obtener un mayor provecho a los beneficios que este puede brindar. La elaboración de ácido láctico actualmente se ha incrementado por sus múltiples usos en la industria cosmética, química, alimenticia como sales y ésteres. En la industria alimenticia se usa como acidulante y conservante. Las industrias químicas lo utilizan como solubilizante y como agente controlador de pH. En la producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como solvente biodegradable. En la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico (PLA), un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y la medicina; debido a la escases, a las regulaciones ambientales ha hecho esto que se desarrollen alternativas para materiales más compatibles con el medio ambiente e independientes de los de los combustibles fósiles, es por esto que los bioplásticos como el PLA se ajusten a satisfacer estas necesidades en la industria, es por eso que la demanda de elaborar más de estos biopolímeros ha aumentado con el paso del tiempo fomentando una nueva industria a nivel mundial. El PLA en Colombia se ha venido trabajando por el grupo Phoenix el cual en el año 2009 facturo \$175.318 millones mensuales en la producción de plásticos biodegradables, de los cuales el más importante es el PLA el cual es elaborado a partir de maíz<sup>2</sup>.

En el presente trabajo de grado se propone y se desarrolla una alternativa de reutilización del suero para la síntesis de ácido poliláctico (PLA), con el uso de bacterias ácido lácticas como son *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*, por lo que se realiza una fermentación, este es separado mediante una extracción líquido-líquido y se determinan la cantidad de ácido láctico como

---

<sup>1</sup> FLORES P. Abad. BAUTISTA C. Mario. EGUIZQUIZA Ch. Rosa. De la TORRE. Mayra. Desarrollo de bioprocesos para la reducción de los niveles de DBO y DQO de efluentes de la industria alimentaria. En: Revista Per. Quim. Universidad de San Marcos e Instituto Politécnico Nacional de México. [en línea]. N. ° 1. Vol. 11. 2008. p. 3-10.

<sup>2</sup> GREEN. En la era Biodegradable. En: DINERO. [en línea]. (24 de noviembre de 2009). Disponible en: <<http://www.dinero.com/green/seccion-patrocinios/articulo/en-biodegradable/85081>>. [Citado el 8 de marzo de 2016]

monómero precursor en la síntesis del ácido poliláctico para su posterior polimerización.

El suero utilizado es proporcionado por la empresa Quesos del Vecchio la cual tiene una alta producción de quesos, el suero generado en su producción está entre 15000 a 16000 litros diarios de suero<sup>3</sup>, se producen 10 toneladas de queso ricota, el resto es un subproducto que tiene un alto impacto ambiental, por lo tanto la empresa está en la tarea de eliminar estos problemas que genera vendiendo este subproducto a una empresa que lo tratara para posteriormente poderlo eliminar. Al no realizarse estos procedimientos a este subproducto, este no puede ser eliminado en los vertederos y por ende acarrea multas y sanciones a la empresa.

Este suero, en el trabajo, se somete a un tratamiento de desproteínización y se deja sin desproteínizar con el fin de observar el efecto que tiene en la producción de ácido láctico y en conjunto con la fermentación microbiana demostrar la unión de los microorganismos en su crecimiento microbiano y en la síntesis.

---

<sup>3</sup> EMPRESA Quesos del Vecchio [En línea]. Revisado el 11 de agosto de 2016. Disponible en: <<http://www.quesosdelvecchio.com/>>

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la obtención de ácido poliláctico a partir del suero de quesería a nivel laboratorio.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Definir los parámetros para la obtención del ácido láctico a partir del suero de quesería.
2. Obtener el ácido láctico por medio de una fermentación en la experimentación.
3. Determinar el proceso de separación del ácido poliláctico de la fermentación.
4. Realizar la polimerización del ácido poliláctico a partir del ácido láctico purificado.

## 1. GENERALIDADES

Se presenta a continuación los conceptos y características de los componentes lácteos hasta la obtención del suero lácteo después de la elaboración del queso demostrando la importancia de los microorganismos lácticos para la realización del trabajo de grado

### 1.1 LECHE

Se conoce como leche al resultado de la secreción de la glándula mamaria de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría y es muy nutritivo. Es un líquido de composición compleja, es de color blanco y opaco, sabor dulce tiene carácter iónico debido a su pH cercano a la neutralidad<sup>4</sup>.

La leche es considerada emulsión ya que tiene gotas de grasa en agua y también un coloide porque tiene partículas llamadas proteínas que están en suspensión en el agua. Su composición varía con respecto al origen de esta, ya que depende no solo del tipo de animal sino de la raza de este, pero en promedio los rangos de la composición de la leche se especifican en la **Tabla 1**.

**Tabla 1** Composición de la leche.

<b>Constituyente principal</b>	<b>Límites de variación</b>	<b>Valor medio</b>
Agua	85,5-89,5	87,5
Sólidos totales	10,5-14,5	13,0
Grasa	2,5-6,0	3,9
Proteínas	2,9-5,0	3,4
Lactosa	3,6-5,5	4,8
Minerales	0,6-0,9	0,8

**Fuente:** Manual de industria láctica de Tetrapak

•**Grasa:** la grasa en la leche está presente como glóbulos que están compuestos por triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides y vitaminas. Tiene una membrana que está conformada por fosfolípidos, lipoproteínas, agua ligada y entre otros componentes y en su interior triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos, esteroides, carotenoides y vitaminas.

•**Proteínas:** las proteínas de la leche son caseína y seroproteínas, de las cuales la caseína se caracteriza porque son 3 que son las alfa, beta y kappa; ellas se

<sup>4</sup> ALAIS, Charles. GODINA. L. Antonio. CIENCIA DE LA LECHE. Barcelona ESPAÑA. Editorial REVERTE. 2003. p. 419 ISBN 84-291-1815-2.

encuentran en forma de micelas en presencia de calcio, las seroproteínas están compuestas de lactoalbumina, lactoglobulina e inmunoglobulinas.

•**Lactosa:** denominada el azúcar de la leche, está compuesta por galactosa y glucosa, está presente como una solución molecular.

•**Minerales:** los minerales están presentes como sales minerales disueltas los más importantes son el calcio, magnesio, potasio y sodio, se encuentran como fosfatos, cloruros, caseinatos y citratos.

Como se mencionó anteriormente la composición cambia con respecto al tipo de animal. Los animales herbívoros fueron domesticados desde hace 6000 años por la humanidad debido a que eran menos peligrosos, se prefiere que sean rumiantes porque comen rápidamente en grandes cantidades y pueden rumiar, es decir masticar por segunda vez la comida. En la **Tabla 2** se presenta la composición de la leche con respecto a varios animales productores de leche:

**Tabla 2** Composición de la leche procedente de diferentes especies animales

Especie	Proteína total %	Caseína %	Seroproteínas %	Grasa %	Carbohidratos %	Cenizas %
Humana	1.2	0.5	0.7	3.8	7.0	0.2
Caballo	2.2	1.3	0.9	1.7	6.2	0.5
Vaca	3.5	2.8	0.7	3.7	4.8	0.7
Búfalo	4.0	3.5	0.5	7.5	4.8	0.7
Cabra	3.6	2.7	0.9	4.1	4.7	0.8
Oveja	5.8	4.9	0.9	7.9	4.5	0.8

**Fuente:** Manual de industria láctea de Tetrapak

## 1.2 QUESO

El queso es un concentrado lácteo, este está hecho a partir de proteínas y grasa principalmente caseína, es un producto sólido, duro o semiduro, madurado o fresco que se obtiene por coagulación de la leche al ser agregado un agente externo que puede ser un microorganismo, sustancia química u otro agente llamado cuajo, este tiene una enzima llamada quimosina, la cual permite romper enlaces de la caseína y esta precipita, formando así la cuajada que mediante procesos de moldeado y prensado forman el queso. Industrialmente se conocen tres tipos de queso.

- **Queso curado o madurado:** este queso no se puede consumir una vez se ha terminado su fabricación debe estar sometido a tratamientos térmicos durante un determinado tiempo para que este obtenga sus cambios físicos y químicos.
- **Queso madurado o curado con mohos:** este queso se somete a cambios bioquímicos a partir de mohos que pueden estar en el interior o en el exterior.



- **Queso no madurado, no curado o fresco:** este queso se puede consumir una vez se ha terminado su fabricación.<sup>5</sup>

Se muestra a continuación la clasificación de los tipos de queso en la **Tabla 3**:

**Tabla 3.** Clasificación de los quesos

Si la HBNG es, %	Término I La primera fase en la designación debe ser	Si la GMS** es, %	Término II La segunda fase en la designación debe ser	Termino III Designación acorde con las características principales de curado
<41 49-56 54-63 61-69 >67	Extra duro Duro Semiduro Semiblando Blando	>60 45-60 25-45 20-25 <10	Muy graso Graso Graso medio Bajo en grasa Sin grasa	Curado o madurado Sobre todo en superficie Sobre todo en el interior Curado con mohos o madurado Sobre todo en superficie Sobre todo en el interior No curado o no madurado

**Fuente:** Manual de industria láctica de Tetrapak.

**1.2.1 Caseína.** Son un grupo de proteínas denominadas proteínas de la leche y están en suspensión coloidal en la leche debido a que forma grupos ionizables con polos hidrófobos e hidrófilos formando polímeros que se organizan en estructuras llamada micelas que pueden llegar a medir 0,4 micras, estas micelas de caseína están formadas por subgrupos de caseína que son  $\alpha$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína; estos están unidos formando submicelas que tienen de entre 10 a 15 nm que se organizaran para formar micelas. Que en presencia de calcio o fosforo permite dar insolubilidad por que se presentan como sales en la  $\alpha$ -caseína y  $\beta$ -caseína en agua y la  $\kappa$ -caseína posee sales que si son solubles en agua debido a que se ubican en la parte superficial de las micelas.

<sup>5</sup> TETRAPAK. Capítulo 14: El queso. Manual de Industria Láctea, Traducido por: LOPÉZ G. Antonio, A. MADREID VICENTE EDICIONES. 1996. Madrid España. p. 287-336.

Las micelas poseen fosfato cálcico que ayudan a las interacciones hidrófobas entre las submicelas que ayudan a mejorar la estabilidad de las micelas de caseína, el tamaño de la caseína depende en gran parte de la cantidad de ( $\text{Ca}^{++}$ ), una micela puede estar conformada por entre 400 a 500 submicelas.

La producción de queso por presencia del cuajo se ve afectada la  $\kappa$ -caseína que se rompe y la parte hidrofílica se separa perdiendo la solubilidad la micela donde empezara a formar una densa cuajada<sup>6</sup>.

### 1.3 SUERO

El suero es un subproducto residual que está presente en la transformación de la leche en queso, también se le denomina lactosuero, y este surge de la precipitación de la caseína la cual es un aglomerado de ese tipo de proteína que son liposolubles y producen el queso, se estima que para elaborar un 1 kilogramo de queso se necesita 10 litros de leche que producen 9 litros de suero como subproducto. El lacto suero tiene una gran cantidad de proteínas hidrosolubles presentes en agua denominadas seroproteínas las cuales son lactoalbumina, lactoglobulina, inmonoglobulina, glicomacropéptidos, lactoferrina y lactoperoxidasa; además también están presentes lactosa, vitaminas y minerales que están disueltos en agua<sup>7</sup>.

Antiguamente el suero era considerado un desecho e incluso se consideraba contaminante pero debido a la cantidad de componentes que posee en especial a su contenido proteico, este es muy nutritivo y se utiliza actualmente en nuevos procesos ya sea para realizar yogur o para la producción de prebióticos. Se ha encontrado en la actualidad muchos beneficios con respecto a la salud que ofrece el suero ya que este puede brindar beneficios en la nutrición infantil y para ancianos, pero no solo beneficia la nutrición sino que es considerado un alimento dinámico debido a que ayuda a regular la motilidad intestinal.

El suero es un líquido amarillo verdoso, es turbio, tiene un sabor fresco, un poco dulce que presenta acidez, tiene una viscosidad cercana a la del agua es 1,14 centipoise y una densidad de 1,025 g/ml<sup>8</sup>. El suero representa cerca del 80 a 90%

---

<sup>6</sup>TETRAPAK. Capítulo 2: Química de la leche. Manual de Industria Láctea. Traducido por: LOPÉZ G. Antonio, A. MADREID VICENTE EDICIONES. 1996. Madrid España. p. 13-36.

<sup>7</sup> PERLTA BARBARA. Michelle S, PALMA BARRIONUEVO, Kevin C. Estudio preliminar de la fermentación de suero lácteo empleando microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. p. 75. Trabajo de grado (Ingeniero de Alimentos). Guayaquil Ecuador. Escuela Superior del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y ciencia de la producción. Disponible en un catálogo en línea Centro de información Bibliotecario. <<http://www.cib.espol.edu.ec/>>

<sup>8</sup> PERLTA BARBARA. Michelle S, PALMA BARRIONUEVO, Kevin C. Estudio preliminar de la fermentación de suero lácteo empleando microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. p. 75. Trabajo de grado (Ingeniero de Alimentos). Guayaquil Ecuador. Escuela Superior

volumen total de la leche que está presente en el proceso, contiene el 50% de nutrientes de la leche antes de ser procesada<sup>9</sup>, se muestra en la **Tabla 4** la composición del suero proveniente del proceso de queso y de la producción de caseína que es un tipo de cuajada.

**Tabla 4.** Composición aproximada del lactosuero

Constituyente	Suero de queso	Suero de caseína
	%	%
Sólido totales	6.4	6.5
Agua	93.6	93.5
Grasa	0.05	0.04
Proteína	0.55	0.55
NNP	0.18	0.18
Lactosa	4.8	4.9
	0.5	0.8
Cenizas (Sales minerales)		
Calcio	0.043	0.12
Fosforo	0.040	0.065
Sodio	0.050	0.050
Potasio	0.16	0.16
Cloruro	0.11	0.11
Ácido láctico	0.05	0.4

**Fuente:** Manual de industria láctica de Tetrapack.

Se clasifica en dos tipos que son lactosuero ácido y lactosuero dulce y esto se debe a los métodos de coagulación de la leche para la producción de quesos:

- **Lactosuero ácido:** se obtiene por la acidificación de la leche mediante un agente ya sea químico o bacteriano que baja el pH de la leche a 4,5 y este se encuentra en el punto isoeléctrico donde las cargas se igualan y la presencia del calcio en las micelas formadas por la caseína es tomado por el ácido láctico formando lactato cálcico, esto da como resultado que el agua que se encuentra en la micela salga permitiendo que se forme una densa cuajada.
- **Lactosuero dulce:** se obtiene en presencia de una acción enzimática que se le adiciona a la leche, esta acción enzimática se le denomina cuajo el cual posee la enzima llamada renina (también denominada quimosina) la cual es una proteasa que lo que hace es romper la cadena de la  $\kappa$ -caseína que tiene 169 aminoácidos en el cual los aminoácidos 105 (fenilamina) y 106 (metionina) se rompen y la

del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y ciencia de la producción. Disponible en un catálogo en línea Centro de información Bibliotecario. <<http://www.cib.espol.edu.ec/>>

<sup>9</sup>TETRAPAK. Capítulo 15: Procesado del lactosuero. Manual de Industria Láctea. Traducido por: LOPÉZ G. Antonio. A. MADREID VICENTE EDICIONES. 1996. Madrid España. p. 331-354

cadena queda dividida en una parte hidrofóbica desde la cadena de aminoácidos 1 a la 105 a esto le conoce como para- $\kappa$ -caseína y debido a su poca solubilidad se aglomera con la caseína  $\alpha$  y  $\beta$  formando la cuajada y de la 106 a la 169 es la parte hidrofílica que ira hacer parte del suero a esto se le conoce como glicomacropéptido. A este proceso también se le debe adicionar un corte de la cuajada para permitir que esta precipite, condiciones de temperatura de entre (15 a 50 °C) y un pH ligeramente ácido (5,9 a 6,6) en este tipo de suero queda más concentración de lactosa<sup>10</sup>.

Anualmente se producen 190 millones de toneladas de suero por año proveniente de la producción de queso (94%) y caseína (6%) con un crecimiento anual del 2 por ciento, actualmente, el 70 por ciento se industrializa, especialmente en países desarrollados, y un 30 por ciento se emplea en la alimentación animal, como fertilizante o como residuo<sup>11</sup>.

#### 1.4 BACTERIAS ACIDO LACTICAS (BAL).

Las bacterias ácido lácticas son bacterias que realizan fermentación y acidificación en la leche para diferentes productos como el yogurt, el queso, kumis, entre otros. Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser Gram positivas, no esporuladas, anaerobias facultativas y producen ácido láctico a partir de azúcares. Generalmente son bacilos y cocos, producen como único y principal fermento ácido láctico cuando son homofermentativos (en algunos casos son heterofermentativos producen ácido láctico o lactato con etanol y CO<sub>2</sub>); la energía que obtienen es exclusivamente mediante fosforilación a nivel de sustrato donde prefieren lactosa<sup>12</sup>. Se presenta a continuación las principales diferencias entre los principales géneros de bacterias lácticas ver **Cuadro 1**.

**Cuadro 1** Diferencias entre los principales géneros de bacterias lácticas

Formas y organización celulares	Género
<b>Cocos en cadena o tétradas</b>	
Homofermentativos	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Pediococcus</i>
Heterofermentativos	<i>Leuconostoc</i>

<sup>10</sup> TETRPAK. Capítulo 2: Química de la leche. Manual de Industria Láctea. Traducido por: LOPÉZ G. Antonio, A. MADREID VICENTE EDICIONES. 1996. Madrid España. p. 13-36.

<sup>11</sup> TETRPAK. Suero lácteo, clave en la innovación de alimentos. En: Finanzas. Revista Portafolio virtual [en línea]. (3 de agosto de 2014). Disponible en: <<http://www.portafolio.co/economia/suero-lacteo-clave-la-innovacion-alimentos>>. [Citado el 8 de marzo de 2016]

<sup>12</sup> MADIGAN. Michel. T. Capítulo 5: Microbiología Aplicada. Brock Biología De Los Microorganismos. Madrid España. Editorial Person. 12ª Edición. 2009. p. 493-496 ISBN 9788478290970

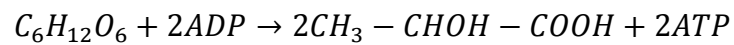
**Cuadro 1.** (Continuación)

<b>Bacilos típicamente en cadenas</b>	
Homofermentativos	<i>Lactobacillus</i>
Heterofermentativos	<i>Lactobacillus</i>

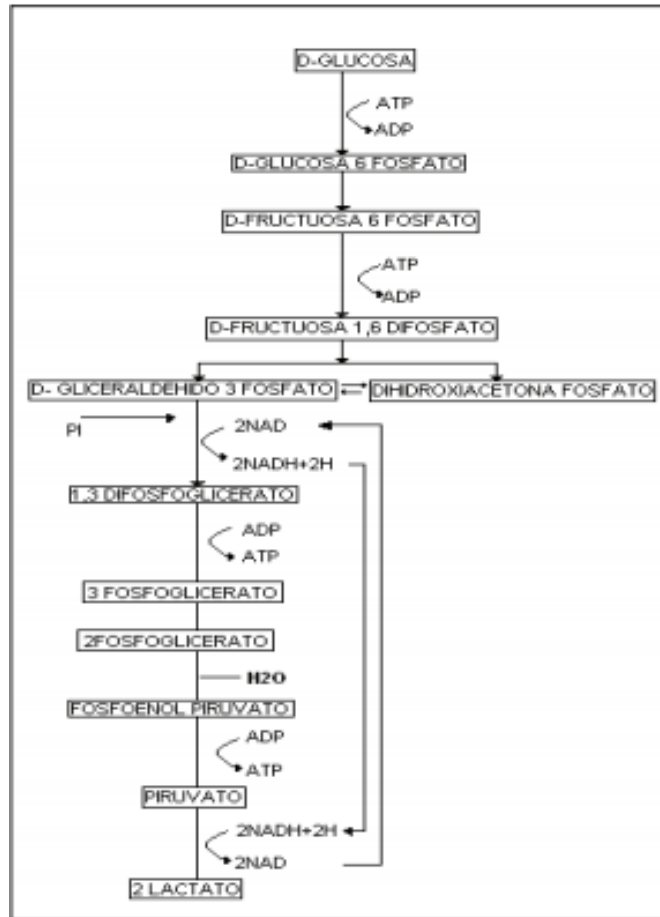
**Fuente:** Biología de los microorganismos

Como se puede ver en la **Figura 1** se encuentra la vía metabólica homofermentativa la cual se diferencia de la de la heterofermentativa porque tiene presencia de la enzima aldolasa muy importante en el proceso de glucólisis y produce dos moléculas de lactato y dos moléculas de ATP por cada mol de glucosa fermentada figura 1. Además se presenta a continuación la ecuación estequiométrica de la reacción de la fermentación.

