

OPERACION DE UN FERMENTADOR POR LOTE  
ALIMENTADO EN CONDICIONES ANAEROBIAS  
UTILIZANDO EL SISTEMA  
SUERO DE QUESO/LACTATO DE SODIO

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

OPERACION DE UN FERMENTADOR POR LOTE  
ALIMENTADO EN CONDICIONES ANAEROBIAS  
UTILIZANDO EL SISTEMA  
SUERO DE QUESO/LACTATO DE SODIO

AURA LORENA CRUZ RIVAS

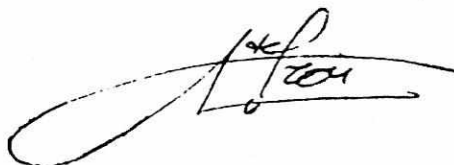
Trabajo de investigación presentado para optar al  
grado académico de Licenciada en Ingeniería  
Química



Guatemala

1992

Vo.Bo.:



(f)

Licenciado Roberto De León Fajardo  
Asesor

Tribunal:



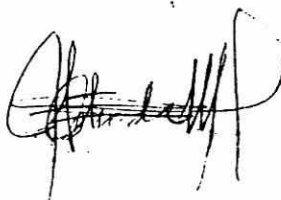
(f)

Ingeniero Eduardo Calderón  
Jefe de la Sección de Ingeniería Química



(f)

Licenciado Roberto De León Fajardo



(f)

Ingeniero Arturo Estrada

Fecha de aprobación: 3 de abril de 1992.

## RESUMEN

Se trabajó el fermentador discontinuo del laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala en régimen de lote alimentado (fed-batch), con el fin de determinar si de esta forma se lograban mayores rendimientos y productividades.

La fermentación seleccionada fue la de la lactosa del suero de queso hacia ácido láctico y su posterior neutralización con hidróxido de sodio 2 N para obtener como producto final lactato de sodio. El microorganismo responsable de la fermentación fue *Lactobacillus bulgaricus*.

Se trabajó a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  y a pH de  $5.6 \pm 0.2$ . La anaerobiosis se indujo inyectando dióxido de carbono al medio de cultivo.

Los resultados fueron los siguientes: para la fermentación por lotes, rendimiento en producto 0.35 y productividad 0.244. Para las fermentaciones por lote alimentado, rendimiento en producto 1.1 (en ambos casos) y productividad de 0.334 y 0.573.

Con base en los resultados se concluyó que el fermentador discontinuo puede trabajarse como uno por lote alimentado, y que, en efecto, al operarse de este modo, los rendimientos y las productividades aumentan.

## CONTENIDO

		Páginas
	RESUMEN	v
I.	INTRODUCCION	1
II.	TEORIA	
	A. Sistemas de fermentación	
	1. Fermentación por lotes	2
	2. Fermentación por lote alimentado	3
	3. Fermentación continua	3
	B. Cinética de las fermentaciones por lote alimentado	
	1. Tipos de alimentación	5
	2. Ecuaciones del cultivo por lote alimentado	6
	3. Cultivo por lote alimentado con alimentación constante	7
	4. Cultivo por lote alimentado con alimentación exponencial	10
	C. Operación básica de los sistemas de fermentación por lote alimentado	
	1. Formulación y condición óptima del medio	11
	2. Diseño de la fermentación	11
	3. Fermentación y control del proceso	11
	D. Aspectos generales de la producción de ácido láctico	
	1. Generalidades	11
	2. Tecnología de la producción del ácido láctico	12
III.	METODOLOGIA	
	A. Fermentación por lotes	
	1. Preparación del inóculo	18
	2. Formulación del sustrato	18
	3. Esterilización del fermentador	18
	4. Esterilización del sustrato	18
	5. Fermentación y control del proceso	19
	B. Fermentaciones por lote alimentado	
	1. Preparación del inóculo	19
	2. Formulación del sustrato	19
	3. Esterilización del fermentador	19
	4. Elección de las condiciones iniciales de trabajo	19
	5. Esterilización del sustrato	20
	6. Fermentación y control del proceso	20
IV.	RESULTADOS	
	A. Análisis de la fermentación por lotes	
	1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento máxima y del rendimiento en células del sustrato limitante	22