**Ecuación 1.** Reacción estequiométrica de bacterias homofermentativas



**Figura 1** Vía metabólica fermentación hemolítica



**Fuente:** Artículo Bacterias Acido lácticas: papel fundamental en los alimentos.

Este proceso es muy similar al proceso de fermentación alcohólica la diferencia está en que en la fermentación alcohólica, la carboxilasa descarboxilasa el ácido pirúvico y en la fermentación láctica la enzima deshidrogenasa actúa sobre el ácido pirúvico<sup>13</sup>. Se presenta a continuación la vía metabólica heterofermentativa que se ve en la **Figura 2** en la cual presenta la producción de lactato y etanol ya que las bacterias producen por una mol de glucosa una mol de lactato, una mol de etanol y una mol de CO<sub>2</sub>, además genera una mol de ATP, se evidencia que la vía heterofermentativa contiene una enzima fosfoacetolasa la cual metaboliza los azúcares y carece de enzimas aldolasas y hexosa isomerasa. Las bacterias

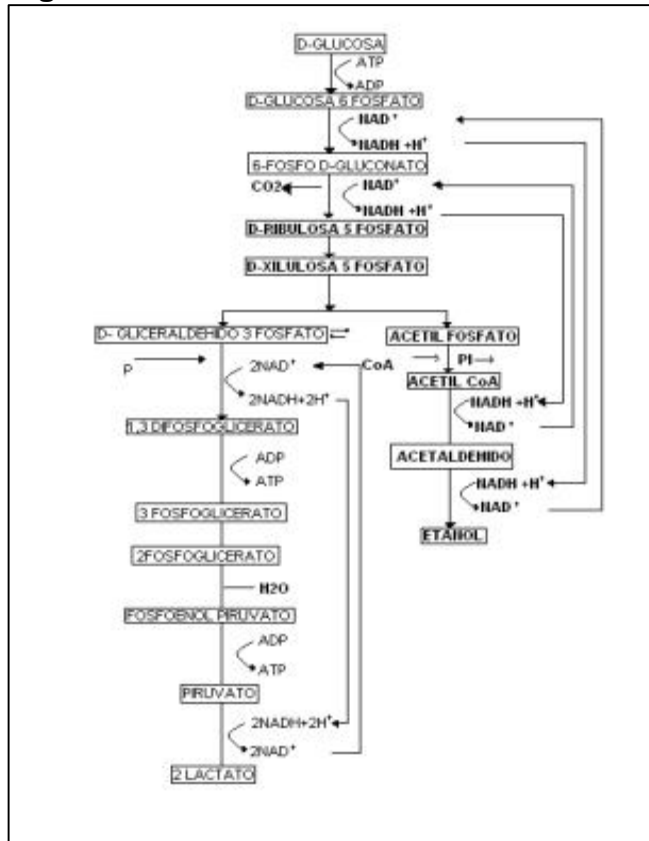
<sup>13</sup>JORGENSEN. Alfred, Capítulo 8: Bacterias Acido Lácticas. Microbiología de las fermentaciones. Editorial Acibia. Barcelona España. 1959 p. 426

heterofermentativas realizan la ruta glicolítica Embden-Meyerhoff<sup>14</sup>. Se presenta a continuación la ecuación estequiometría que ocurre en la fermentación.

**Ecuación 2.** Reacción estequiométrica de la fermentación heterofermentativa



**Figura 2.** Ruta metabólica heterofermentativa



**Fuente:** Artículo Bacterias Acido lácticas: papel fundamental en los alimentos.

<sup>14</sup> PARRA H. Ricardo. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. En: Revista Scielo. Facultad de Ciencias Agropecuarias [en línea]. No 1. Vol 8.( Enero-Junio de 2010). Disponible en: <<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>>. [Citado el 10 de marzo de 2016]

**1.4.1 Lactococos.** En el género de cocos se encuentran los Streptococcus es decir se presentan en tétradas, estos son homofermentativos, son Gram positivos, juegan un papel importante en la producción de ácido láctico y en la elaboración de algunos quesos y en la elaboración del yogurt, algunas especies del genero Streptococcus pueden crecer a temperaturas de entre 3°C a 10°C se observa y rige a los Streptococcus generalmente usados en la leche y en la crema su temperatura optima es de 30°C<sup>15</sup>.

**1.4.2 Lactobacilos.** Los Lactobacillus presentan forma bacilar, estos pueden ser alargados y esbeltos o cortos y curvados, la gran mayoría de las especies pueden ser homofermentativos, son habitualmente utilizados en los productos derivados de la leche y en leches fermentadas, son resistentes a pH bajos de alrededor de 4<sup>16</sup>, a diferencia de los Streptococcus acidifican la leche en menor tiempo pero al finalizar producen una mayor acidificación ya que poseen una mayor resistencia a concentraciones altas del ácido, pueden ser termófilos con un crecimiento a una temperatura optima de 45°C y pueden ser mesófilos con temperatura optima de 30°C estos son muy usados en la maduración de quesos<sup>17</sup>.

## 1.5 ÁCIDO LÁCTICO

**1.5.1 Definición y características.** El ácido láctico es un compuesto orgánico versátil usado comúnmente en la industria química, también es conocido como el ácido 2-hidroxipropanoico descubierto por Carl Wilhelm Scheele, quien lo aisló e identificó como principal ácido de la leche agria en 1780<sup>18</sup>, es el hidroxiaácido más sencillo que existe, contiene un átomo de carbono asimétrico. Hay dos isómeros ópticos que están presentes en el metabolismos de los organismos vivos, estos isómeros son el D(-) láctico y L(+) láctico y una modificación racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-) véase **Figura 3**.

---

<sup>15</sup>JORGENSEN. Alfred, Capítulo 8: Bacterias Acido Lácticas. Microbiología de las fermentaciones. Editorial Acribia. Barcelona España. 1959. P. 431-432

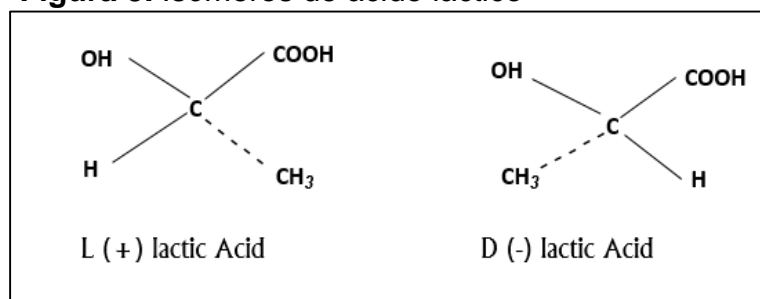
<sup>16</sup>MADIGAN. Michel. T. Capítulo 16: Dominio Bacteria. Brock Biología De Los Microorganismos. Madrid España. Editorial Prentice Hall. 8ª Edición. 1998. P. 495-496

<sup>17</sup>FRANCO. NIVIA. Javier. Andrés. Diseño conceptual de una planta de producción ácido láctico. Capítulo 2. Bogotá 2005. 91h. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad de América. p. 20.

<sup>18</sup>PRESCROTT Samuel Cate. Capítulo 8: Producción De Ácido Láctico Por Fermentación. Microbiología Industrial. Madrid España. Editorial Aguilar. 1962. p. 324-325



**Figura 3.** Isómeros de ácido láctico



**Fuente:** Artículo Producción biotecnológica ácido láctico. Biopolímeros. Escuela de Ingenierías Industriales – Uva. Recuperado de: <[http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/monica/acido\\_lactico\\_archivos/image002.jp](http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/monica/acido_lactico_archivos/image002.jp)>

Los dos isómeros y la forma racémica se encuentran en estado líquido, son incoloros y solubles en agua, es difícil obtenerlo en estado anhídrido<sup>19</sup>. A continuación se muestran propiedades físico-químicas del ácido láctico véase **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico

<b>Fórmula</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
<b>Peso molecular</b>	90,08 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	L(+) y D(-): 52,8°C a 54°C DL (según composición): 16,8°C a 33°C
<b>Punto de ebullición</b>	125-140°C
<b>Viscosidad</b>	40,33 mNsm <sup>-2</sup>
<b>Densidad</b>	1,249 g/MI
<b>Índice de refracción</b>	1,4414

**Fuente:** Artículo Producción biotecnológica ácido láctico. Biopolímeros. Escuela de Ingenierías Industriales – Uva. Recuperado de: <<http://goo.gl/QKTYHT>>

**1.5.2 Usos y obtención.** El ácido láctico actualmente tiene múltiples usos a nivel industrial desde alimenticia, farmacéutica, cosmética y médica; sus aplicaciones van desde acidulante en productos alimenticios, como en curtientes, también se utiliza purgante en forma de lactato de calcio o lactato de magnesio, como removedor de sales de calcio, además se utiliza para la elaboración de algunos plásticos.

<sup>19</sup> SERNA COCK. L. RODRIGUEZ. DE STOUVENEL. A. Producción biotecnológica de ácido láctico estado del arte. En: Revista científica ciencia y tecnología alimentaria [en línea]. No 1. Vol. 5. (28 de marzo de 2005). p. 54-65. ISSN 1135-8122. Disponible en: <<http://goo.gl/EaamVz>> [Citado el 10 de marzo de 2016]

El ácido láctico puede ser producido por fermentación dependiendo de las bacterias utilizadas y puede producir los diferentes tipos de isómeros o en su forma racémica dependiendo de la bacteria, el pH al que esté trabajando y la concentración del sustrato que se le suministre.

El ácido láctico se puede obtener de dos formas por vía química o vía biotecnológica. La obtención por vía química esta da por una reacción de agregación del acetaldehído al cianuro de hidrogeno produciendo lactonitrilo, y este es purificado y obtenido por destilación, luego se adiciona ácido clorhídrico (HCl) para hidrolizar produciendo sal de amonio y ácido láctico. El ácido láctico obtenido se esterifica con metanol para producir el lactato metílico, luego se recupera y se purifica en una destilación, luego es hidrolizado con agua y un catalizador acido para producir del ácido láctico puro y metanol que es recirculado<sup>20</sup>.

La producción biotecnológica se realiza dependiendo del sustrato y de las bacterias usadas ya que pueden ser homofermentativas o heterofermentativas siguiendo una vía metabólica de descomposición de un carbohidrato (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). Generalmente utilizan como materia prima almidón y CaOH<sub>2</sub> con el fin de neutralizar el ácido y el pH alrededor de 5 o 6 esto produce lactato cálcico que se filtra y se somete a un adsorción con carbón activado, luego se evapora y acidifica con ácido sulfúrico para obtener ácido láctico y sulfato de calcio, el cual se filtra pues es insoluble y el ácido láctico obtenido se hace pasar por unas sucesivas etapas de hidrolisis, esterificación, destilación y una última hidrolisis<sup>21</sup>.

## 1.6 ACIDO POLILÁCTICO

**1.6.1 Definición y características.** Desde el año de 1845 el PLA se ha venido estudiando y realizando investigaciones a lo largo de la producción de este, Pelouze condensó ácido láctico por medio de una destilación con agua para formar PLA de poco peso molecular y un dímero cíclico del ácido láctico llamado lactida. En el año 1894, Bischoff y Walden intentaron sin éxito la producción de PLA a partir de la lactida (Diester de ácido láctico).

El descubrimiento del ácido poliláctico (PLA) empezó en 1932 por el científico de Dupont llamado Wallace Carothers quien realizo un producto de bajo peso molecular al calentar ácido láctico al vacío, en 1954 se patento el proceso.

---

<sup>20</sup> Artículo Producción Biotecnológica Ácido Láctico. Biopolímeros. Escuela De Ingenierías Industriales – Uva. Síntesis química [En línea]. Disponible en: < <http://goo.gl/9L2oIY> > [Citado el 12 de marzo de 2016]

<sup>21</sup> Artículo Producción Biotecnológica Ácido Láctico. Biopolímeros. Escuela De Ingenierías Industriales – Uva. Fermentación [En línea]. Disponible en : < <http://goo.gl/s5v8rg> > [Citado el 12 de marzo de 2016]

El ácido poliláctico PLA es un poliéster biodegradable, termoresistente, termoestable, es obtenido mediante recursos renovables como el maíz, la remolacha, el trigo y otros productos ricos en almidón<sup>22</sup>. Sus ventajas sobre plásticos derivados del petróleo se deben a sus propiedades las cuales se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6** Propiedades Físicas del Ácido Poliláctico

<b>Formula</b>	$(C_3H_4O_2)_n$
<b>Peso molecular (Kda)</b>	50 -750
<b>Punto de fusión (°C)</b>	178
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1.25
<b>Viscosidad (cps)</b>	0.61-8.2
<b>% Cristalinidad</b>	15 -74
<b>Fuerza de tensión (Mpa)</b>	40 - 60
<b>Módulo de tensión (Gpa)</b>	3 - 4
<b>Temperatura Max. Usada (°C)</b>	50 - 125
<b>Tg temperatura de transición vítrea</b>	60 - 65

**Fuente:** Artículo Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones de L. Serna C y colaboradores Et. Al. Año 2003

Las aplicaciones tradicionales de polímeros sintéticos se basan principalmente en su inercia a degradaciones ambientales (hidrólisis, oxidación, la biodegradación, y así sucesivamente). El rápido aumento en el volumen de uso de polímeros sintéticos ha contribuido a problemas de gestión de residuos sólidos en los últimos años. La gestión total de residuos de polímeros requiere combinaciones complementarias de reciclaje, la incineración para la energía, y la biodegradación. Los polímeros preparados a partir de recursos renovables y sostenibles se pueden diseñar con facilidad, sintetizado, y dirigido por rutas compatibles con el medio ambiente y pueden ser eliminados después de su uso por biodegradación (compostaje, etc.). Los polímeros biodegradables son necesarias en el diseño, síntesis y aplicaciones de implantes biomédicos y sistemas de liberación de fármacos. Entre aquellos recibido una atención creciente desde 1970 son poliésteres alifáticos tales como polihidroxibutirato microbiano (PHB), y sus copolímeros y ácido poliláctico (PLA), y sus copolímeros.

El PHB es el material de almacenamiento de energía para ciertas bacterias y los esfuerzos para comercializarlo y su copolímeros como materiales estructurales y de

<sup>22</sup> Artículo Ácido Poliláctico PLA. Biopolímeros. Escuela de Ingenierías Industriales- Uva. [En línea]. Disponible en: <<http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/alberto/pla.htm>> [Citado el 12 de Agosto de 2016].

paquetes no han tenido éxito debido a su alto costo, y la dificultad en el procesamiento térmico. El PLA de la polimerización de ácido láctico es un producto de fermentación de polisacáridos de bajo costo, es un producto que se produce a partir de una combinación de biotecnología y tecnología química. El PLA y sus copolímeros están sujetos a esta revisión. Ha habido muchas revisiones publicadas recientemente, especialmente relacionados en las áreas de aplicación biomédica.

**1.6.2 Usos y obtención.** La polimerización térmica de deshidratación de ácido láctico produce ácido poliláctico. Esto requiere mucha energía y produce un PLA de bajo peso molecular. Para la obtención de un PLA de alto peso molecular ha surgido un método llamado polimerización por apertura del anillo (ROP por sus siglas en inglés) donde se realiza la polimerización del dímero láctida utilizando un adecuado catalizador donde se produce PLA de alto peso molecular con múltiples aplicaciones.

Estos pueden proceder a través de la coordinación, aniónicos, o mecanismos catiónicos. Entre los catalizadores eficaces / iniciadores son ácidos de Lewis en forma de sales de metales de aluminio, estaño, titanio y zinc, y metales de tierras raras; alcóxidos de metal alcalino y complejos de supermoleculares.

El método ROP es la ruta más eficaz para la polimerización en masa de lactida<sup>23</sup>. Es generalmente aceptado por los investigadores que los iones de metales de transición como el estaño catalizan la polimerización y proceda a través de un mecanismo de inserción. A temperaturas superiores de 150 °C la transesterificación entre lactida cíclico y PLA procede a través de la escisión de acilo y los resultados en alto grado de retención de la estereoquímica de los monómeros de lactida. Catalizadores de estaño son fácilmente disponibles y eficaces. Pueden ser utilizados para los productores a gran escala de PLA. Los cloruros de estaño (II) y el 2-etilhexanoato de estaño están aprobados para los aditivos alimentarios y por lo tanto se utiliza con mayor frecuencia que los demás<sup>24</sup>.

La polimerización de ácido láctico con sales de estaño como catalizadores puede llevarse a cabo en varios pasos. El ácido láctico se calienta a 150 °C con catalizador de estaño para obtener unos oligómeros de PLA. Los oligómeros se calientan a 180 °C bajo vacío (1333 Pa) durante 5 horas para dar PLA de alto peso molecular (100.000). Por último, la tercera etapa se realiza en estado sólido por encima de la

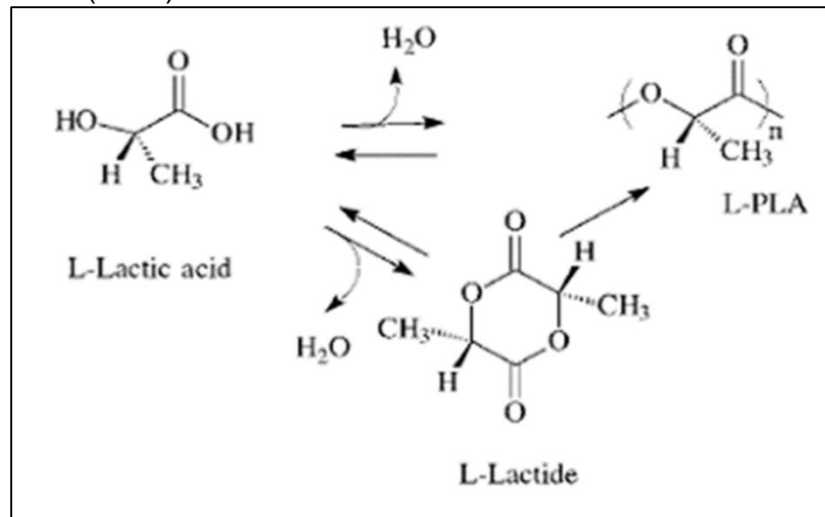
---

<sup>23</sup> BÁEZ GARCÍA, José Eduardo. Una Ruta Para Sintetizar Macromoléculas: Polimerización Por Apertura De Anillo (ROP). México, 2016. Artículo Científico. Universidad del Papaloapan (UNPA) En: Aleph-Zero Revista de Educación y Divulgación de la Ciencia, Tecnología e Innovación. [En línea]. Disponible en: <[http://www.comprendamos.org/alephzero/52/una\\_ruta\\_para\\_sintetizar\\_macromoleculas\\_polimeriz.html](http://www.comprendamos.org/alephzero/52/una_ruta_para_sintetizar_macromoleculas_polimeriz.html)> [Citado el 12 de agosto de 2016]

<sup>24</sup> Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Codex Alimentarius. Aditivos Alimentarios [En línea]. Disponible en: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/es/>>. [Citado el 13 de agosto de 2016]

temperatura de cristalización,  $T_c$ , ( $105\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $66\text{ Pa}$ ,  $0,5\text{-}2\text{ horas}$ ) a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  durante  $10\text{-}30\text{ horas}$ . Obteniendo un PLA de alto peso molecular. El PLA también puede ser obtenido por medio de condensación directa de ácido láctico con alto punto de ebullición de disolvente y el anillo de apertura de la polimerización de lactida se estudiaron y ambos se encuentran para ser eficaz y PLA de MW de  $300.000$  se obtuvo. PLA de obtenerse mediante el uso de diferentes métodos fueron comparados y se encontró que tienen diferentes propiedades. Ambos tenían la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de alrededor de  $58\text{-}59\text{ }^\circ\text{C}$ , pero el proceso directo EPL ha temperatura de fusión,  $T_m$ ,  $163\text{ }^\circ\text{C}$  y se mantuvo relativamente estable, mientras que el PLA preparado por la apertura del anillo tenía un mayor  $T_m$  de  $178\text{ }^\circ\text{C}$ , pero era menos estable. Esto se atribuyó a la presencia de catalizador y las impurezas<sup>25</sup>. Se muestra en la **Figura 4** las reacciones de polimerización por policondensación directa y por apertura del anillo

**Figura 4.** Reacción de polimerización del ácido láctico por los métodos policondensación directa y apertura abierta del anillo (ROP)



**Fuente:** Artículo Polimerización ácido láctico Biopolímeros extraído de: <http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/monica/Polimerizacion.htm>

<sup>25</sup> LENDLEIN Andreas y Sisson Adam. Handbook of biodegradable polymers: Isolation, synthesis, characterization and applications. WILEY-VCH, 2011 .p.287 – 294.