	Páginas	
2.	Determinación del peso y del rendimiento total de lactato de sodio	22
3.	Determinación de la productividad	22
B.	Análisis de las fermentaciones por lote alimentado	
1.	Determinación de la velocidad específica de crecimiento máxima y del rendimiento en células del sustrato limitante	23
2.	Determinación del peso y del rendimiento total de lactato de sodio	23
3.	Determinación de la productividad	23
V.	DISCUSION DE RESULTADOS	
A.	Fermentación por lotes	37
B.	Fermentaciones por lote alimentado	37
VI.	TRATAMIENTO DE DESECHOS DE LA INDUSTRIA LACTEA EN GUATEMALA: LA FERMENTACION DEL SUERO DE QUESO HACIA PRODUCTOS APROVECHABLES COMO UNA ALTERNATIVA	
A.	Las materias primas	40
B.	La fermentación y la recuperación del producto	43
VII.	CONCLUSIONES	45
VIII.	RECOMENDACIONES	46
IX.	BIBLIOGRAFIA	47
	APENDICES	
A.	Métodos analíticos	49
B.	Manual de operaciones para el fermentador discontinuo del laboratorio de Operaciones Unitarias	53

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Páginas
2.1	Análisis de un medio nutriente típico	10
2.2	Microorganismos que fermentan varios carbohidratos	12
2.3	Condiciones típicas para la producción de ácido láctico	14
2.4	Comparación de productividades y conversiones entre varios tipos de fermentadores	16
4.1	Fermentación por lotes: concentración de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio en función del tiempo	24
4.2	Primera fermentación por lote alimentado: concentración de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio en función del tiempo	28
4.3	Segunda fermentación por lote alimentado: concentración de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio en función del tiempo	32
4.4	Análisis de las fermentaciones: resultados	36
6.1	Requerimiento anual de leche para la elaboración de quesos desuerados y producciones anuales de queso y suero por industria láctea en Guatemala (datos de julio de 1990)	42

## LISTA DE GRAFICAS

Gráfica		Páginas
4.1	Fermentación por lotes: azúcar residual vrs. tiempo	25
4.2	Fermentación por lotes: biomasa vrs. tiempo	26
4.3	Fermentación por lotes: lactato de sodio vrs. tiempo	27
4.4	Primera fermentación por lote alimentado: azúcar residual vrs. tiempo	29
4.5	Primera fermentación por lote alimentado: biomasa vrs. tiempo	30
4.6	Primera fermentación por lote alimentado: lactato de sodio vrs. tiempo	31
4.7	Segunda fermentación por lote alimentado: azúcar residual vrs. tiempo	33
4.8	Segunda fermentación por lote alimentado: biomasa vrs. tiempo	34
4.9	Segunda fermentación por lote alimentado: lactato de sodio vrs. tiempo	35

## I. INTRODUCCION

Como trabajo de graduación, en 1988 dos estudiantes de la Universidad del Valle de Guatemala diseñaron y construyeron un fermentador discontinuo para el cultivo de biomasa microbiana, evaluando su funcionamiento en condiciones de temperatura ambiente y anaerobiosis, y preparando el manual de operaciones del mismo.

Con el interés puesto en el área de la biotecnología, en este trabajo se continuó haciendo estudios con el fermentador diseñado entonces, siendo sus objetivos los siguientes:

- ❖ Operar el fermentador discontinuo como un fermentador por lote alimentado (fed-batch), a temperatura mayor que la ambiente y en régimen anaeróbico.
- ❖ Demostrar que al operar el fermentador en esta forma se logran mayores rendimientos y productividades que haciéndolo por lotes.

La fermentación experimental seleccionada fue la del ácido láctico usando suero de queso, con la conversión del ácido en lactato de sodio. Se trabajó con *Lactobacillus bulgaricus* como microorganismo responsable de la fermentación. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , ph  $5.6 \pm 0.2$ , y para lograr las condiciones anaeróbicas se inyectó dióxido de carbono al fermentador.

La razón por la que se seleccionó esta fermentación fue porque no sólo se deseaba cumplir con los objetivos indicados arriba, sino también se quería evaluar un proceso que pudiera ser de utilidad.