Sus principales aplicaciones son como hidrogeles estos han sido objeto de creciente interés para los productos biomédicos y de consumo aplicación. Copolímeros de bloque hidrófilo / hidrófobo PLA y PEG son especialmente prometedor para sistema soluble hidrófilo / hidrófobo que se convierte en un insoluble microesfera cuando se inyecta en el cuerpo como sistemas de liberación de fármacos. La hidrólisis y biodegradación de estos copolímeros son sujetos de la investigación en curso.

Como es generalmente cierto para los nuevos polímeros, los costos de PLA y copolímeros son relativamente alta para aplicaciones de gran volumen. Sin embargo, son a partir de recursos renovables y ambientalmente compatibles. Todos los factores que se consideran que son polímeros para el futuro. Mezcla con biopolímeros de bajo costo como almidón para reducir el costo y aumentar la biodegradación tarifas, se realizó con éxito para PCL y ésteres de celulosa, ha tenido resultados mixtos solamente como PLA y copolímeros no son lo suficientemente hidrolíticamente estables a altas temperaturas cuando la mezcla tiene que ser llevado a cabo. Acoplamiento reactivo de PLA con almidón de desgracia aumenta el costo.<sup>26</sup>

En el presente capítulo se realiza un barrido de conceptos partiendo desde la leche, donde se presenta las composiciones y lo más relevante para obtener el suero a partir de la elaboración del queso, presentado los dos tipos de suero que surgen en la elaboración del queso como son el lactosuero dulce y el lactosuero ácido.

Además se presenta las vías metabólicas con respecto a los microorganismo utilizados en la industria láctea, permitiendo dar un enfoque al trabajo de grado en la obtención de ácido láctico; se presenta las características, usos y aplicaciones en la industria sobre el ácido láctico representado la elaboración de polímeros biodegradables como son el ácido poliláctico; a este también se presenta sus características, obtención, usos y aplicaciones a nivel industrial.

---

<sup>26</sup> Ibid, p. 287 - 294

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el siguiente capítulo se muestra los reactivos, materiales y métodos que se realizaron en el trabajo de grado se explica teniendo en cuenta los objetivos propuestos con respecto al objetivo general y demostrando el cumplimiento de estos.

### 2.1 MATERIALES

**2.1.1 Suero.** El suero utilizado fue proporcionado por la empresa quesos del Vecchio ubicada en la carrera 27#6-32 de Bogotá, tiene gran producción de quesos, en los cuales tienen como subproducto suero lácteo donde se estima que diariamente se producen 15000 a 16000 litros de suero de los cuales producen 10 toneladas de suero ricota y el resto que sobra contratan una empresa para que se pueda desechar. El suero proporcionado fueron 8 litros para la experimentación y es del tipo lactosuero dulce.

**2.1.2 Bacterias ácido - lácticas.** Los microorganismos utilizados se compraron en forma de liofilizado en el centro Agrolécherero de Bogotá, se compraron como cultivo para yogurt con los microorganismos *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Bifidobacterium* estos venían en proporción de un sobre para la elaboración de 50 litros de Yogurt. Véase **Imagen 1**.


**Imagen 1.** Liofilizado cultivo para yogurt con *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *bifidobacterium*



## 2.2 EQUIPOS




En el **Cuadro 2** se muestra a continuación los equipos utilizados durante toda la experimentación.

**Cuadro 2.** Descripción de equipos utilizados.




EQUIPO	DESCRIPCION	IMAGEN
Shacker	Es una cabina incubadora que permite mantener la temperatura y agitación constante en el transcurso de la fermentación, tiene espacio para 5 frascos fermentadores de 250 ml expandibles a 500 ml y 4 compartimientos de 50 ml expandibles a 100 ml, la marca es Wisd	
Incubadora	Es una cabina que permite mantener la temperatura constante, en incubaciones de caldos fermentativos, cajas de Petri y tubos de ensayo con cultivos microbianos, la marca es Binder	






**Cuadro 2. (Continuación).**

<p>Rotaevaporador</p>	<p>Es un dispositivo que consta de un baño termostatado con un serpentín, puede controlar la presión reducida con una bomba de vacío marca Vacuumbrand; se utiliza para concentrar sustancias como el ácido láctico obtenido después de la fermentación retirando agua que condensa por el serpentín, la marca es Heidolph</p>	
<p>Centrífuga</p>	<p>Es un dispositivo que se encarga de retirar por medio de fuerza centrífuga graduando el giro a diferentes revoluciones por minuto, se utiliza para retirar proteínas del suero y para retirar microorganismos que estén después de la fermentación, la marca es Sigma.</p>	
<p>pH-metro</p>	<p>Dispositivo que permite medir el pH a lo largo de la caracterización del suero, fermentación y separación del ácido láctico la marca es SCHOTT.</p>	

**Cuadro 2. (Continuación).**

<p>Bomba de vacío</p>	<p>Elemento utilizado en el control de la presión, es utilizado en la filtración del suero para eliminar proteínas y en la filtración del caldo fermentativo para eliminar microorganismos presentes con el fin de que sean más rápidas estas filtraciones, la marca es Rocker 600.</p>	
<p>Cabina de bioseguridad</p>	<p>Es una cabina donde se realizan los procesos de manipulación de microorganismos y no haya contaminación en los procesos, se utiliza para realizar la siembra en cajas de Petri y toma de muestras en la fermentación, la marca es Esco.</p>	
<p>Filtro de membrana</p>	<p>Es un equipo en material de vidrio, consta de un vaso de 250 ml y un embudo donde se pone el filtro de membrana, se utiliza para eliminar partículas más pequeñas como proteínas presentes en el suero y microorganismo o proteínas después de la filtración, la marca es SCHOTT DURAN.</p>	

**Cuadro 2. (Continuación)**

<p>Plancha de termo agitación</p>	<p>Dispositivo que permite calentar, agitar y controlar la temperatura durante las reacciones de polimerización en el PLA, como son la elaboración de lactida y en la reacción por apertura abierta del anillo ROP, la marca es Dathan Scientific</p>	
<p>Fermentador</p>	<p>Es un frasco de capacidad de 500ml con tapa azul resistente al calor la marca es SCHOTT DURAN, soporta el choque térmico lo que permite ser utilizado para la fermentación del suero.</p>	
<p>Espectrofotómetro</p>	<p>Es un instrumento que permite medir en función de la longitud de onda la absorbancia de un haz de luz en una muestra, permitiendo comparar con un patrón o un estándar, esto dando a conocer la naturaleza de la muestra e indicar concentraciones de la muestra, es utilizado en la caracterización del suero para determinar la cantidad de proteínas presentes en este. La marca es Jenway 6329D.</p>	

**Cuadro 2. (Continuación)**

<p>Baño termostataado</p>	<p>Es un instrumento utilizado para hacer intercambios de calor con agua generalmente sumergiendo un recipiente con la muestra, este equipo es utilizado para la pasteurización del suero sin desproteínizar y para la caracterización del suero, la marca es RayPA.</p>	
<p>Vortex</p>	<p>Es un instrumento que se encarga de agitar tubos de ensayo a más de 5000 RPM con el fin de homogenizar muestras en tubos de ensayo, la marca es Velp.</p>	

**2.3 REACTIVOS**

En el **Cuadro 3** se muestran los reactivos utilizados alrededor de toda la experimentación y los usos a lo largo de este.

**Cuadro 3** Reactivos utilizados y usos

<p><b>REACTIVOS</b></p>	<p><b>USOS</b></p>
<p>Caldo de soya trípico Bacto</p>	<p>Es un polvo de soya que es diluido en agua, tiene fuentes de carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno que le permiten a los microorganismos crecer, es utilizado para activar los microorganismos del liofilizado comprado.</p>

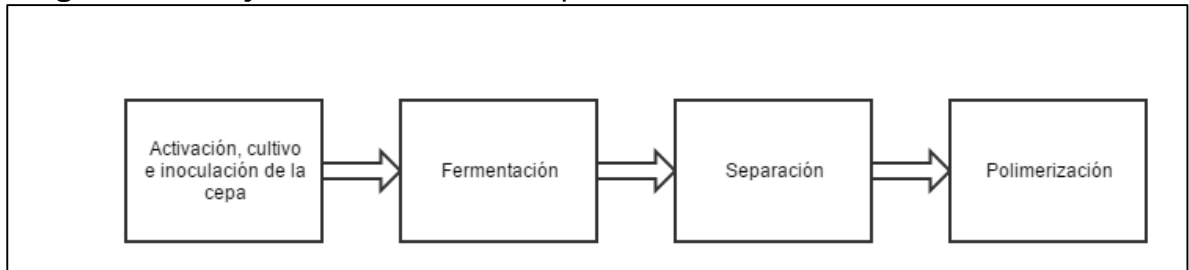
**Cuadro 3.** (Continuación).

Agar de soya Difco	Es un polvo de soya que es diluido en agua, tiene fuentes de carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno que le permiten a los microorganismos crecer, se adicionan a cajas de Petri para sembrar los microorganismos activados en el caldo de agar.
Agar peptona	Es un polvo de polipéptidos utilizado como medio de cultivo, se diluye en agua, es utilizado para la elaboración de diluciones de microorganismos durante la fermentación.
Éter dietílico	Es un solvente no polar, forma azeotropos con el agua permitiendo ser usado en la extracción de ácido láctico después de la fermentación.
Agua destilada	Es usada como diluyente en las soluciones preparadas.
Ácido sulfúrico 60% v/v	Reactivo utilizado para la elaboración de lactida y posteriormente la polimerización de PLA.
Metanol	Es utilizado para recristalizar el polímero es usado en exceso.
Cloruro de estaño	Catalizador empleado para la ruptura del anillo de la lactida y así producir PLA

## 2.4 MÉTODOS

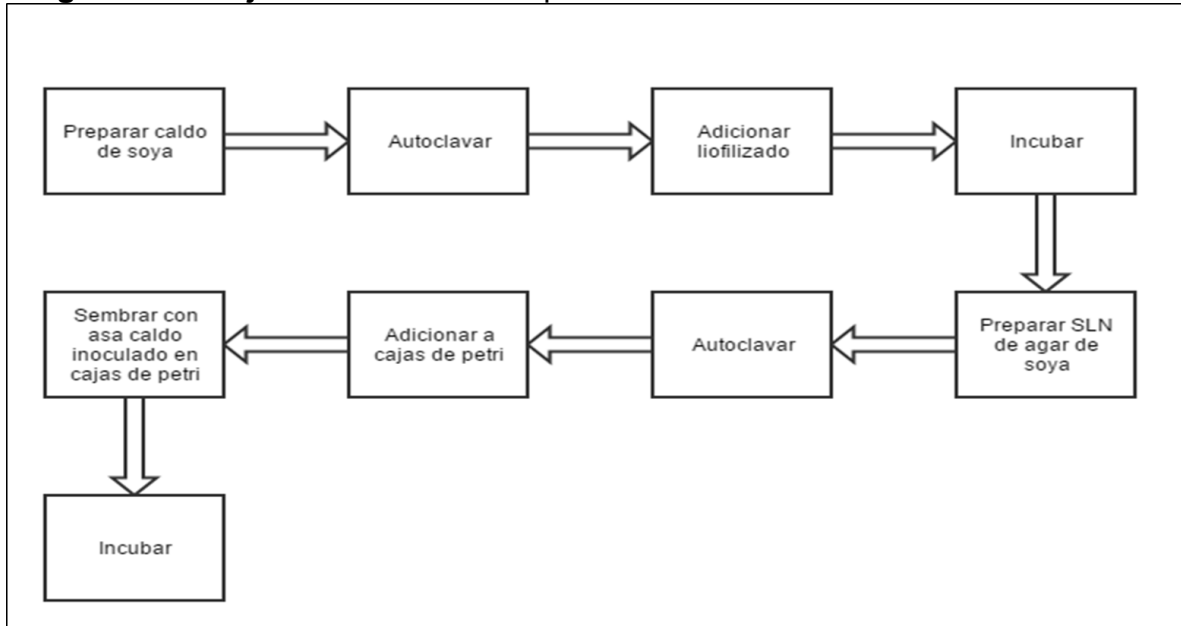
El proceso general realizado se muestra a continuación en el **Diagrama de flujo 1**.

**Diagrama de flujo 1** Síntesis de ácido poliláctico



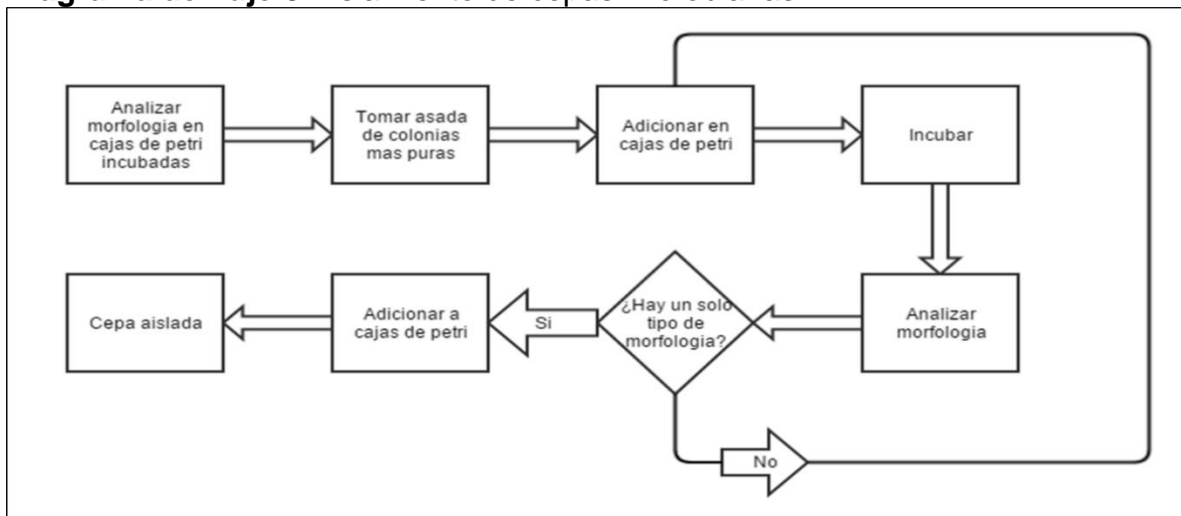
**2.4.1 Activación, cultivo e inculo microbiano.** Se presenta en el **Diagrama de flujo 2** donde se presenta la activación de la cepa microbiana.

**Diagrama de flujo 2** Activación de cepas microbianas



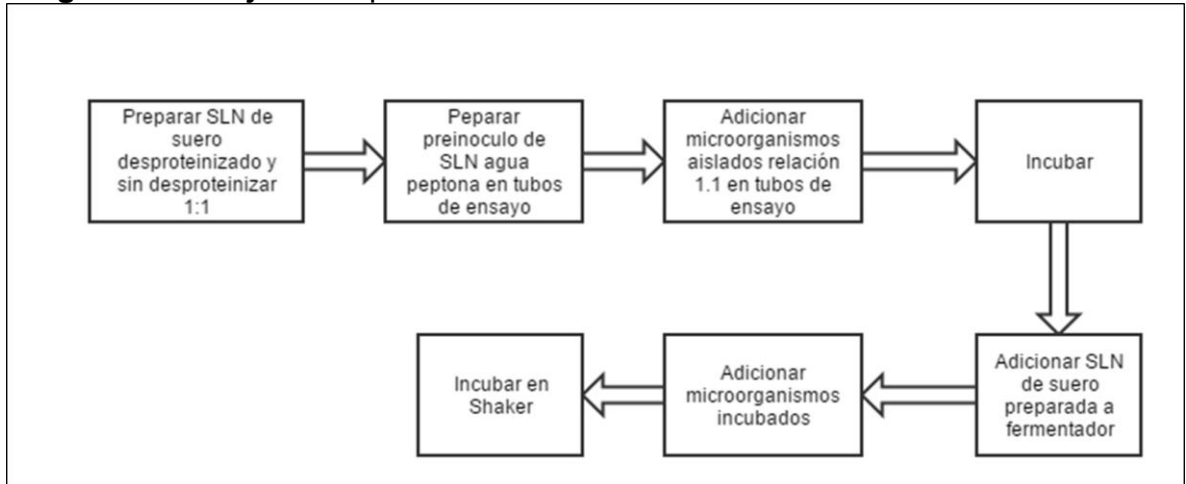
En el **Diagrama de flujo 3** se presenta el diagrama de bloques del aislamiento de las cepas.

**Diagrama de flujo 3** Aislamiento de cepas microbianas



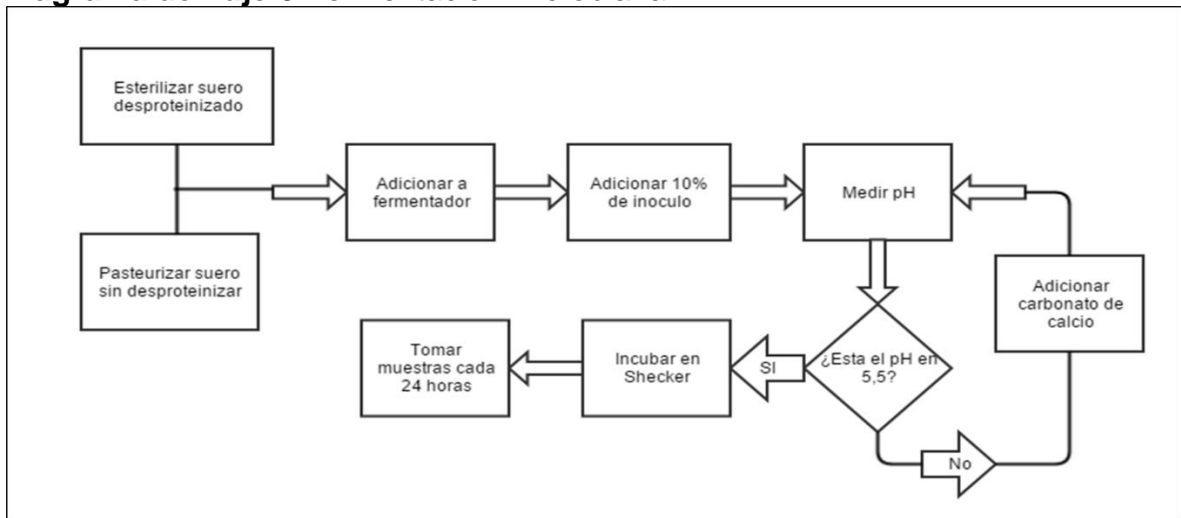
En el **Diagrama de flujo 4** se presenta el diagrama de bloques de la elaboración del inculo.