El suero de queso es un desecho de las industrias lácteas que constituye una carga de contaminación. En este trabajo se pretendió determinar si la fermentación del suero de queso era una alternativa viable para utilizar este desecho obteniendo un producto aprovechable como lo es el lactato de sodio. Es por ello que al final de la parte experimental se incluye un breve análisis en donde se evalúan los principales aspectos a considerar, si se deseara llevar a cabo esta fermentación a nivel industrial.

## II. TEORIA

### A. Sistemas de fermentación

Las fermentaciones pueden llevarse a cabo en tres formas:

- por lotes (batch)
- por lote alimentado (fed-batch)
- en continuo

1. Fermentación por lotes. Ha sido el tipo de fermentación más usado en la industria debido principalmente a las siguientes ventajas:

- es muy versátil, pudiéndose utilizar en varios tipos de fermentaciones;
- los fermentadores que se usan son de operación y mantenimiento fáciles y de construcción sencilla;
- se mantienen condiciones asépticas durante toda la fermentación, no importando el tiempo que ésta dure.

Sus desventajas más notables son:

- los fermentadores necesitan un equipo de control complejo debido a los cambios que ocurren en las condiciones de la fermentación durante la reacción;
- pueden haber variaciones en la calidad del producto entre un lote y otro;
- hay pérdida de tiempo en el proceso de limpiar, esterilizar y preparar cada lote (Atkins, 1974).

Los fermentadores que se utilizan en los sistemas por lotes consisten básicamente en un tanque con:

- una entrada para vertir el sustrato y el cultivo,
- una salida para descargar el producto,
- entradas auxiliares para ácido, base, etc.,
- un dispositivo para agitar el caldo,
- una salida de muestras,
- entradas para electrodos, termómetros, etc.,
- una chaqueta por la cual circula agua y/o vapor para mantener la temperatura controlada, y
- una entrada de aire u otro gas

Los fermentadores más sofisticados poseen controles y detectores automáticos para los parámetros de la fermentación (pH, temperatura, nivel de espuma, etc.).

2. Fermentación por lote alimentado. Las fermentaciones por lote alimentado son básicamente iguales a las fermentaciones por lotes, con la diferencia que se le agrega, al fermentador, una corriente de alimentación que contiene uno o más nutrientes. Al no existir una corriente de descarga se tiene como consecuencia un aumento continuo del volumen del medio de cultivo durante toda la fermentación. La corriente de alimentación contiene el sustrato limitante y puede, al mismo tiempo, aportar otros nutrientes al cultivo. El flujo de alimentación puede ser constante o una función del tiempo.

Los estudios que se tienen sobre los sistemas por lote alimentado indican que éstos incrementan las productividades de las tradicionales fermentaciones por lotes.

En general, las fermentaciones por lote alimentado resultan más ventajosas que las fermentaciones por lotes cuando es necesario efectuar un cierto control sobre la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. En un sistema por lote alimentado, ésto se puede lograr por medio de la corriente de alimentación controlando la disponibilidad de nutrientes dentro del fermentador. Esta misma característica hace posible el uso de estos sistemas en la producción de metabolitos primarios y secundarios.

Para las fermentaciones por lote alimentado se utilizan los mismos fermentadores que se usan en los sistemas por lotes, a los cuales sólo es necesario adaptarles una entrada para la alimentación.

Las condiciones iniciales de una fermentación por lote alimentado se logran a través de una etapa previa obligatoria de fermentación por lote. Una vez alcanzadas estas condiciones se inicia la alimentación, lo cual marca el principio de la fermentación por lote alimentado (Gentina, 1981).

3. Fermentación continua. La gran mayoría de los procesos microbiales han sido desarrollados al utilizar fermentaciones por etapas. Esto es debido en parte a los problemas operacionales que se presentan, principalmente cuando se está trabajando con un proceso nuevo, el cual se podrá adaptar después a un proceso continuo en una etapa de desarrollo más avanzada.

Esta tendencia a convertir un proceso por etapas a uno continuo ha contribuido al diseño de fermentadores más eficientes. Las razones por las cuales los procesos continuos se han ido adoptando en la mayoría de las operaciones a gran escala son:

- reducen los costos de mano de obra debido a la eliminación de ciertas operaciones, tales como el llenado y vaciado repetidos de un fermentador por etapas y la esterilización *in situ*;
- le son fácilmente adaptables controles automáticos, lo que puede dar como resultado una reducción de costos;
- durante la operación en continuo, todos los microorganismos están expuestos a las mismas condiciones, lo cual reduce la variedad de subproductos;

- hay una carga estable de servicios requeridos por el proceso (aire, vapor, agua, etc.) (Atkins, 1974).

Hay tres tipos principales de fermentadores que se usan en los sistemas continuos:

a) **Fermentador continuo de tanque agitado.** Es básicamente igual a un fermentador por etapas, excepto porque deben añadirse los mecanismos para alimentación y descarga. La diferencia fundamental estriba en que el contenido del fermentador se mantiene en estado estable, es decir que no varía con el tiempo. En este fermentador el sustrato es alimentado a la misma tasa con que sale el cultivo, y el volumen se mantiene constante de alguna forma.

La mayor desventaja que presenta el fermentador continuo de tanque agitado es la pérdida de alimentación no convertida a producto. Esto se debe a la salida continua de sustrato a través de la descarga. Este problema se puede resolver introduciendo al sistema un mecanismo de recirculación, o bien, con el uso de varios reactores de tanque agitado colocados en serie (Atkins, 1974; Bjurstrom, 1985; Herbert, 1961; Demain y Solomon, 1986).

b) **Fermentador de torre.** Es un fermentador de lecho fluidizado del cual hay muchas variedades, siendo el más importante el de columna burbujeadora (airlift). Es el fermentador más grande usado comercialmente. No utiliza agitación mecánica sino que la acción del aire inyectado por la parte inferior provee la potencia requerida.

Sus ventajas están relacionadas con su geometría y flujo circular del fluido:

- hay una mejor transferencia de oxígeno debido al efecto de cabeza estática;
- se reduce el peligro de contaminación debido a que no tiene el eje de un agitador que atraviese la carcasa del cuerpo del fermentador.

Sus desventajas potenciales están relacionadas con su operación:

- a medida que los microorganismos circulan en el fermentador, encuentran variedad de condiciones cambiantes; el diseño hidráulico de este fermentador hace que sea imposible mantener niveles consistentes de sustrato y especialmente de oxígeno en toda su estructura;
- las entradas de la alimentación y del aire deben ser diseñadas de modo que minimicen las condiciones extremas para los microorganismos, a medida que circulan por el fermentador;
- la salida del producto debe elegirse de manera que se haga mínima la pérdida de nutrientes (Bjurstrom, 1985).

c) **Fermentador de células inmobilizadas.** Es un fermentador tubular en el cual las células están atrapadas dentro de una matriz inerte que permite que los nutrientes y el oxígeno entren en ella y los productos salgan sin llevarse las células. Este es el tipo de fermentador más útil cuando el producto es extracelular (Bjurstrom, 1985).

## B. Cinética de las fermentaciones por lote alimentado

1. Tipos de alimentación. Para que los microorganismos se multipliquen necesitan los nutrientes adecuados y las condiciones ambientales favorables.

La velocidad con que las células utilizan el nutriente limitante es proporcional a:

- la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las células,
- la concentración de biomasa ( $X$ ), y
- al volumen del cultivo ( $V$ ),

definidos en un momento dado. Y esta velocidad es inversamente proporcional al rendimiento en células del sustrato limitante ( $Y_{x/s}$ ). Esta velocidad de consumo se denomina demanda de nutrientes y se expresa:

$$\text{demanda de nutrientes, en g/h} = \mu X V / Y_{x/s} \quad (1)$$

Según la ecuación (1), la demanda de nutrientes puede aumentar o disminuir dependiendo del valor de la velocidad específica de crecimiento. Si ésta es máxima, el valor de la demanda será máximo. Por otro lado es una función de la concentración de sustrato limitante en el cultivo.