#### Diagrama de flujo 4. Preparación del inculo



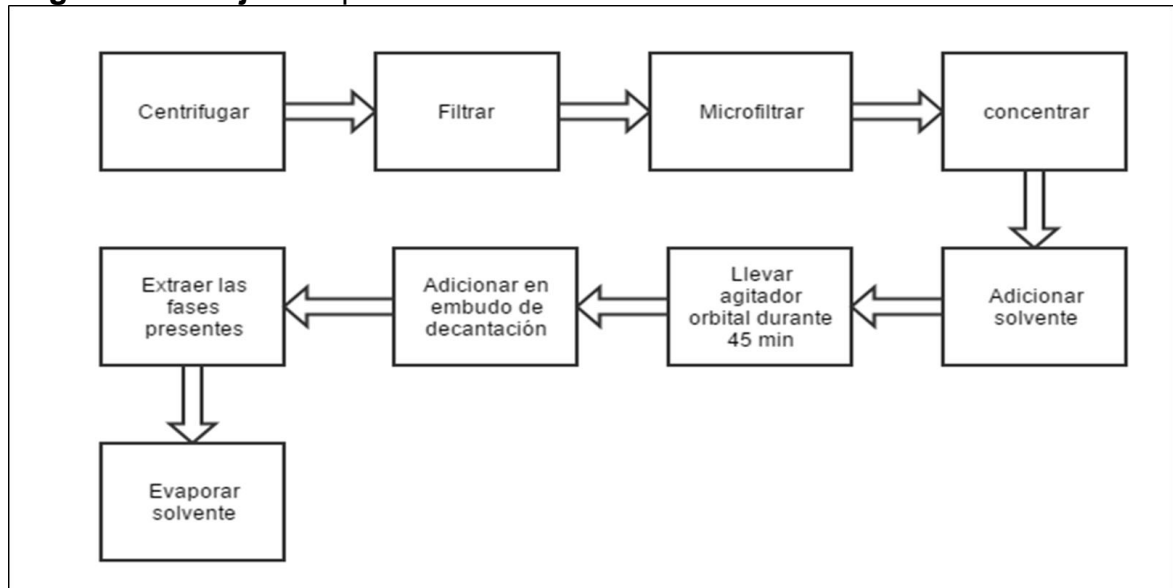
**2.4.2 Fermentación.** En el **Diagrama de flujo 5** se presenta la elaboración y el proceso llevado en la fermentación.

#### Diagrama de flujo 5 Fermentación microbiana



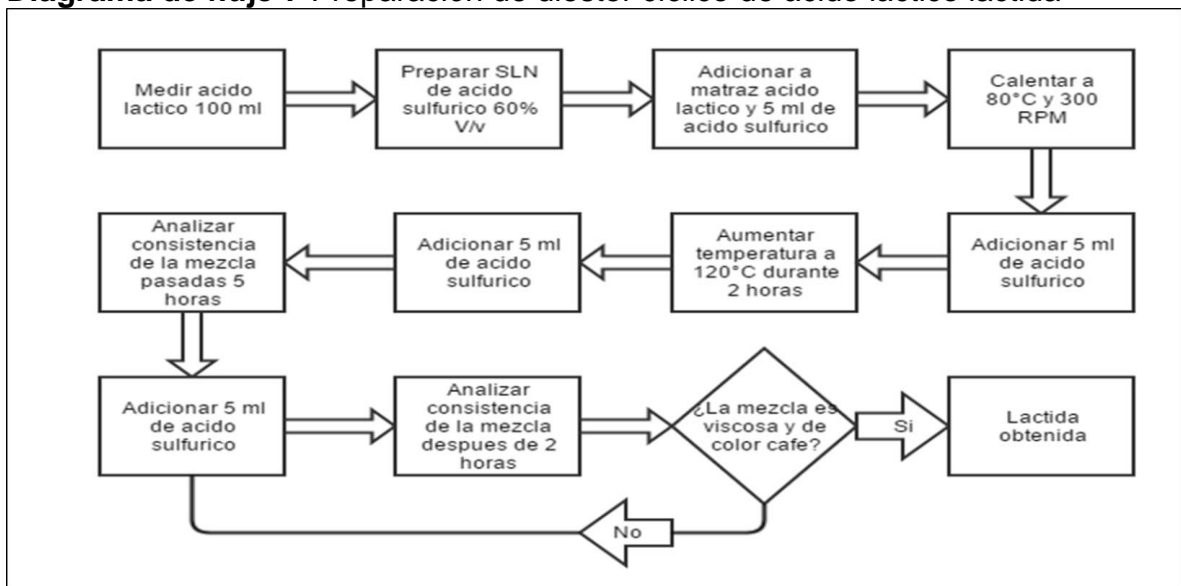
**2.4.3 Separación.** Se presenta en el **Diagrama de flujo 6** se presenta el diagrama de bloques del proceso de separación del ácido láctico del caldo fermentativo.

**Diagrama de flujo 6** Separación de ácido láctico del caldo fermentativo



**2.4.4 Polimerización.** Se presenta en el **Diagrama de flujo 7** el diagrama de bloques del proceso de elaboración de lactida.

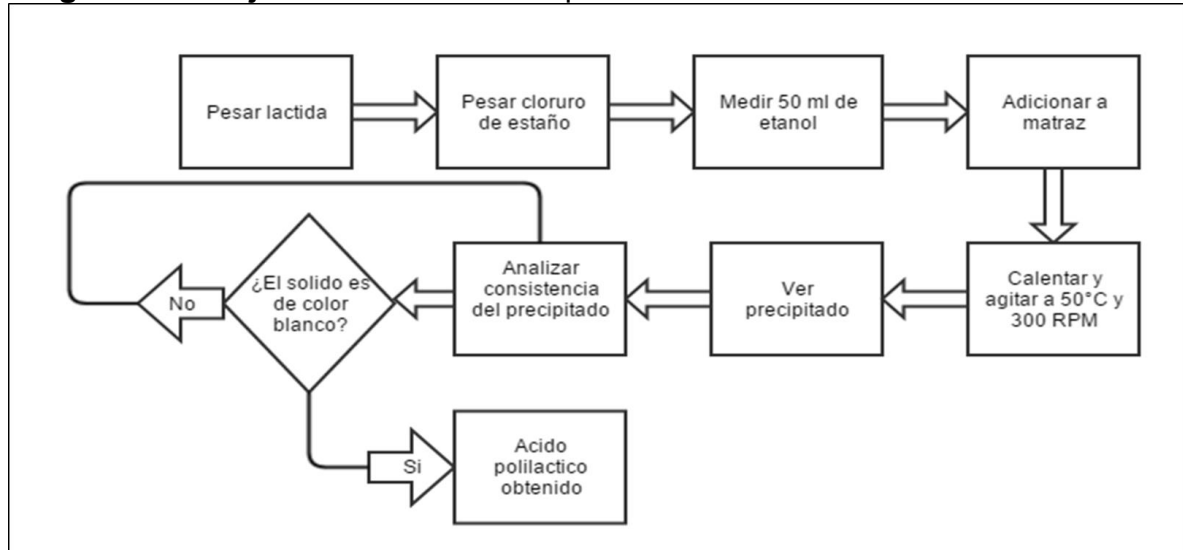
**Diagrama de flujo 7** Preparación de diéster cíclico de ácido láctico lactida





En el **Diagrama de flujo 8** se presenta el diagrama de bloques de la síntesis de ácido poliláctico.

**Diagrama de flujo 8** Síntesis de ácido poliláctico



## 2.5 CARACTERIZACIÓN

**2.5.1 Acidez titulable.** La prueba según la norma técnica colombiana NTC 4978 consiste en realizar el método de acidez titulable para leches y productos lácteos utilizando NaOH al 0.1N, se toman 10 ml de muestra en un erlenmeyer de 100 ml y se adicionan 3 gotas de fenolftaleína; en una bureta de 25 ml se adicionan 25 ml de NaOH al 0.1 N y se adicionan gota a gota hasta que aparezca un tono rosado en la muestra y se registra el volumen gastado en la titulación.

**2.5.2 Densidad.** De acuerdo a la norma AOAC 33.2.03 (925.22) que se especifica en la NTC 506 al cual se realiza para leche pasteurizada, se determina la densidad con el uso de un picnómetro de 25 ml pesado previamente, se adiciona la muestra de suero lácteo en el picnómetro de 25 ml y se pesa en una balanza analítica.

**2.5.3 pH.** La medición del pH se realiza con un pHmetro o un papel indicador que mide el potencial de hidrogeno en una solución.

**2.5.4 Método de Biuret para cuantificación de proteínas.** El método de Biuret se realiza la prueba por medio de la norma AOAC 1999 en la cual se basa en la formación de un complejo coloreado entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico.  $\text{Cu}^{2+}$  se acompleja con 4 NH. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en suero).

El método de Biuret consta en hacer pasar la muestra de proteína con el reactivo del mismo nombre el cual es sulfato cúprico con tartrato de sodio y potasio y NaOH en un espectrofotómetro realizando una curva de calibración, en la cual se utiliza albumina para poder medir la muestra problema que en este caso es suero lácteo y el método utiliza la ecuación de Lambert-Beer, que relación la concentración con respecto a la absorbancia de la luz y se mide a una longitud de onda de 540 nm.

Para esto se preparan los reactivos en balones aforados de 100 ml y 250 ml y se prepara una solución patrón de albumina de 10mg/ml y en 6 tubos de ensayo adicionar: (0,0ml de SLN Y 1ml de agua); (0,2ml de SLN y 0,8 ml de agua); (0,4ml de SLN y 0,6 ml de agua); (0,6 ml de SLN y 0,4 ml de agua); (0,8ml de SLN y 0,2 ml de agua) y (1ml de SLN y 0,0 ml de agua) respectivamente. El suero se toma 5ml de muestra y se hace pasar por una centrifuga a 5000 rpm durante 20 minutos y se guarda el sobrenadante, se toma en un tubo de ensayo 0,5ml de muestra de sobrenadante y se adiciona 0,5ml de agua y en cada tubo de ensayo se adiciona 4 ml del reactivo de Biuret.

**2.5.5 Prueba de Fehling para azúcares reductores.** Mediante la NTC 1779 se realiza el método el cual consta del reactivo del mismo nombre en donde se utilizan dos diluciones de Fehling A y Fehling B, las cuales producen el ion  $\text{Cu}^{2+}$  debido al complejo de iones tartrato en medio básico (-OH) de color azul-verdoso a  $\text{Cu}^+$  que precipita en forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$  rojo ladrillo.

Manifestando la presencia de azúcares reductores (aldolasas: glucosas, ribosa, eritrosa, etc.), ya que realiza un reacción Redox en el grupo aldehído del azúcar es oxidado a grupo ácido por el  $\text{Cu}^{2+}$  que se reduce a  $\text{Cu}^+$ .

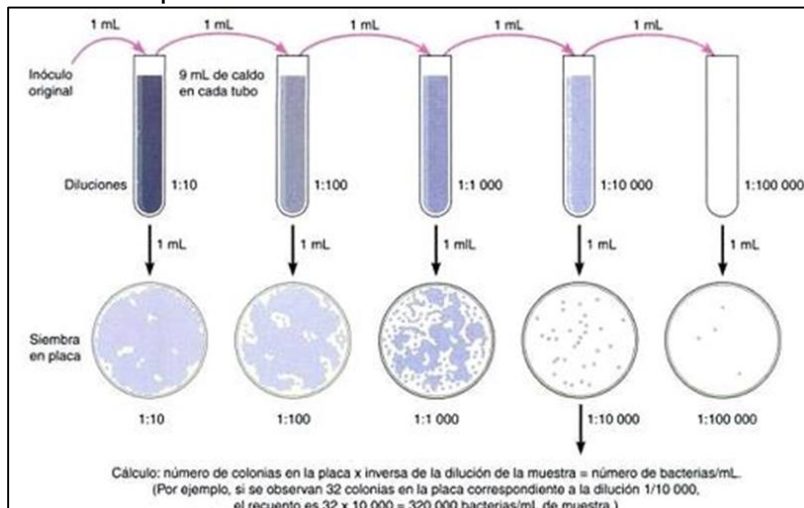
Este método utiliza dos diluciones, una que es Fehling A en donde se adiciona  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y se disuelve con agua destilada en un balón aforado de 100 ml; Fehling B donde se prepara al 15% sal de Rochelle (Tartrato de sodio y potasio) en solución acuosa al 5% de NaOH. Se toma 10ml de suero y es aforado en un balón de 100 ml y se realiza una solución de glucosa el 0,5% como patrón en un balón aforado. Se toman 5 ml de la soluciones de Fehling A y B en erlenmeyers de 100 ml y se añade 20 ml de agua destilada con 2 o 3 gotas de azul de metileno. En una bureta de 50ml se va adicionando la solución patrón de glucosa mientras la solución

de Fehling está en calentamiento y observar igualmente se realizó para el suero y se observó la coloración.

El método es utilizado para caracterizar el suero y encontrar la cantidad de lactosa presente que se va a fermentar, además es utilizado durante la fermentación para encontrar la cantidad de sustrato consumido.

**2.5.6 Método de diluciones y conteo en placa.** El método de diluciones consta de adicionar a tubos de ensayo con 9 ml de solución de agua peptona al 0.1%; se adiciona a un primer tubo de ensayo 1 ml de caldo fermentativo durante las horas de fermentación, luego realizando una dilución en serie tomando 1 ml del tubo anterior y adicionándolo a uno siguiente se procede a sembrar en cajas de Petri lo que facilita el conteo en placa encontrando el número de colonias por el factor de dilución dando UFC/ml en la **Figura 5** se ilustra el procedimiento.

**Figura 5** Procedimiento del método de diluciones para el conteo en placa



**Fuente:** Lección 18. Medidas directas del crecimiento microbiano, Universidad Nacional a distancia (UNAD), extraído de: < <http://goo.gl/XT6pWh> >

**2.5.9 Espectroscopia infrarroja.** Este método utiliza el espectro electromagnético de la parte infrarroja, donde la rotación y vibración de las moléculas tienen niveles energéticos que al ser sometidas las muestras por haces de luz infrarrojos estos excitan a los electrones de las moléculas o de los enlaces de las moléculas, si la frecuencia irradiada es igual a una de las frecuencias incluidas en las ondas componentes del rayo, hay absorción de los haces de luz. Lo que permite determinar la cantidad de energía absorbida en diferentes longitudes de onda. Cuando se escanea el espectro con un rayo monocromático, este cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, se utiliza una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez y así encontrar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual muestra a cuales longitudes de onda la muestra absorbe el IR, y permite una interpretación de qué enlaces están presentes. Este método solo funciona con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica.

Para determinar el polímero con el método se pasa una muestra del ácido poliláctico, la cual debe estar molida en una suspensión de nujol en un mortero con unas gotas de sal de bromuro de potasio (KBr) y se realiza la medición en la muestra al irradiarse con el rayo infrarrojo y demostrar los enlaces presentes y los grupos funcionales que tiene dicha molécula.

**2.5.10 Difracción de rayos X.** Es una técnica experimental para el análisis de materiales, en donde los rayos X son difractados por los electrones que rodean los átomos por ser su longitud de onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico. Al incidir el haz de rayos X, este contiene información sobre la posición y tipo de átomos encontrados en su camino. Los cristales, gracias a su estructura periódica, dispersan elásticamente los haces de rayos X en ciertas direcciones y los amplifican por interferencia constructiva, originando un patrón de difracción. Mediante detectores especiales se puede observar y medir la intensidad y posición de los rayos X difractados, y su análisis posterior por medios matemáticos permite obtener una representación a escala atómica de los átomos y moléculas del material estudiado.

Esta prueba se realiza en un difractómetro donde la muestra es puesta sobre una celda de vidrio, el cual es amorfo y permite que el haz de rayos X incida sobre la muestra. Puesto que el PLA se ha venido estudiado su cristalinidad por su periodicidad en el monómero, la difracción de rayos X permite demostrar la presencia de este.

## 2.6 DEFINICIÓN DE PARÁMETROS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para la obtención del ácido poliláctico se ha mencionado previamente que proviene del ácido láctico fermentado donde la variable experimental es el sustrato que depende del suero, por todo lo demás las variables permanecen constantes debido a que se tiene en cuenta que los microorganismos trabajados, son *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus* los cuales son termófilos. Además teniendo en cuenta los artículos “Preparación de cultivos iniciadores. Optimización del sustrato de crecimiento” del autor Rivas, Franco P. - Garro, Oscar<sup>27</sup> y “Producción de ácido láctico a partir de lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*” de se evidencia que para el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* su temperatura óptima es de entre 42°C a 45°C y para el *Streptococcus thermophilus* está en el rango de 37°C a 42°C, además el artículo presenta por qué realizan una excelente simbiosis entre los dos microorganismos ya que el *Streptococcus thermophilus* es el que permite iniciar la fermentación láctica y que se desarrolla muy intensamente hasta un pH de 5,5. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles, por ejemplo ácido fórmico, que produce crea las condiciones ideales para que se desarrolle el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Normalmente se utilizan en una relación cuantitativa de 1:1 a 1:3, aproximadamente según registra el artículo. La actividad proteolítica de los lactobacilos estimula a su vez el crecimiento y la actividad acidificante de los estreptococos. Los lactobacilos desarrollan aparte una actividad lipolítica, por lo que se liberan ácidos grasos y producen además acetaldehído, constituyéndose así en los principales productores de aroma del yogurt. También el artículo presenta la producción de ácido láctico con los microorganismos trabajando separados y en conjunto por lo que se representa la mejor producción en el trabajo conjunto de los dos microorganismos.

El suero trabajado es utilizado de dos formas las cuales son suero desproteínizado y suero sin desproteínizar, al cual se le adicionará en la fermentación los microorganismos comprados como liofilizado se propone un diseño de experimentos con estos microorganismos los cuales son *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus* trabajando en simbiosis se realizan dos replicas, se realizan 4 fermentaciones 2 con cada tipo de suero y así observara la mejor concentración de ácido láctico la cual será la variable respuesta debido al sustrato, y demostrar cual sustrato produce la mayor concentración de ácido láctico para la producción de PLA, el diseño experimental se puede hacer mediante un diseño con un solo factor con el análisis de varianza utilizando una Anova de un solo factor, se presenta a continuación en la **Cuadro 4** que existe un solo factor donde se trabaja la simbiosis de los dos microorganismos y dos niveles que son el lactosuero sin desproteínizar y el lactosuero desproteínizado.

---

<sup>27</sup> RIVAS, Franco y GARRO Oscar. Preparación de cultivos iniciadores, Optimización del sustrato de crecimiento. Trabajo de grado .Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias, 2006.