El cultivo por lote alimentado hace uso de esta característica para ejercer un control sobre la velocidad específica de crecimiento del microorganismo a través de la alimentación, la cual proporciona el nutriente limitante al cultivo. De esta forma, controlando la velocidad de entrada del nutriente se podrá mantener una concentración en el cultivo que no exceda o que no sea inferior a la adecuada requerida por el proceso que se lleva a cabo. Esta velocidad de entrada se denomina oferta de nutrientes, y se expresa:

$$\text{oferta de nutrientes, en g/h} = f_v S_f \quad (2)$$

donde:

$f_v$  = flujo de alimentación al fermentador, en L/h

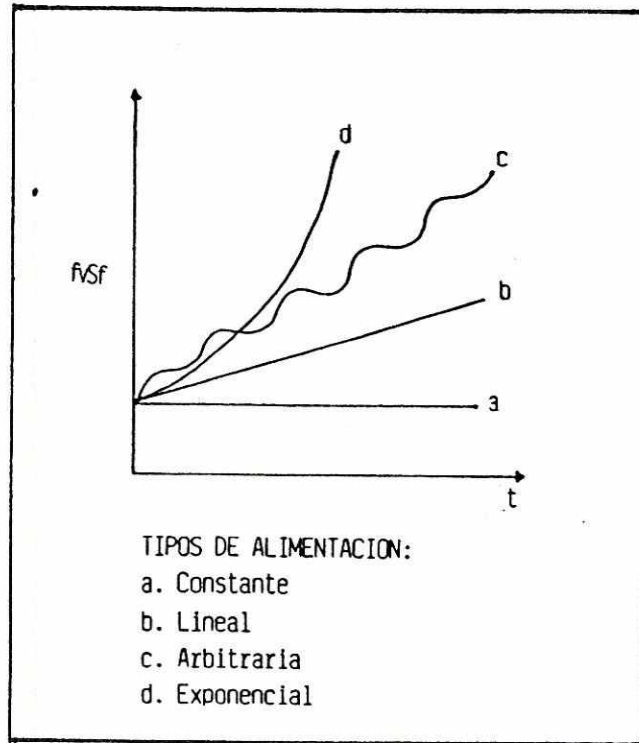
$S_f$  = concentración del sustrato limitante en la corriente de alimentación, en g/L

Con base en la oferta y la demanda se pueden dar dos situaciones con la velocidad específica de crecimiento del microorganismo:

- si la oferta es igual o mayor que la demanda, la biomasa crecerá a su velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ );
- si la oferta es menor que la demanda, la biomasa crecerá a una velocidad específica de crecimiento menor que la máxima.

Según el tipo de alimentación, la oferta puede asumir distintas funciones con el tiempo, tal como se muestra en la figura 2.1.

FIGURA 2.1  
OFERTA DE NUTRIENTES PARA DISTINTOS  
TIPOS DE ALIMENTACION



2. Ecuaciones del cultivo por lote alimentado. Para llegar a obtener las ecuaciones del cultivo por lote alimentado se debe suponer que:

- el rendimiento en células del sustrato limitante ( $Y_{x/s}$ ) es constante durante toda la fermentación;
- el consumo de sustrato para mantenimiento es despreciable;
- el aumento de volumen en el fermentador es igual al volumen de solución nutriente alimentada.

Los factores de rendimiento en células y producto se definen como la biomasa (X) o producto (P) formados por unidad de sustrato consumido (S). Definiendo  $X_0$ ,  $P_0$  y  $S_0$  como las concentraciones iniciales de biomasa, producto y sustrato limitante, respectivamente, se tiene que:

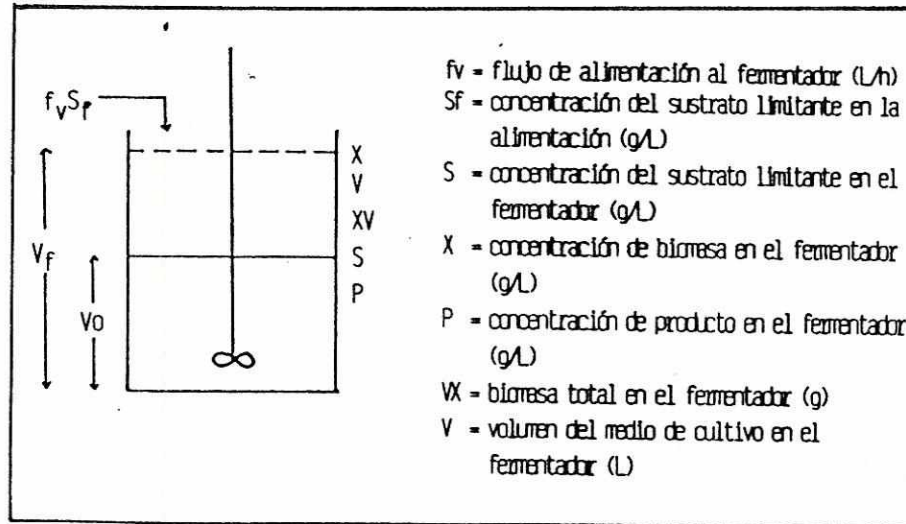
$$Y_{x/s} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad (3)$$

$$Y_{p/s} = (P - P_0) / (S_0 - S) \quad (4)$$

Estos factores se calculan a partir de análisis cuantitativos, antes y durante la fermentación.

En la figura 2.2 se muestra la operación de un sistema de fermentación por lote alimentado.

FIGURA 2.2  
REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UN CULTIVO  
POR LOTE ALIMENTADO



De los balances de masa se obtienen las siguientes ecuaciones:

- Velocidad de cambio de volumen de cultivo

$$dV / dt = f_v(t) \quad (5)$$

- Velocidad de cambio de biomasa total en el fermentador

$$d(SV) / dt = u V X \quad (6)$$

- Velocidad de cambio del sustrato limitante total en el fermentador

$$d(SV) / dt = f_v S_f - (u V X) / Y_{x/s} \quad (7)$$

3. Cultivo por lote alimentado con alimentación constante. En este caso  $f_v$  y  $S_f$  son dados y constantes. Una fermentación por lote alimentado puede dividirse en dos fases. Durante la primera fase, en la cual se está llevando a cabo una fermentación por lotes, la oferta es mayor que la demanda y la velocidad específica de crecimiento tiende a ser máxima. Sin embargo, a medida que transcurre la fermentación, la demanda por el nutriente limitante aumentará, puesto que así lo hace la biomasa. Dado que la oferta es constante, llegará el momento en el que la

demanda será igual a la oferta y de ahí en adelante, una vez consumido el sustrato acumulado, la biomasa tendrá que disminuir su velocidad específica de crecimiento para adecuar su velocidad de consumo a la entrada del nutriente. De este modo se distinguen dos fases:

- la primera de crecimiento exponencial (oferta mayor que demanda); y
- la segunda de crecimiento lineal (oferta menor que demanda).

Para la primera fase, las condiciones iniciales son  $X_0$ ,  $V_0$  y  $S_0$ . Dada la condición de alimentación constante, se pueden integrar las ecuaciones (5) y (7), obteniéndose:

$$V = V_0 + f_V t \quad (9)$$

$$V (S + X / Y_{X/S}) = f_V S_f t + S_0 V_0 + X_0 V_0 / Y_{X/S} \quad (10)$$

Con lo anterior se puede entrar a analizar cada una de las fases de crecimiento por separado.

a) **Fase de crecimiento exponencial de la biomasa.** En esta fase se cumple que  $S$  es mucho mayor que  $K_s$ , con lo cual se puede integrar la ecuación (6), obteniéndose:

$$V X = X_0 V_0 e^{u_{max} t} \quad (11)$$

La velocidad específica de crecimiento tiende a ser máxima y está regida por la ecuación:

$$u = (1/X) (dX/dt) \quad (12)$$

Usando las ecuaciones (9) y (11) se obtiene la relación que rige el valor de la concentración de la biomasa para esta fase:

$$X = X_0 V_0 e^{u_{max} t} / V_0 + f_V t \quad (13)$$

Usando las ecuaciones (10) y (11) se llega a:

$$S = \frac{f_V S_f t + S_0 V_0 + (X_0 V_0 / Y_{X/S}) (1 - e^{u_{max} t})}{V_0 + f_V t} \quad (14)$$

b) **Fase de crecimiento limitado de biomasa.** En esta fase se tiene que la concentración de sustrato en el medio de cultivo disminuye como consecuencia de que la demanda máxima ha sobrepasado la oferta del nutriente limitante. Esta situación lleva a que el valor numérico de  $S$  se haga despreciable frente al de  $X$ , con lo cual la ecuación (10) puede modificarse dando:

$$V X = f_V S_f t (Y_{X/S}) + S_0 V_0 (Y_{X/S}) + X_0 V_0 \quad (15)$$

Para conocer la variación de la velocidad específica de crecimiento respecto del tiempo, se usa la ecuación (15) deducida y la ecuación (6):

$$u = \frac{f_V S_f (Y_{X/S})}{f_V S_f t (Y_{X/S}) + S_0 V_0 (Y_{X/S}) + X_0 V_0} \quad (16)$$