**Cuadro 4.** Diseño de experimentos

<b>Simbiosis de microorganismos</b>	Lacto suero sin desproteínizar	Lactosuero desproteínizado
	[ ] Ácido láctico R1	[ ] Ácido láctico R1
	[ ] Acido lectivo R2	[ ] Ácido láctico R2

Con el uso del trabajo de grado llamado “Evaluación de la separación de ácido láctico obtenido a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticas” elaborado por el estudiante Juan Camilo Cuellar Oviedo del grupo de investigación BIOTECFUA de la Fundación Universidad de América, donde el evaluó 3 tipos de disolventes para la separación del ácido láctico proveniente de la fermentación de residuos de piña y determinó mediante cromatografía HPLC que el mejor solvente utilizado fue el éter dietílico donde arrojó un porcentaje de pureza del 79,175% se presenta en la **Tabla 7** las especificaciones del solvente éter dietílico, por lo que se indica que para el presente trabajo de grado se utilizaría ese solvente para la separación del ácido láctico; también con ayuda del trabajo de grado llamado “Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas comosus merr.*) y banano (*musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico.” de los estudiantes “Laura Giselle Guillén Romero y Jorge Armando Vega López” de la Fundación Universidad de América, determinaron la velocidad de agitación en RPM para la fermentación las cuales fueron 150 RPM.

**Tabla 7.** Especificaciones del solvente

<b>Solvente</b>	<b>Formula química</b>	<b>Punto de ebullición (°C)</b>	<b>Constante dieléctrica</b>	<b>Densidad (g/ml)</b>	<b>Solubilidad en agua a 25°C (%wt)</b>
Éter dietílico	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O	34,6	4,3	0,714	6,04

**Fuente:** J. Cuellar O. Et Al. Año 2014.

Para la reacción de la polimerización se especificó con ayuda de la práctica de laboratorio denominada “Creación de bioplásticos a partir de ácido láctico” de los estudiantes Alejandro Villegas Escobar, Irwin Ricardo Rodríguez Castillo, Luis

Alejandro Gómez Sánchez y José Pablo Domínguez Sánchez realizada en el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey<sup>28</sup>, permite realizarse lactida con ácido láctico comercial, la lactida es un diéster de ácido láctico ciclado, en dicha práctica también se evidencia la obtención de ácido poliláctico con cloruro de estaño como catalizador.

También se tiene en cuenta el artículo llamado “Como obtener un polímero degradable en el laboratorio: síntesis de la poli (D,L-lactida) y caracterización por RMN <sup>1</sup>H” del autor Jose E. Baez<sup>29</sup>, el cual a partir de lactida mediante un catalizador de 2-etilhexanoato de estaño y una reacción de reflujo y en baño termostatado con aceite de silicón obtiene ácido poliláctico además este caracterizado por resonancia magnética nuclear.

---

<sup>28</sup> DOMINGUEZ SANCHEZ, José Pablo, GOMEZ SANCHEZ, Luis Alejandro, RODRIGUEZ CASTILLO, Irwin Ricardo. Creación de bioplásticos a partir de ácido láctico Guía de laboratorio. Trabajo de Grado. Monterrey: Universidad de Monterrey.

<sup>29</sup> Baez E, José. Como obtener un polímero degradable en el laboratorio: síntesis de la poli (D, L-lactida) y caracterización por RMN <sup>1</sup>H. En: Revista DIALNET. Bogotá, Vol. 21, pág. 170-177, N°. 2, 2010,” extraído de: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3205215>> artículo científico.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

En el presente capítulo se evidencia el trabajo realizado a nivel laboratorio hasta sintetizar el ácido poliláctico, demostrando los hallazgos en cada fase del trabajo y demostrando también el procedimiento en cada fase.

#### 3.1 ACTIVACIÓN, CULTIVO E INÓCULO MICROBIANO

Para la activación de la cepa microbiana comprada a modo de liofilizado el cual contiene *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium*, se prepara un caldo de agar de soya pesando 2.1 g y se adicionan a 70 ml de agua destilada se lleva a una autoclave para esterilizar durante 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión, luego se añaden 0,5 g de liofilizado y se adicionan a la solución esterilizada (se adicionan en una cabina de bioseguridad); se lleva a la incubadora durante 24 horas a 30°C.

Se realiza una solución de agar de soya para realizar una siembra en 8 cajas de Petri por lo que se pesa 5,2 g de agar de soya en y se adicionan a 135 ml de agua destilada, se adicionan en frascos de tapa azul de 250 ml, se estabilizan en planchas de termoagitación, luego se esterilizan en una autoclave a 121°C y 15lb de presión durante 15 minutos. Se adiciona la solución de agar en las cajas de Petri esterilizadas y se espera a que se gelifique el agar en las cajas y se llevan una nevera.

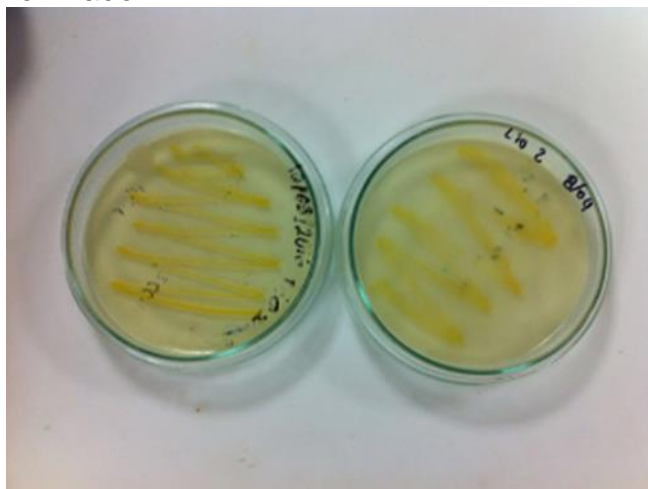
Pasadas las 24 horas de activar los microorganismos en el caldo de soya se toma una muestra con la ayuda de un asa, esta se desliza sobre las cajas de Petri preparadas, se llevan a una incubadora entre 24 a 48 horas a 30°C, se empieza a observar el crecimiento microbiano y las morfologías de las colonias.

Se analizan las morfologías presentes y se determina la diferencia entre ellas, con un segundo liofilizado y realizando el procedimiento ya descrito, se pudo determinar el comportamiento macroscópico de los microorganismos de interés, con el fin de realizar la purificación del primer liofilizado. El segundo liofilizado fue comprado en Interenzimas S.A.S.

El procedimiento de purificación se realiza, al tomar muestras con un asa de las colonias de la misma morfología más pura, esta es llevada a una nueva caja de Petri limpia, se incuba entre 24 a 48 horas a 30°C, analizando la morfología de las colonias presentes. Se repite este procedimiento hasta lograr observar una solo morfología en toda la caja de Petri. La **Imagen 2** muestra el *Streptococcus thermophilus* y la **Imagen 3** presenta el *Lactobacillus delbrueckii*, de los dos tipos de liofilizados aislados.



**Imagen 2.** Microorganismos separados *Streptococcus thermophilus* liofilizado 1 y liofilizado 2



**Imagen 3.** Microorganismos separados *Lactobacillus delbrueckii* liofilizado 1 y liofilizado 2



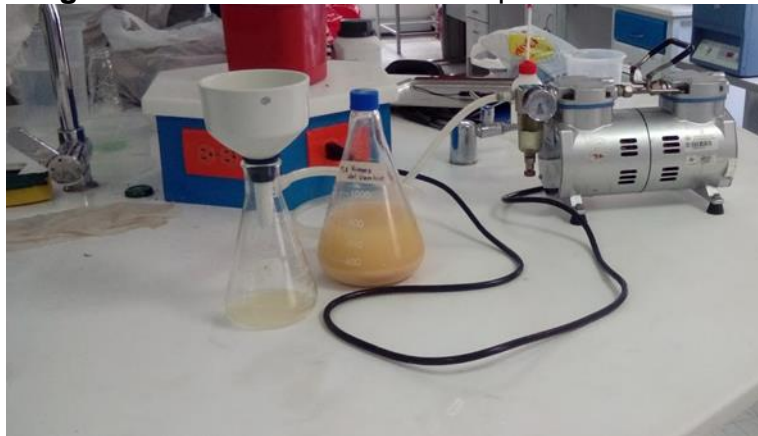
Al obtenerse las cepas aisladas se toma con una asa el microorganismos se adicionan a un tubo de ensayo con 10 ml de suero desproteinizado estéril se lleva a una incubadora durante 24 horas a 30°C se observa que el liofilizado 1 crece muy bien en el suero al pasar una asa en una caja de Petri con agar y previamente esterilizada el segundo no crece por lo que se realiza el inculo con el liofilizado 1 este se prepara el 10% del volumen total de la fermentación en un frasco de tapa azul de 250 ml, se adiciona 100 ml de suero desproteinizado y 100 ml de suero sin desproteinar se esteriliza en una autoclave a 121°C Y 15 lb de presión durante 15 minutos, posteriormente en la cabina de bioseguridad se toma un mililitro del tubo de ensayo incubado con los microorganismos y se adicionan a la solución de la

mezcla de sueros se lleva a un shacker durante 24 horas a 150 rpm y 42°C, el inóculo es realizado con el fin de adaptar el microorganismos y tener una concentración inicial de microorganismos en la fermentación se realiza antes de iniciar la fermentación tomando 1 ml y realizando una dilución del suero inoculado con microorganismos con el método de dilución y conteo en placa para encontrar la concentración inicial de microorganismos.

### 3.2 FERMENTACIÓN

La fermentación se realiza con el suero desproteínizado y para desproteínizarlo se parte del punto de que las proteínas en el suero a temperaturas mayores de 70°C se desnaturalizan, así que se lleva 1 litro en un erlenmeyer de tapa azul a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos se encuentra que el suero al meterse al autoclave toma un color anaranjado; luego se realiza una filtración con un embudo de porcelana, papel filtro y una bomba de vacío como se muestra en la **Imagen 4**.

**Imagen 4.** Filtración de suero desproteínizado



Se debe esterilizar en la autoclave una vez filtrado el suero desproteínizado a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min, luego se adiciona en 450 ml de suero desproteínizado en un frasco de tapa azul de 500 ml y se adiciona 50 ml de inóculo (se realiza una réplica de la experimentación).

El suero sin desproteínizar se debe pasteurizar ya que no se deben desnaturalizar las proteínas, se realiza un choque térmico al suero, se toma 1 L de suero y este se hace pasar por un baño termostático a 65°C y luego se pasa a una cubeta con hielo que esta 4°C. Al igual que en el suero desproteínizado se adiciona en un frasco de 500 ml de tapa azul 450 ml de suero y 50 ml de inóculo (se realiza una réplica de la experimentación).

Los frascos son llevados a un shecker a 42°C, 150 RPM y a un pH de 5,5 durante 72 horas, cada 24 horas se toman muestras de un mililitro de cada frasco de tapa azul de 500 ml, véase **Imagen 5**.

**Imagen 5.** Fermentación microbiana en shacker



Se prepara en 7 tubos de tubos de ensayo de 10 ml, se realizan el método de diluciones para conteo en placa de las muestras tomadas para sembrar en cajas de Petri, Se adiciona en un primer tubo 1 ml de la muestra extraída del frasco de tapa azul de 500 ml que se encuentra fermentando, se agita en un vortex para homogenizar la muestra, se toma un mililitro del tubo homogenizado y se añade a un nuevo tubo de ensayo con solución de agua peptona se agita de nuevo en un vortex y se repite el procedimiento en los 5 tubos de ensayo restantes; se toma del último tubo donde se hizo la última dilución 50 µl con una micropipeta y se añade a una caja de Petri con agar de soja gelificado y se esparce por toda la caja se lleva a una incubadora por 24 horas, pasadas las 24 horas de las cajas estar en incubación se procede a hacer el conteo de unidades formadoras de colonia. Se repite el procedimiento cada 24 horas con los dos tipos de suero, las diluciones realizadas son de  $10^6$ , el procedimiento anterior en el trabajo. Este se realizó en la cabina de bioseguridad.

Se puede evidenciar el crecimiento de las colonias en las cajas de Petri como se muestra en la y en la **Imagen 7**. La fermentación se paró a las 96 horas y se puede ver en la **Tabla 8** se puede ver el resultado de los conteos realizados durante la fermentación, la muestra inicial del primer conteo se realizó por el método de dilución para conteo en placa al inculo.

**Imagen 6.** Conteo en cajas de Petri primera replica suero sin desproteinizar pasadas las 48 horas de fermentación.



**Imagen 7.** Conteo en cajas de Petri primera replica suero desproteinizado pasadas las 48 horas de fermentación.



**Tabla 8.** Conteo de colonias durante la fermentación

Horas	UFC R1S	UFC R2S	UFC R1C	UFC R2C
0	5	6	15	17
24	5	7	37	115
48	115	127	276	295
72	311	322	352	387
96	312	324	352	390

Además durante la fermentación se realizaron la prueba de Fehling para azúcares reductores para determinar el consumo de lactosa en los dos tipos de suero y a las réplicas tomando de cada fermentador en un erlenmeyer de 100 ml, 30 ml de muestra y realizando las mediciones cada 24 horas en la **Tabla 9**, se puede ver los mililitros gastados en cada titulación para los dos tipos de suero con sus respectivas réplicas y ver el consumo de sustrato de los microorganismos.

**Tabla 9.** Mililitros de suero gastados en prueba de Fehling para azúcares reductores

Horas	ml R1S	ml R2S	ml R1C	ml R2C
0	11	11	12.8	12.8
24	12.9	12.5	18.6	17
48	18	17.4	23	23.9
72	27.5	27.2	34.6	35.2
96	27.6	27.4	35	35.3

Al finaliza la fermentación se realiza la prueba de acidez titulable con el fin encontrar la cantidad de ácido láctico producido y poder encontrar el rendimiento, en la **Tabla 10** se muestran los mililitros gastados de NaOH en la titulación.

**Tabla 10.** Titulación con NaOH al iniciar y finalizar la fermentación

R1S ml NaOH	R2S ml NaOH	R1C ml NaOH	R2C ml NaOH
2.79	2.79	2.79	2.79
11.07	10.75	11.7	12.85

### 3.3 SEPARACIÓN

Terminada la fermentación se procede a realizar la separación donde se tiene en cuenta el proceso de extracción líquido-líquido<sup>30</sup>.

Primero se realiza la centrifugación en tubos falcón de 50 ml para centrifuga, se añade a la misma cantidad adicionar el caldo de fermentación, y se adicionan en la centrifuga durante 20 min a 5000 RPM se realiza con los dos tipos de suero fermentado y con sus respectivas replicas, este procedimiento se vuelve a hacer para obtener una mejor remoción de los sólidos del caldo fermentativo.

Una vez terminada la centrifugación, el sobrenadante obtenido se pasa por dos filtraciones, la primera por medio de un papel filtro Watman 42 con la ayuda de un embudo de porcelana y un Erlenmeyer de 500 ml con desprendimiento lateral para poder generar un vacío conectándolo a la bomba y hacer más rápida la filtración con el líquido obtenido por la filtración se realiza una micro filtración en membrana de un poro de 1.2 micras al vacío

Luego de terminar la filtración la solución es llevada al rotaevaporador y se realiza la concentración de ácido láctico, se adicionan 150 ml de cada suero filtrado y las réplicas, esta concentración se debe hacer a presión reducida y no elevar a la temperatura de ebullición del agua porque a esta temperatura el ácido láctico presente cambios en su estructura como la producción de oligómeros esta concentración se hace a 40°C y 72 mbar de presión a una velocidad de rotación de 95 rpm véase

Después de realizar la concentración del ácido láctico se procede a realizar la extracción del ácido láctico utilizando un embudo de decantación de 500 ml, donde se adicionan 100 ml de muestra y 100 ml de solvente (éter dietílico), observar hasta que se diferencien las dos fases véase **Imagen 8**.

---

<sup>30</sup>Juan Camilo Cuellar, Fundación Universidad de América, año 2014, Trabajo de grado "Evaluación de la separación del ácido láctico obtenido a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticas".



**Imagen 8.** Extracción líquido-líquido en embudos de decantación



En frascos con tapa azul se separan las dos fases obtenidas la más clara y transparente es llevada al rotaevaporador a presión atmosférica y a una temperatura de 40°C para evaporar el éter dietílico y concentrar y purificar el ácido láctico.

### **3.4 POLIMERIZACIÓN**

El ácido poliláctico es obtenido mediante una polimerización del ácido láctico por el método de apertura abierta del anillo (ROP), dónde se realiza una esterificación para producir un diéster del ácido láctico en el cual el ácido láctico obtenido se debe esterificar a partir de una reacción con ácido sulfúrico a 60% v/v de pureza, se toman en un balón de 250ml se adicionan 100ml de ácido láctico y 5 ml de ácido sulfúrico y en una plancha de calentamiento con agitación magnética se lleva a cabo la reacción primero a 80°C durante 35 min y se sube a 120°C durante 2 horas y se adicionan 5 ml más de ácido sulfúrico y se espera alrededor de 7 horas a 8 horas y se agregan 5 ml más de ácido sulfúrico y pasadas alrededor de 9 horas se obtiene el diéster de ácido láctico llamado lactida véase **Imagen 9**.

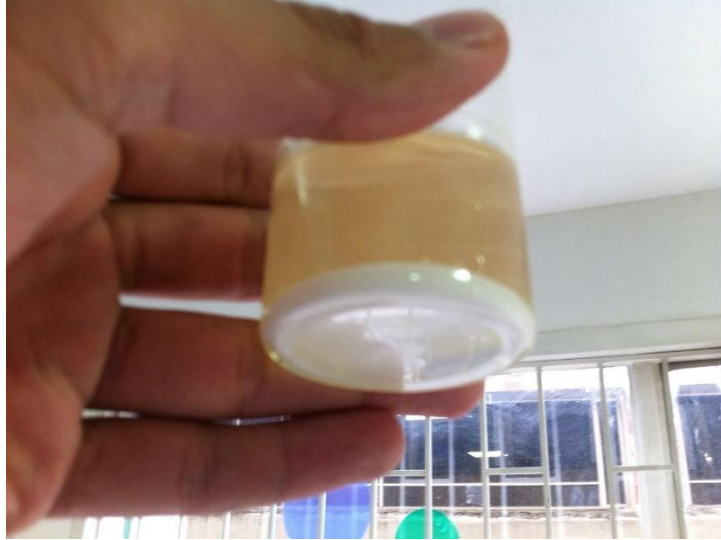
**Imagen 9.** Obtención de lactida



Una vez obtenida el diéster de ácido láctico llamado lactida se lleva a cabo la reacción de polimerización por apertura abierta del anillo (ROP) la cual consiste en una reacción catalítica donde se adicionan 5,01 g de lactida obtenida, se añaden 50ml de metanol y 3g de cloruro de estaño II, esta reacción ocurre transcurridas 24 horas a 60°C. Ver **Imagen 10**.



**Imagen 10** Polímero Obtenido



El proceso para secar el polímero consta de evaporar y retirar el metanol a 70°C, adicionar acetona y filtrar con ayuda de una bomba de vacío y un papel filtro Watman 42. Luego el polvo que esta sobre el filtro es llevado a un desecador para terminar de secar completamente el polímero, véase **Imagen 11**.

**Imagen 11** Polímero Seco



## 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 FERMENTACIÓN Y CRECIMIENTO MICROBIANO

En la fermentación se realizó el método de diluciones para conteo en placa con el fin de observar el crecimiento microbiano de la simbiosis propuesta entre los microorganismos *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*. Se realizó la comparación del comportamiento del crecimiento en dos sustratos que son suero desproteínizado y suero sin desproteínizar en la **Tabla 11** se muestra los resultados obtenidos en el conteo en placa por los factores de dilución cada 24 horas. El número inicial de colonias se sembró el inóculo y se realizó hasta una dilución de  $10^4$  e igualmente se realizó para la siembra de 24 horas, se realizaron diluciones de  $10^5$  en la siembra de 48 horas y posteriormente a las de 72 y 96 horas se realizaron diluciones de  $10^6$  para poder realizar el conteo, la concentración bacteriana reportada por Peralta Michelle y Palma Kevin año 2014 es de 7750000 UFC/ml este valor fue obtenido a las 48 horas y realizado por el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii*, a comparación con lo obtenido en el presente proyecto se puede observar que el valor a ese tiempo es menor realizando un promedio de los dos tipos de sustrato, véase **Tabla 12**, esto puede darse puesto que las dos bacterias se tardan en adaptarse al medio. En la **Grafica 1** se puede observar la tendencia en las dos curvas donde es similar pero una es de mayor crecimiento que la otra, para este caso la fermentación realizada del suero sin desproteínizar tiene un mayor crecimiento en biomasa con respecto al desproteínizado esto puede estar influenciado a la presencia de proteínas del suero, las cuales brindan una fuente de nitrógeno necesario como nutriente para el crecimiento microbiano. **Grafica 1** Se puede evidenciar un periodo de latencia en el crecimiento microbiano durante la fermentación.

**Tabla 11.** Tabla de resultados de conteo microbiano

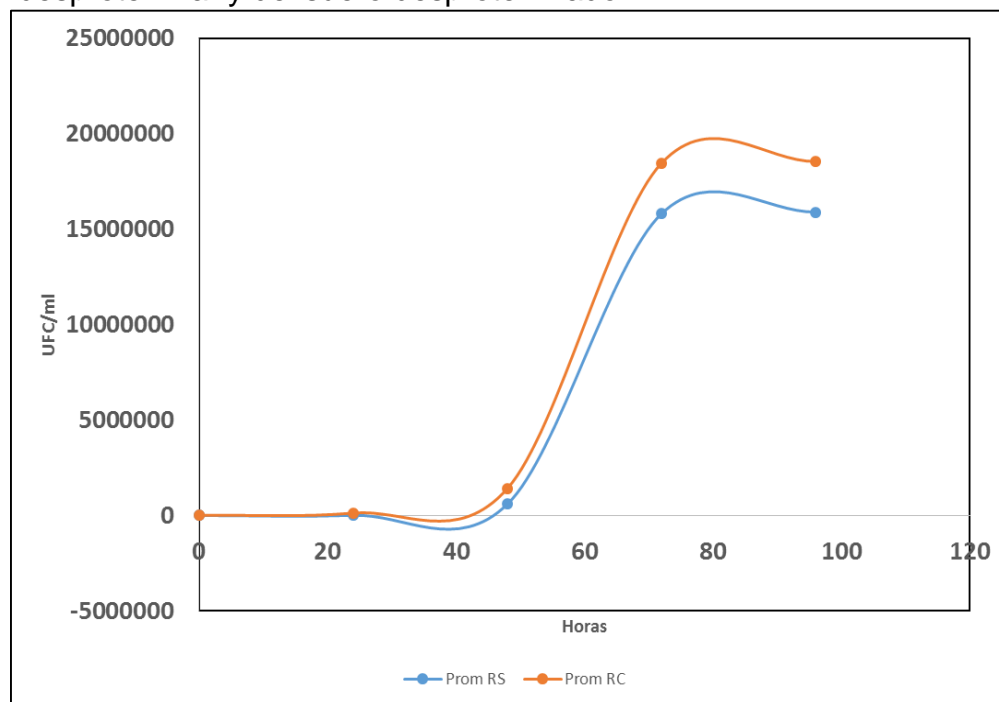
Horas	Suero Desproteínizado		Suero sin Desproteínizar	
	UFC/ml R1	UFC/ml R2	UFC/ml R1	UFC/ml R2
0	2500	3000	7500	8500
24	10000	10500	18500	245000
48	575000	635000	1380000	1475000
72	15550000	16100000	17600000	19350000
96	15600000	16200000	17600000	19500000

**Tabla 12.** Promedio de conteos microbianos

	<b>SUERO SIN PROTEINAS</b>	<b>SUERO CON PROTEINAS</b>
<b>horas</b>	<b>UFC/ml</b>	<b>UFC/ml</b>
0	2750	8000
24	10250	131750
48	605000	1427500
72	15825000	18475000
96	15900000	18550000

En la **Grafica 1** se puede observar la tendencia en las dos curvas donde es similar pero una es de mayor crecimiento que la otra, para este caso la fermentación realizada del suero sin desproteínizar tiene un mayor crecimiento en biomasa con respecto al desproteínizado esto puede estar influenciado a la presencia de proteínas del suero, las cuales brindan una fuente de nitrógeno necesario como nutriente para el crecimiento microbiano.

**Grafica 1** Promedio del crecimiento microbiano del suero sin desproteínizar y del suero desproteínizado



La producción de ácido láctico al finalizar la fermentación fue de 11,0475 y 9,81 g/L como se puede observar en la **Tabla 13** para los diferentes tipos de suero, al realizar la comparación con un proceso similar pero en un suero desproteínizado y suplementado reportado por Jakymec Miguel, Moran Héctor y colaboradores<sup>31</sup> obtuvieron 36,7 g/L de ácido láctico después de la fermentación, esto quiere decir que se obtiene una mayor concentración de producto al realizar la fermentación con suero desproteínizado y suplementado, también el hecho de eliminar las proteínas al comenzar la fermentación evita que al finalizar el proceso hallan dificultades en la eliminación de proteínas no reaccionantes como sucedió en este caso que no se eliminaron sino hasta la fase de extracción, la cual es recomendable hacerla con un medio lo más clarificado posible para tener menos sustancias involucradas en esta fase y solo tener a grosso modo agua y ácido láctico.

**Tabla 13** Producción promedio de ácido láctico de los dos tipos de suero

Horas	Prom RS (g/L)	Prom RC (g/L)
0	2.511	2.511
24	4.6125	4.9725
48	6.9975	7.83
72	8.19	9.0225
96	9.81	11.0475

Se realizan cálculos para el crecimiento microbiano con un ajuste lineal utilizando logaritmo natural para encontrar la velocidad específica de crecimiento estas fueron para el suero desproteínizado  $0.0757 \text{ h}^{-1}$  y para el suero sin desproteínizar de  $0.088 \text{ h}^{-1}$  donde se puede apreciar que la velocidad específica según la ley de velocidad son similares para ambos tipos de sustrato siendo ligeramente mayor la del suero sin desproteínizar. Se procede a realizar los cálculos de los parámetros cinéticos que permiten predecir el comportamiento de la producción de ácido láctico de los microorganismos trabajados.

El rendimiento calculado es comparado con el reportado por la autora Adriana M. Rojas y colaboradores<sup>32</sup>, donde realizan una relación de gramos de producto con

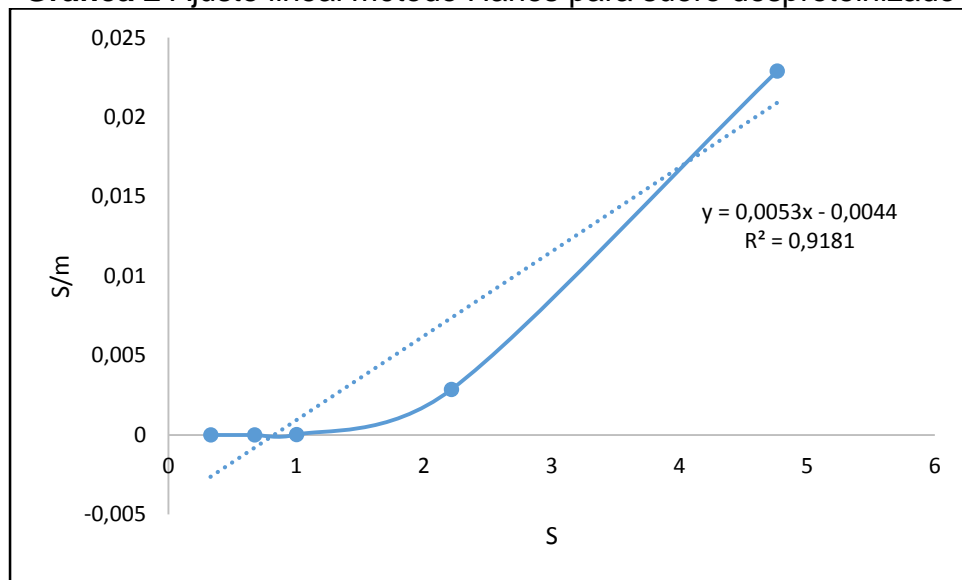
<sup>31</sup> JACKYMEC. Miguel, MORA. Hector, PAEZ. Gisela, FERRER. R. José, MÁRMOL. Zulay, RAMONES. Eduardo. Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. En: Revista Científica Revicylhuz Serbiluz. Maracaibo. Vol. 11, pág. 53-59, N° 1. 2001, extraído de: <<http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14751>> artículo científico.

<sup>32</sup> ROJAS. M. Adriana, MONTAÑO. P. Liceth, BASTIDAS. J. Marlon, Producción de ácido láctico a partir de lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, En: Revista científica Scielo. [En línea]. N° 3. Vol. 44. (17 De noviembre de 2015). Disponible en: <<http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v44n3/v44n3a01.pdf>> .

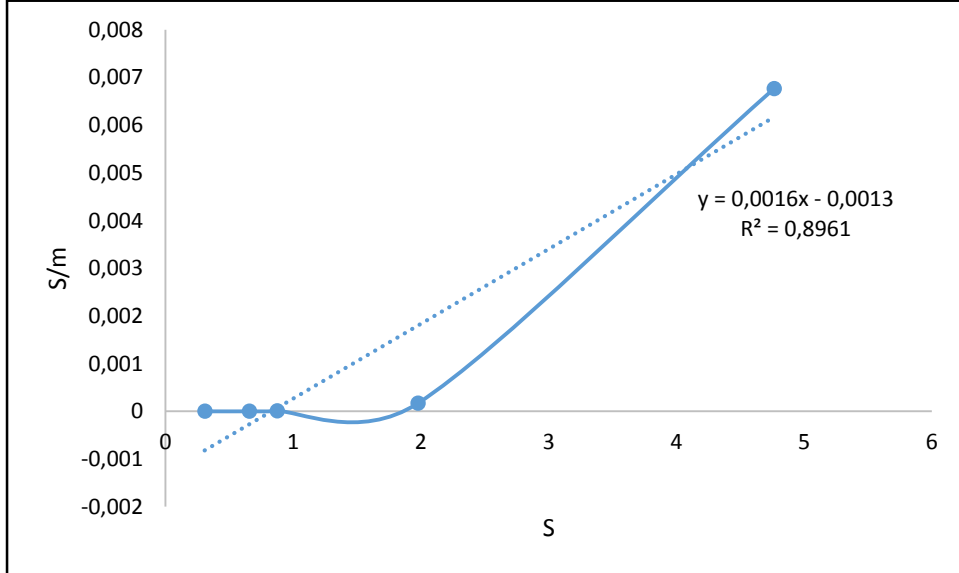
respecto a gramos de sustrato consumido fue del 10%, mientras que en el presente trabajo se reporta un rendimiento para lactosuero desproteínizado del 22.12% y para el suero sin desproteínizar arroja un rendimiento del 24.78%, también se evidencia un consumo de azúcar del 93% para ambos tipos de sustrato.

Como se mencionó anteriormente se encontró un ajuste con la ecuación de Hanes donde esta presenta la velocidad en cada tiempo y el sustrato consumido (la velocidad para cada tiempo se determina multiplicando la cantidad de microorganismos y las velocidades específicas encontradas de la ley de velocidad), se encuentran un valor de  $R^2$  de 0.9181 para suero desproteínizado y un  $R^2$  de 0.8961 para suero sin desproteínizar como se pueden apreciar en la **Grafica 2** y en la **Grafica 3**, donde se puede determinar que el ajuste de Hanes fue el más adecuado para los datos iniciales del crecimiento microbiano y consumo de sustrato. Los cálculos realizados y parámetros cinéticos se presentan en el **ANEXO B**.

**Grafica 2** Ajuste lineal método Hanes para suero desproteínizado



**Grafica 3** Ajuste método Hanes para suero sin desproteínizar.



#### 4.2 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ACIDO LÁCTICO

Luego de realizar el proceso descrito de separación en el embudo de decantación para el suero con proteínas se observa una emulsión en medio de las dos fases de interés, esto puede ser formado por las proteínas no reaccionantes, el agua y el éter dietílico, como no había forma de determinar que posee esa fase debido a la falta de equipos para analizar se procedió a retirar al momento de determinar la cantidad de volúmenes, las dos fases obtenidas se puede observar en la **Imagen 12**. En el recipiente del lado derecho se observa la fase orgánica con 220 ml y al lado izquierdo la fase de ácido láctico y éter dietílico con un volumen de 150 ml reportándose como pérdidas de 130 ml donde pueden estar en la emulsión ya mencionada y debido a que el éter dietílico a condiciones normales de temperatura y presión se volatiliza.

La concentración de ácido láctico después de finalizar la extracción es de 8.74 g/L, luego se elimina el solvente por medio del rotaevaporador, obteniendo un volumen de ácido láctico de 10 ml, de esta cantidad de volumen se tomó 1 ml para realizar la prueba de espectroscopia infrarroja.

**Imagen 12.** Fases recuperadas de la extracción



Para el suero sin proteínas no se observa la emulsión formada por el otro medio, una vez retirada las fases del embudo los volúmenes obtenidos son 220 ml para éter dietílico con ácido láctico y 250 ml para la fase orgánica como se puede observar en la **Imagen 13**, se determinó que la concentración de ácido láctico fue de 7.749 g/L, luego de retirar el solvente se obtuvo un volumen de ácido láctico de 11 ml, donde 1 ml se utiliza para realizar la prueba de espectroscopia infrarroja.

**Imagen 13.** Fases recuperadas de la extracción suero sin proteínas



Una vez obtenidos los valores de concentración para ambos tipos de suero después de la extracción se proceden a realizar los porcentajes de recuperación los cuales son: para el suero sin desproteínizar del 79.1% y para el suero desproteínizado del 78.9%, comparados con el porcentaje obtenido por Juan Camilo Cuellar Oviedo<sup>33</sup> es del 79.175% para éter dietílico el cual fue un valor muy cercano y es una remoción significativa de ácido láctico de la fase orgánica.

Se realizan cálculos de balance de masa para extracción líquido-líquido que se muestran en el **ANEXO C**, se presenta en la **Tabla 14** las características de las soluciones que entran y salen de la extracción. También se presenta los resultados de los balances obtenidos con las composiciones y fracciones másicas de cada corriente en la **Tabla 15** para el suero sin proteínas y en la **Tabla 16** para el suero con proteínas.

---

<sup>33</sup> Juan Camilo Cuellar, Fundación Universidad de América, año 2014, Trabajo de grado “Evaluación de la separación del ácido láctico obtenido a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticas”.



**Tabla 14** Densidad de los soluciones utilizados en la extracción

<b>Densidad suero (g/ml)</b>	1.02455
<b>Densidad éter (g/ml)</b>	0.714
<b>Densidad Ácido láctico (g/ml)</b>	1.206
<b>Densidad prom éter- ácido láctico (g/ml)</b>	0.96

**Tabla 15** Balance de masa suero sin proteínas

<b>F1 g</b>	256.1375
Xa	0.03829974
Xd	0.96170026
<b>E0 g</b>	178.5
Ya	0
Ys	1
<b>E1 g</b>	211.2
Ya	0.03669034
Ys	0.96330966
<b>R1 g</b>	223.4375
Xa	0.03468084
Xd	0.95927916
Xs	0.00604

**Tabla 16** Balance de masa suero con proteínas

<b>F1 g</b>	256.1375
Xa	0.03829974
Xd	0.96170026
<b>E0 g</b>	178.5
Ya	0
Ys	1
<b>E1 g</b>	144
Ya	0.0538125
Ys	0.9461875
<b>R1 g</b>	290.6375
Xa	0.02666208
Xd	0.96729792
Xs	0.00604

Para determinar la existencia de ácido láctico se realizó la prueba de espectroscopia infrarroja (FTIR), donde se determinan los grupos funcionales de la muestra, pero antes de esto se hizo pasar una muestra de ácido láctico comercial de grado analítico para tener un punto de comparación.

A una resolución de 1/cm el espectro obtenido fue comparado con el obtenido por D del Ángel López y colaboradores<sup>34</sup>, donde el ácido láctico manejado es de características similares en el espectro infrarrojo, en el cual las características en los grupos funcionales están presentes y son similares, las dos muestras para analizar en el espectrofotómetro FTIR están en el **ANEXO D**. Junto con los grupos funcionales representados en la **Tabla 21**. El primer espectrograma está relacionado con el resultado de la fermentación sin proteínas y el segundo se refiere al resultado de la fermentación con proteínas.

Donde el espectro de ácido láctico producido por el suero con proteínas tiene similitudes con el ácido láctico comercial, aunque se evidencian más picos esto puede ser debido a la presencia de trazas de éter en la muestra. La muestra proveniente del suero desproteínizado evidencia menores bandas así como estos dos espectros tienen similitud con el ácido láctico comercial, dejando claro la presencia de ácido láctico después de la etapa de fermentación y extracción ya descritas.

### 4.3 POLIMERIZACIÓN

Una vez caracterizado el ácido láctico purificado se decidió mezclar el obtenido por el suero con proteínas y con el suero sin proteínas para así tener una cantidad mayor de ácido láctico y lograr la obtención del polímero, en el proceso de obtención de lactida fue más acelerada la reacción a comparación de la obtenida con ácido láctico comercial, como también es de un color ámbar más oscuro, así como un fluido menos espeso que el anteriormente obtenido pero en características generales se puede afirmar que se produjo lactida.

Luego de obtenida la lactida se realizó la polimerización de este compuesto observando rápidamente el precipitado blanco característico, al terminar la reacción se realizan procedimientos para obtener el polímero seco. Una vez obtenido se realiza el ensayo de espectroscopia infrarroja (FTIR), con el fin de determinar la presencia de los grupos funcionales del polímero, también se pasó por el espectrofotómetro un ácido poliláctico producido por este mismo método pero con un

---

<sup>34</sup> ANGEL LÓPEZ D., VELA FLORES A., CANO ZUBIAGA J., GARCIA MURILLO A., LOPEZ MARUERE A. CARRILLO ROMO F. Estudio Y Síntesis En La Producción De PLA (Ácido Poliláctico). Artículo Científico. Congreso Preparación de la mujer en la ciencia, CIATEC. Tamaulipas, México, Año 2007. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Universidad del Noreste.

ácido láctico comercial al 85%. El espectro del polímero producido por el ácido comercial y el ácido láctico producido y purificado se presentan en el **ANEXO E**. Junto con los grupos funcionales representados en la **Tabla 21** del **ANEXO D**.

El espectro obtenido del polímero proveniente del ácido láctico comercial es de características similares en los picos de los grupos funcionales a lo reportado por D. del Ángel López y colaboradores<sup>35</sup>, así como el polímero obtenido por el ácido láctico producido y purificado presenta los mismos picos en las bandas un poco reducidos pero se pueden considerar la presencia de estos grupos funcionales.

Se realizó un ensayo de difracción de rayos X que permite observar la cristalinidad del polímero obtenido tanto para el ácido láctico comercial como el producido y purificado, ambos difractogramas se encuentran en el **ANEXO F**.

El difractograma del PLA producido por el ácido láctico comercial presenta un pico en el ángulo de cristalinidad característico, el cual está entre 15 y 20 grados reportado por P. Pagès y colaboradores<sup>36</sup>, así como el estudio realizado por J. Cortes<sup>37</sup> que se muestra en el **ANEXO F**.

Del mismo modo se evidencia el pico representativo pero en una menor proporción para el polímero de ácido láctico producido y purificado, esto puede ser a la pureza de ácido láctico que se obtuvo. Además se observan otros picos en ambos difractogramas de los polímeros obtenidos, asociados a impurezas como lactida que no reacciona y no se logra retirar.

---

<sup>35</sup> ANGEL LÓPEZ D., VELA FLORES A., CANO ZUBIAGA J., GARCIA MURILLO A., LOPEZ MARUERE A. CARRILLO ROMO F. Estudio Y Síntesis En La Producción De PLA (Ácido Poliláctico). Artículo Científico. Congreso Preparación de la mujer en la ciencia, CIATEC. Tamaulipas, México, Año 2007. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Universidad del Noreste.

<sup>36</sup> PAGÉS. P., CARRASCO. J. GÓMEZ-PEREZ., SANTANA. O., MASPOCH. M. Procesado del ácido poliláctico (PLA) y de nano compuestos PLA/montmorillonita en planta piloto: Estudio de sus cambios estructurales y de su estabilidad térmica. En: Revista de química teórica y aplicada Afinidad. Cataluña. España. Vol. 67. N° 546. Año 2010. Extraído de: <<http://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/269088>>

<sup>37</sup> CORTES. J. Evaluación de adición de aditivos para permeado de empaques de PLA. En estudio. Trabajo de Maestría (Química Pura). Bogotá. Colombia. Universidad Nacional.

## 5 CONCLUSIONES.

- Se reafirman los parámetros tomados de la vigilancia tecnológica que rigen la fermentación de lactosuero para la producción de ácido láctico por vía fermentativa utilizando los microorganismos propuestos, los cuales son: T = 42°C pH: 5.5 y 150 rpm.
- El rendimiento obtenido de la fermentación arrojó un valor del 22% y del 24% donde el mayor valor hace referencia al suero con proteínas, siendo valores no significativos con relación al tipo de sustrato.
- El grado de purificación obtenido después de la extracción líquido-líquido usando éter dietílico fue de 78.9% y 79.1% siendo el mayor el suero con proteínas, donde la diferencia en los porcentajes de recuperación es despreciable.
- De acuerdo a los difractogramas y espectrogramas se determina la presencia del polímero ya que contiene el pico representativo de la cristalinidad y contiene los grupos funcionales correspondientes respectivamente, demostrando la obtención del ácido poliláctico.

## 6 RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la fermentación con un suero desproteinizado pero suplementando con extracto de levadura y sulfato de amonio con el fin de saber si las proteínas propias del suero son lo suficientes para los microorganismos.
- Se recomienda estudiar el uso de métodos tecnológicos como microfiltración, electrodiálisis, filtración de membranas para la separación y purificación del ácido láctico.
- Se recomienda realizar la prueba de HPLC para la cuantificación de ácido láctico para corroborar la cantidad de ácido láctico y su única presencia.
- Se recomienda realizar un diseño a futuro de una planta piloto para la producción de PLA a partir del suero de quesería.

## BIBLIOGRAFIA.

ANGEL LÓPEZ D., VELA FLORES A., CANO ZUBIAGA J., GARCIA MURILLO A., LOPEZ MARUERE A. CARRILLO ROMO F. Estudio Y Síntesis En La Producción De PLA (Ácido Poliláctico). Artículo Científico. Congreso Preparación de la mujer en la ciencia, CIATEC. Tamaulipas, México, Año 2007. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Universidad del Noreste.

ALAIS, Charles. GODINA. L. Antonio. CIENCIA DE LA LECHE. Barcelona ESPAÑA. Editorial REVERTE. 2003. p. 419. ISBN 84-291-1815-2.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Biuret method. AOAC 1999. Estados Unidos. 1990. 7 p.

Artículo Producción Biotecnológica Ácido Láctico. Biopolímeros. Escuela De Ingenierías Industriales – Uva. Síntesis química [En línea]. Disponible en: <<http://goo.gl/9L2oIY>> [Citado el 12 de marzo de 2016]

Artículo Producción Biotecnológica Ácido Láctico. Biopolímeros. Escuela De Ingenierías Industriales – Uva. Fermentación [En línea]. Disponible en: <<http://goo.gl/s5v8rg>> [Citado el 12 de marzo de 2016]

Artículo Ácido Poliláctico PLA. Biopolímeros. Escuela de Ingenierías Industriales - Uva. PLA [En línea]. Disponible en: <<http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/alberto/pla.htm>> [Citado el 12 de Agosto de 2016]

Baez E, José. Como obtener un polímero degradable en el laboratorio: síntesis de la poli (D, L-lactida) y caracterización por RMN 1H. En: Revista DIALNET. Bogotá, Vol. 21, pág. 170-177, N°. 2, 2010, extraído de: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3205215>> artículo científico.

BÁEZ GARCÍA. José Eduardo. Una Ruta Para Sintetizar Macromoléculas: Polimerización Por Apertura De Anillo (ROP). México, 2016. Artículo Científico. Universidad del Papaloapan (UNPA) En: Aleph-Zero Revista de Educación y Divulgación de la Ciencia, Tecnología e Innovación. [En línea]. Disponible en: <[http://www.comprendamos.org/alephzero/52/una\\_ruta\\_para\\_sintetizar\\_macromoleculas\\_polimeriz.html](http://www.comprendamos.org/alephzero/52/una_ruta_para_sintetizar_macromoleculas_polimeriz.html)> [Citado el 12 de agosto de 2016]

CORTES. J. Evaluación de adición de aditivos para permeado de empaques de PLA. En estudio. Trabajo de Maestría (Química Pura). Bogotá. Colombia. Universidad Nacional.

DOMINGUEZ SANCHEZ, José Pablo, GOMEZ SANCHEZ, Luis Alejandro, RODRIGUEZ CASTILLO, Irwin Ricardo. Creación de bioplásticos a partir de ácido láctico. Guía de laboratorio. Trabajo de Grado. Monterrey: Universidad de Monterrey.

FLORES P. Abad. BAUTISTA C. Mario. EGUIZQUIZA Ch. Rosa. De la TORRE. Mayra. Desarrollo de bioprocesos para la reducción de los niveles de DBO y DQO de efluentes de la industria alimentaria. En: Revista Per. Quim. Universidad de San Marcos e Instituto Politécnico Nacional de México. [En línea]. N.º 1. Vol. 11. 2008. p. 3-10.

FRANCO. NIVIA. Javier. Andrés. Diseño conceptual de una planta de producción ácido láctico. Capítulo 2. Bogotá 2005. 91h. Trabajo de grado (Ingeniería Química). Universidad de América. p. 20.

GREEN. En la era Biodegradable. En: DINERO. [en línea]. (24 de noviembre de 2009). Disponible en: <<http://www.dinero.com/green/seccion-patrocinos/articulo/en-biodegradable/85081>>. [Citado el 8 de marzo de 2016]

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El instituto, 2008. 110 p

\_\_\_\_\_. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El instituto, 2008. 45 p.

\_\_\_\_\_. Productos lácteos. Leche Pasteurizada. NTC 506. Bogotá: El instituto, 2002, 11p.

\_\_\_\_\_. Leche y productos lácteos. Determinación de la acidez titulable - método de referencia. NTC 4978. Bogotá: El instituto, 2001, 9 p.

\_\_\_\_\_. Referencias documentales para fuentes de informaciones electrónicas. NTC 4490. Bogotá: El instituto, 1998. 33 p.

\_\_\_\_\_. Método para determinación de azúcares totales expresados como reductores. NTC 1779. Bogotá: El instituto, 1997. 5p.

JACKYMEC. Miguel, MORA. Hector, PAEZ. Gisela, FERRER. R. José, MÁRMOL. Zulay, RAMONES. Eduardo. Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. En: Revista Científica Revicylhuz Serbiluz. Maracaibo. Vol. 11, págs. 53-59, N° 1. 2001, extraído de:

<<http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14751>> artículo científico.

JORGENSEN. Alfred, Capitulo 8: Bacterias Acido Lácticas. Microbiología de las fermentaciones. Editorial Acribia. Barcelona España. 1959. p. 426

\_\_\_\_\_. Alfred, Capitulo 8: Bacterias Acido Lácticas. Microbiología de las fermentaciones. Editorial Acribia. Barcelona España. 1959. p. 431-432

LENDLEIN Andreas y Sisson Adam. Hadbook of biodegradable polymers: Isolation, synthesis, characterization and applications. WILEY-VCH, 2011 .p.287 – 294.

MADIGAN. Michel. T. Capítulo 5: Microbiología Aplicada. Brock Biología De Los Microorganismos. Madrid España. Editorial Person. 12ª Edición. 2009. p. 493-496. ISBN 9788478290970

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Codex Alimentarius. Aditivos Alimentarios [En línea]. Disponible en: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/es/>>. [Citado el 13 de agosto de 2016]

PAGÉS. P., CARRASCO. J. GÓMEZ-PEREZ., SANTANA. O., MASPOCH. M. Procesado del ácido poliláctico (PLA) y de nano compuestos PLA/montmorillonita en planta piloto: Estudio de sus cambios estructurales y de su estabilidad térmica. En: Revista de química teórica y aplicada Afinidad. Cataluña. España. Vol. 67. N° 546. Año 2010. Extraído de: <<http://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/269088>>

PARRA H. Ricardo. Bacterias acido lácticas: papel funcional en los alimentos. En: Revista Scielo. Facultad de Ciencias Agropecuarias [en línea]. No 1. Vol. 8. (Enero - junio de 2010). Disponible en: <<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>>. [Citado el 10 de marzo de 2016]

PERLTA BARBARA. Michelle S, PALMA BARRIONUEVO, Kevin C. Estudio preliminar de la fermentación de suero lácteo empleando microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. p. 11. Trabajo de grado (Ingeniero de Alimentos). Guayaquil Ecuador. Escuela Superior del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y ciencia de la producción. Disponible en un catálogo en línea Centro de información Bibliotecario. <<http://www.cib.espol.edu.ec/>>

\_\_\_\_\_. BARBARA. Michelle S, PALMA BARRIONUEVO, Kevin C. Estudio preliminar de la fermentación de suero lácteo empleando microorganismo *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. p. 75. Trabajo de grado (Ingeniero de Alimentos). Guayaquil Ecuador. Escuela Superior del Litoral. Facultad de Ingeniería



en Mecánica y ciencia de la producción. Disponible en un catálogo en línea Centro de información Bibliotecario. <<http://www.cib.espol.edu.ec/>>

PRESCOTT Samuel Cate. Capítulo 8: Producción De Ácido Láctico Por Fermentación. Microbiología Industrial. Madrid España. Editorial Aguilar. 1962. p. 324-325.

RAPRA TECHNOLOGY LIMITED. Handbook of biodegradable polymers. Capítulo 9: Polylactic Acid and polyester. p. 287 – 294.

ROJAS. M. Adriana, MONTAÑO. P. Liceth, BASTIDAS. J. Marlon, Producción de ácido láctico a partir de lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, En: Revista científica Scielo. [En línea]. N° 3. Vol. 44. (17 De noviembre de 2015). Disponible en: <<http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v44n3/v44n3a01.pdf>>.

RIVAS, Franco y GARRO Oscar. Preparación de cultivos iniciadores, Optimización del sustrato de crecimiento. Argentina, 2006. Trabajo de grado. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias.

SERNA COCK. L. RODRIGUEZ. DE STOUVENEL. A. Producción biotecnológica de ácido láctico estado del arte. En: Revista científica ciencia y tecnología alimentaria [en línea]. No 1. Vol. 5. (28 de marzo de 2005). p. 54-65. ISSN 1135-8122. Disponible en: < <http://goo.gl/EaamVz> > [Citado el 10 de marzo de 2016]

TETRAPAK. Suero lácteo, clave en la innovación de alimentos. En: Finanzas. Revista Portafolio virtual [en línea]. (3 de agosto de 2014). Disponible en:<<http://www.portafolio.co/economia/suero-lacteo-clave-la-innovacion-alimentos>> [Citado el 8 de marzo de 2016]

\_\_\_\_\_. Capítulo 2: Química de la leche. Manual de Industria Láctea. Traducido por: LOPÉZ G. Antonio, A. MADREID VICENTE EDICIONES. 1996. Madrid España. p. 13-36.

\_\_\_\_\_. Capítulo 14: El queso. Manual de Industria Láctea, Traducido por: LOPÉZ G. Antonio, A. MADREID VICENTE EDICIONES. 1996. Madrid España. p. 287-336.

\_\_\_\_\_. Capítulo 15: Procesado del lactosuero. Manual de Industria Láctea. Traducido por: LOPÉZ G. Antonio. A. MADREID VICENTE EDICIONES. 1996. Madrid España. p. 331-354

# **ANEXOS**

## ANEXO A

### CARACTERIZACIÓN DEL SUERO

Se presentan los resultados obtenidos en la caracterización del suero obtenido de la empresa Quesos del Vecchio.

- **Acidez titulable**

$$\text{Acido lactico} \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{(V_{NaOH}) * (N_{NaOH}) * (90)}{(V_{muestra})}$$

$$\text{Acido lactico} \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{(3.1ml) * (0,1N) * (90)}{(10ml)} = 2.79 \frac{g}{L}$$

$$0,1 \frac{g}{L} = 1^\circ \text{Dornic}$$

$$2.79 \frac{g}{L} * \left( \frac{1^\circ \text{Dornic}}{0.1 \frac{g}{L}} \right) = 27.9^\circ \text{Dornic}$$

Debido a que se tiene según la norma *NTC 4978* ° Dornic es 0,01% de acidez lo que equivale a 0,45% de acidez.

- **Densidad**

Siguiendo la norma *NTC 506* y siguiendo la ecuación de densidad que se muestra a continuación y realizando un promedio se encuentra que la densidad del suero fue:

$$\rho = \frac{\text{masa}}{\text{Volumen}}$$

$$\rho_1 = \frac{58,8g - 33.2403g}{24,774ml} = 1.02427 \frac{g}{ml}$$

$$\rho_2 = \frac{56,1748g - 30,7855g}{24,774ml} = 1.02483 \frac{g}{ml}$$

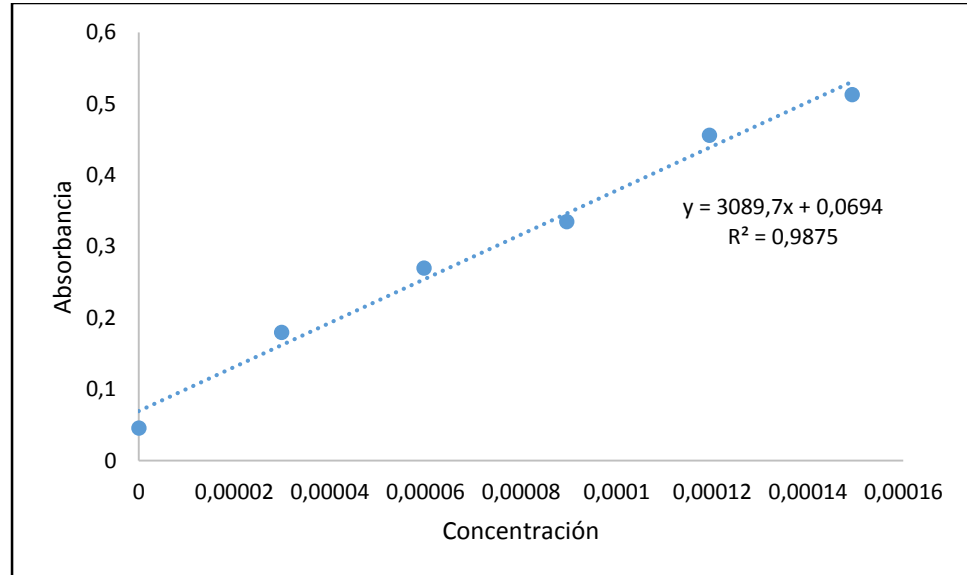
$$\rho_{prom} = \frac{1.02427 \frac{g}{ml} + 1.02483 \frac{g}{ml}}{2} = 1,02455 \frac{g}{ml}$$

Observando con la literatura en el ítem 2.3 de suero se encuentra en 1.25g/ml y el calculado es de 1.02455 g/ml.

- **Método de Biuret para cuantificación de proteínas**

A continuación siguiendo la norma AOAC 1999 se realizan lecturas en el espectrofotómetro las cuales muestran las concentraciones de albumina de suero bobino en la tabla 7, se realiza una curva con los datos obtenidos y se realiza una regresión lineal siguiendo la ley de Lamber-Beer la cual se muestra en la siguiente gráfica:

**Grafica 4** Concentración vs absorbancia de albumina de suero bobino



**Tabla 17** Concentraciones de albumina de suero bobino con respecto a la absorbancia

CONCENTRACION M	ABSORBANCIA
0	0.046
2.98507E-05	0.18
5.97015E-05	0.27
8.95522E-05	0.335
0.000119403	0.456
0.000149254	0.513

La absorbancia obtenida en la lectura de la muestra de suero lácteo es de 1.354 utilizando la ecuación encontrada en la regresión lineal donde y es absorbancia y x es concentración por lo tanto se despeja la concentración y está dada en molaridad (mol/L):

$$y = 3089,7x + 0,0694$$

$$x = \frac{y - 0,0694}{3089,7}$$

$$x = \frac{1.354 - 0,0694}{3089,7} = 0,000415769$$

La concentración encontrada fue de 0,000415769 mol/L de albumina en el suero mucho mayor a las dadas por la albumina del suero bobino el cual está al 22%p/v y para la realización del patrón se requiere en 10 mg/ml el peso molecular de la albumina es de 67000 g/mol haciendo uso de esto se encuentra que la cantidad de gramos de albumina en el suero lácteo es de 27,8564 g/L.

- **Prueba de Fehling azúcares reductores**

Teniendo en cuenta la norma *NTC 1779* se determinar el porcentaje de azúcares reductores se muestran los siguientes cálculos donde se halla el factor de Fehling (f):

$$f = (\text{ml SLN Glucosa gastados}) * \left(\frac{1}{100}\right) * (10 \text{ ml de SLN Fehling})$$

$$f = (6,1\text{ml}) * (0.001) * (10) = 0.061$$

$$\%AR = \left(\frac{f}{\text{ml de Suero gastados}}\right) * 100$$

$$\%AR = \left(\frac{0,061}{12,8\text{ml}}\right) * 100 = 4.76\%$$

**ANEXO B.**  
**CINETICA MICROBIANA**

$$\ln(N_f) = \ln(N_0) + \mu t$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x = UFC/mL$$

**PORCENTAJE AZUCARES REDUCTORES**

**Tabla 18** Porcentaje de azucares reductores

Horas	% AR R1S	% AR R2S	% AR R1C	% AR R2C
0	4,765625	4,765625	4,765625	4,765625
24	2,21818182	2,21014493	2,01986755	1,93650794
48	1,00993377	0,99673203	0,87896254	0,87018545
72	0,67403315	0,67777778	0,66304348	0,65240642
96	0,32275132	0,33888889	0,31122449	0,30500000

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**

**Tabla 19** Producción de ácido láctico

Horas	R1S (g/ml)	R2S (g/ml)	R1C (g/ml)	R2C (g/ml)
0	2.511	2.511	2.511	2.511
24	4.68	4.545	4.815	5.13
48	7.065	6.93	7.515	8.145
72	8.235	8.145	8.505	9.54
96	9.945	9.675	10.53	11.565

**MONOD**

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{K_m + s}$$

$$\frac{1}{\mu} = \left( \frac{Km}{\mu_{max}} * \frac{1}{s} \right) + \frac{1}{\mu_{max}}$$

Multiplicando por el sustrato (s) se obtiene la ecuación de Hanes

$$\frac{s}{\mu} = \frac{Km}{\mu_{max}} + \left( \frac{1}{\mu_{max}} * s \right)$$

## AJUSTE DE HANES

**Tabla 20** Ajuste cinética método de Hanes

<b>dx/dt</b>	<b>dx/dt</b>	<b>promedio</b>	<b>promedio</b>	<b>s/m</b>	<b>s/m</b>
208,175	704	4,765625	4,765625	0,0228924	0,00676935
775,925	11594	2,21416337	1,97818774	0,00285358	0,00017062
45798,5	125620	1,0033329	0,87457399	2,1908E-05	6,9621E-06
1197952,5	1625800	0,67590546	0,65772495	5,6422E-07	4,0455E-07
1203630	1632400	0,33082011	0,30811224	2,7485E-07	1,8875E-07

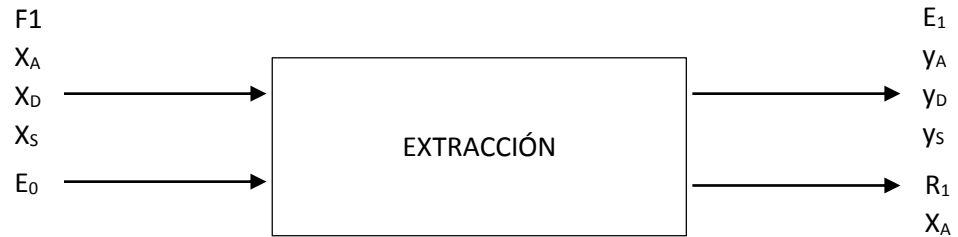
### Cuadro Parámetros calculados

<b>Parámetros cinéticos</b>	<b>RS</b>	<b>RC</b>
$\mu_{max} h^{-1}$	188.679	625
km	0.8301	0.8125

## ANEXO C

### SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Balances para extracción



Balance Global:

$$F_1 + E_0 = R_1 + E_1$$

Donde:

$$F_1 = 250\text{mL} * \rho_{\text{suero}}$$

$$X_A = \frac{\text{g Acido lactico}}{\text{ml de Suero} * \rho_{\text{suero}}}$$

$$E_0 = 250\text{mL} * \rho_{\text{eter}}$$

$$X_D = 1 - X_A$$

$$X_S = 0$$

$$E_1 = 180\text{mL} * \rho_{\text{prom eter-acido}}$$

$$Y_A = \frac{\text{g Acido Lactico recuperado}}{\text{ml Eter - Acido} * \rho_{\text{prom eter-acido}}}$$

$$Y_S = 1 - Y_A$$

$$Y_D = 0$$

$$R_1 = (E_0 + F_1) - E_1$$

$$X_A = \frac{X_A F_1 + Y_A E_1}{R_1}$$



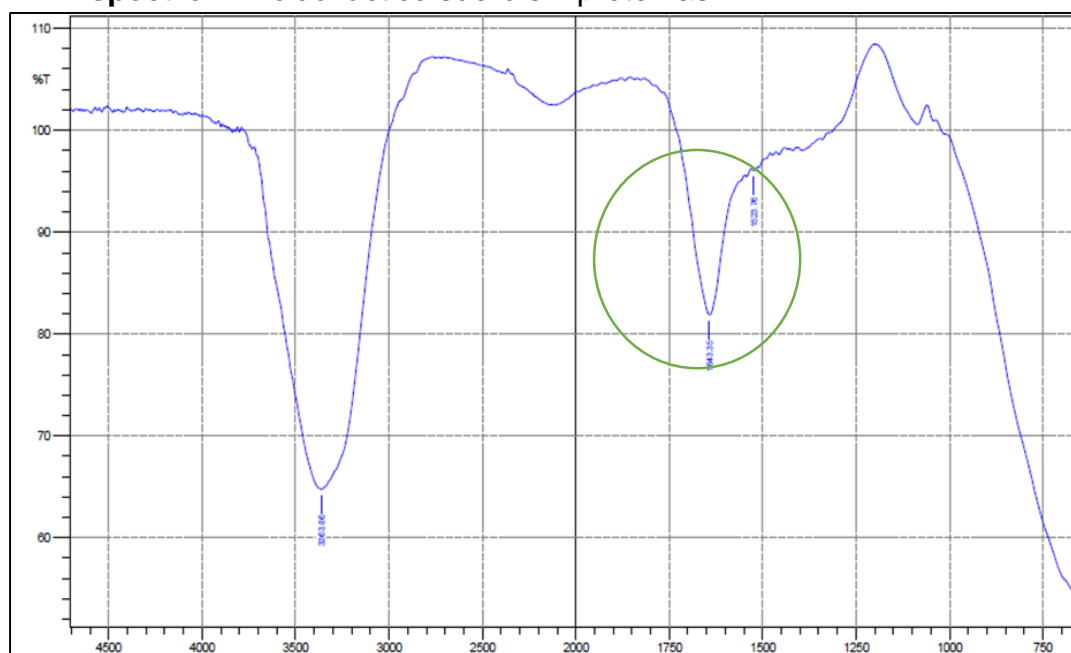
## ANEXO D

### ESPECTROS ÁCIDO LÁCTICO

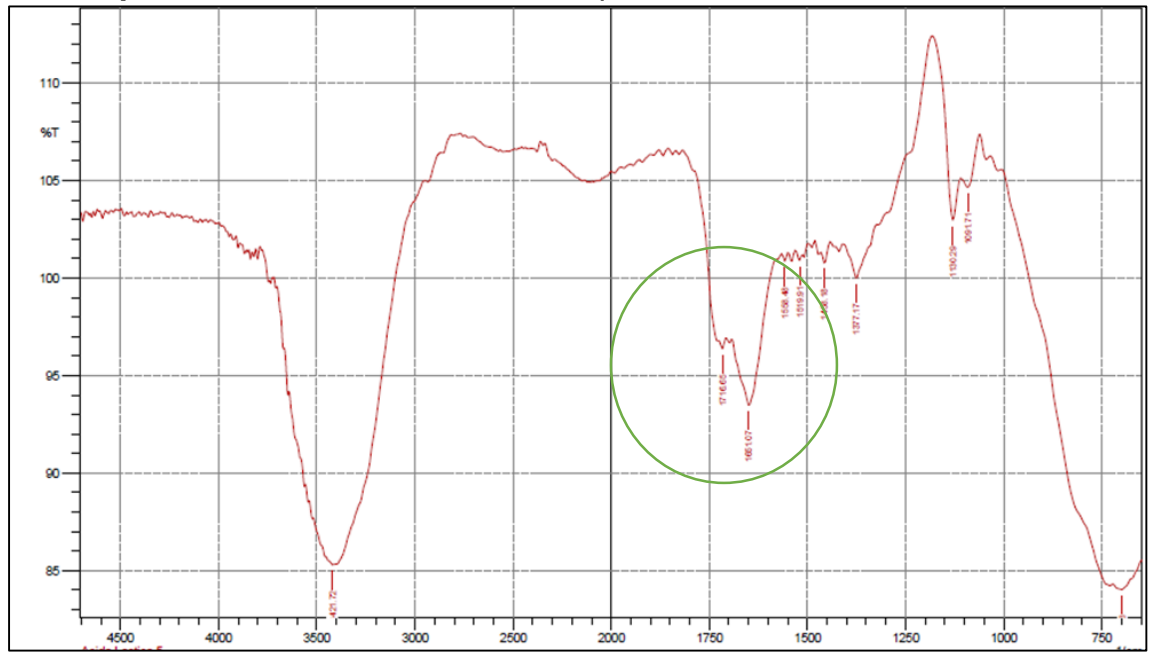
**Tabla 21** Lectura de Grupos funcionales con respecto a las longitudes de onda

Grupo	Longitud de onda 1/cm
O – H (acido)	4500 – 2500
C – H	3000 – 2500
C = O (grupo carboxilo)	1800 – 1650
C – C ; C – O	1500 – 650

**Espectro 1.** Ácido láctico suero sin proteínas



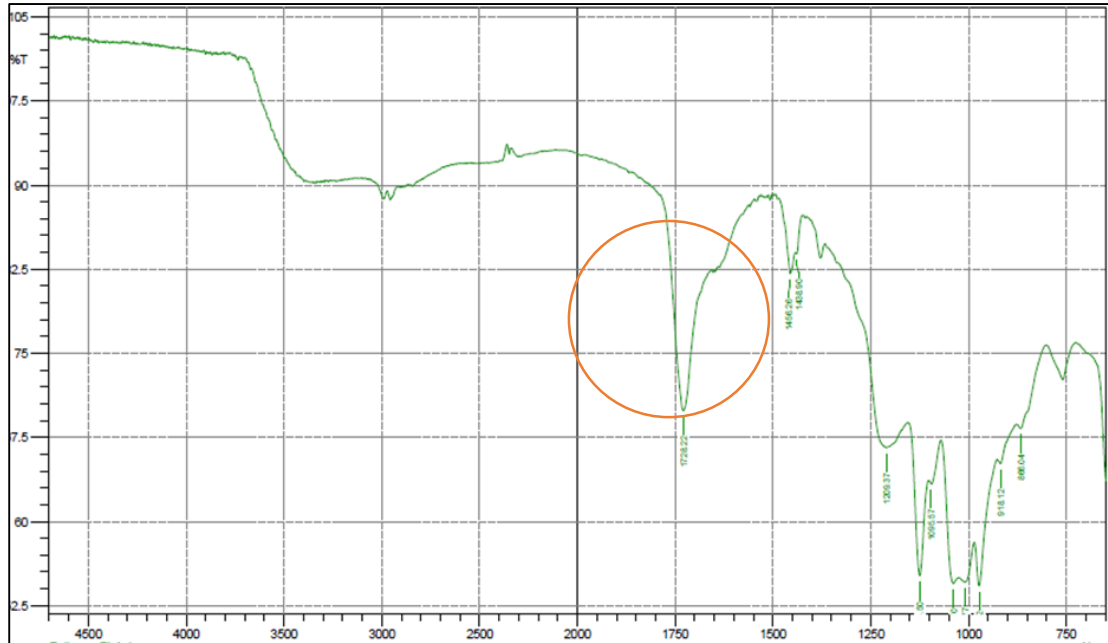
**Espectro 2. Ácido láctico suero con proteínas**



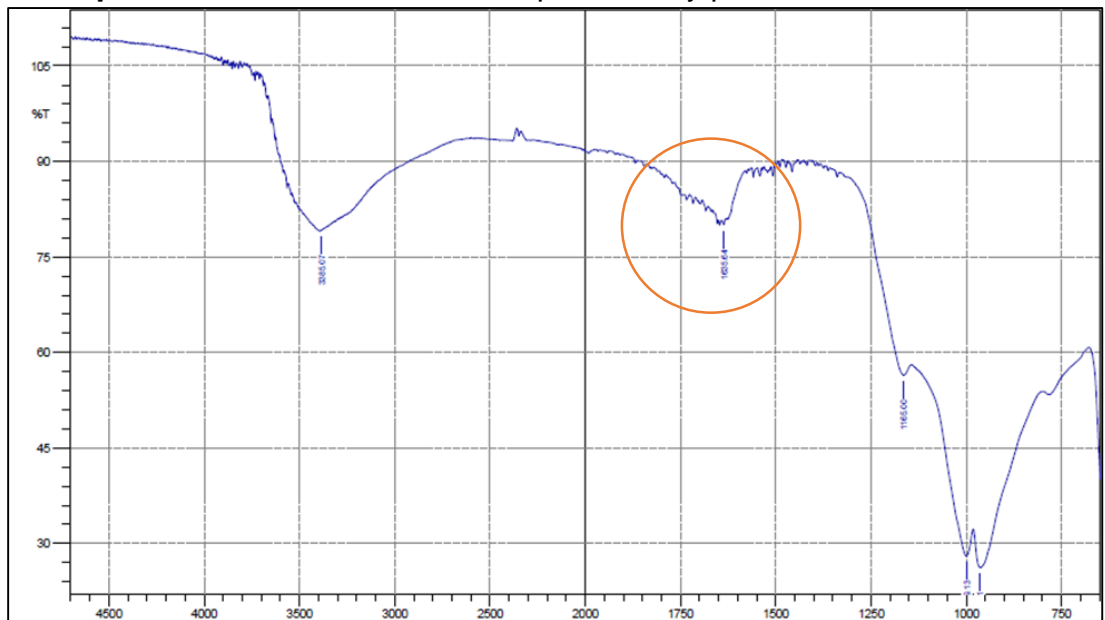
## ANEXO E

### ESPECTROS ÁCIDO POLILÁCTICO

**Espectro 3.** PLA de ácido láctico comercial

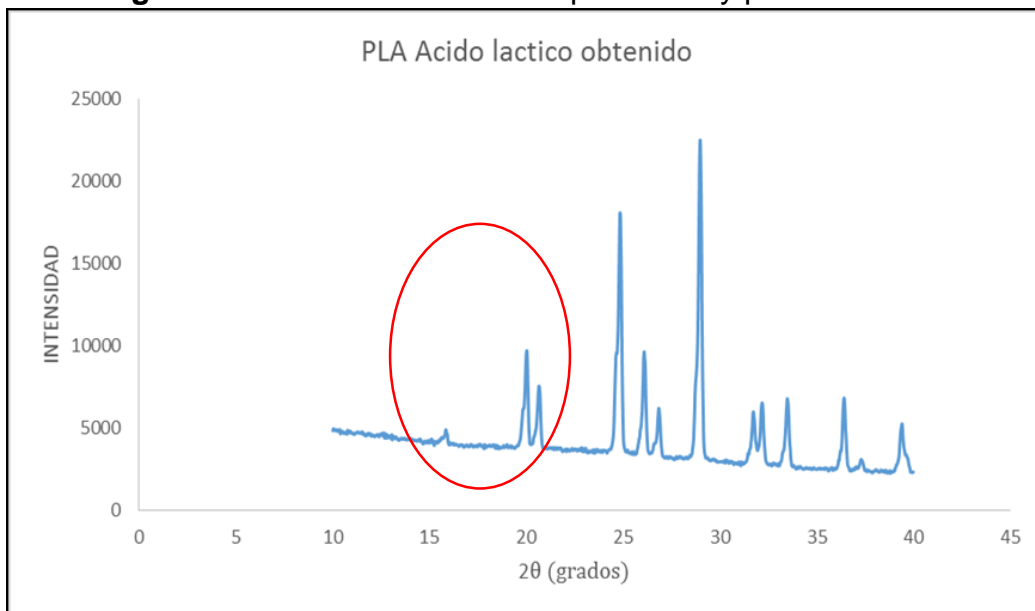


**Espectro 4.** PLA de ácido láctico producido y purificado

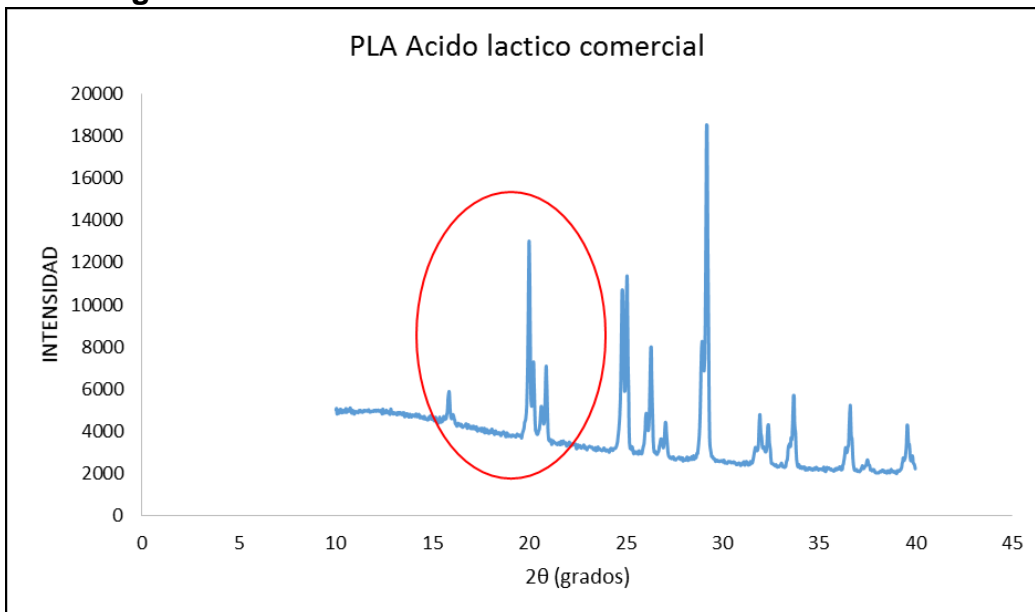


**ANEXO F**  
**DIFRACTOGRAMAS ÁCIDO POLILÁCTICO**

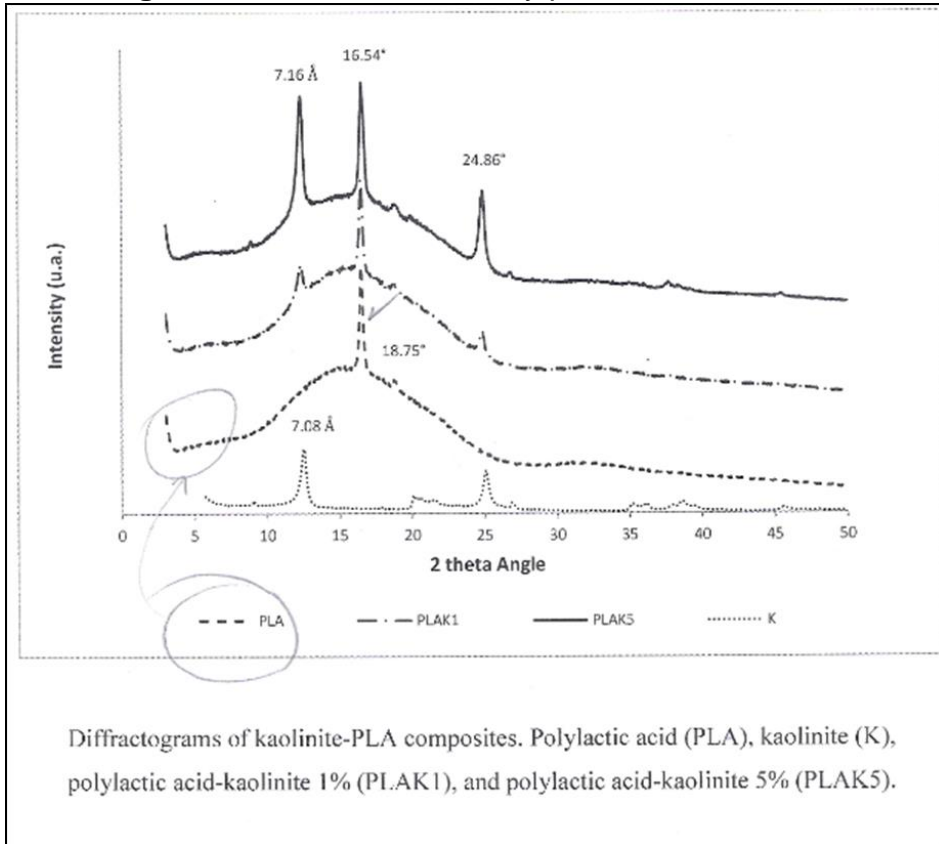
**Difractograma 1.** PLA de ácido láctico producido y purificado



**Difractograma 2.** PLA de ácido láctico comercial.



### Difractograma 3. PLA con aditivos y puro



Fuente: J. Cortes. M. Et Al. Año 2016