Usando las ecuaciones (16) y (9) se llega a:

$$X = \frac{f_V S_f t (Y_{X/S}) + S_0 V_0 (Y_{X/S}) + X_0 V_0}{V_0 + f_V t} \quad (17)$$

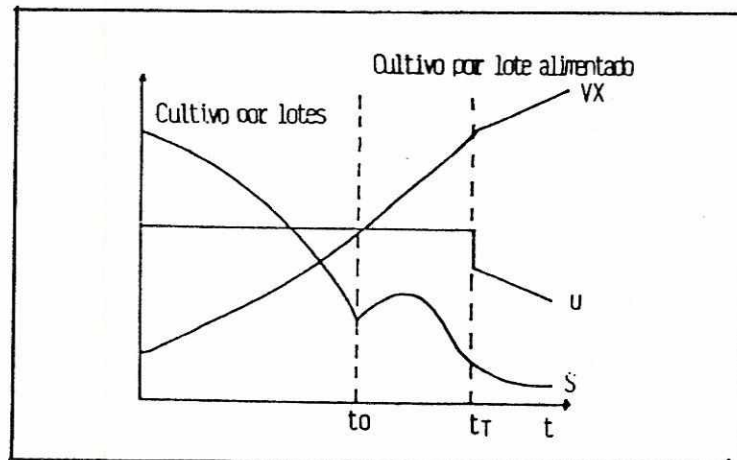
Finalmente, usando las ecuaciones (16) y (8) se obtiene:

$$S = \frac{f_V S_f (Y_{X/S}) K_s}{[f_V S_f (Y_{X/S}) (u_{\max} t - 1)] + \{[S_0 V_0 (Y_{X/S}) + X_0 V_0] u_{\max}\}} \quad (16)$$

c) Tiempo de transición (T) entre las fases de crecimiento exponencial y limitada. Para el tiempo de transición debe cumplirse que la cantidad de biomasa (VX) debe ser igual, tanto en la fase exponencial como en la limitada.

En la figura 2.3 se muestra gráficamente el comportamiento de la biomasa, la velocidad específica de crecimiento y la concentración del sustrato durante una fermentación por lote alimentado. Para la fase de crecimiento lineal de la biomasa se observa que, tanto la velocidad específica de crecimiento como la concentración de sustrato disminuyen en una razón inversamente proporcional con el tiempo de fermentación.

FIGURA 2.3  
VARIACION DE BIOMASA (VX), VELOCIDAD ESPECIFICA DE  
CRECIMIENTO (u) Y CONCENTRACION DE SUSTRATO (S) EN  
UN CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO



4. Cultivo por lote alimentado con alimentación exponencial. En este caso la biomasa crece a una velocidad específica de crecimiento constante durante todo el cultivo, y la variable a determinar es la función oferta para satisfacer esta condición, considerando  $S_f$  constante.

De acuerdo a la relación de Monod, para que un cultivo crezca a una velocidad específica constante, la concentración del sustrato limitante debe ser constante. De esta manera se necesita que, durante toda la fermentación por lote alimentado, la concentración de sustrato limitante en el fermentador sea constante ( $S_f$ ).

### C. Operación básica de los sistemas de fermentación por lote alimentado

1. Formulación y condición óptima del medio. Para muchas fermentaciones hay disponible un medio químicamente definido, pero para otras la formulación del medio debe hacerse con base en conocimientos basados en la experiencia previa con sistemas similares.

La elección del nutriente limitante depende del proceso que se desea estudiar. Las soluciones nutrientes son usualmente de alguna complejidad química. Típicamente contienen:

- una fuente de carbono (carbohidratos, hidrocarburos, etc.);
- factores de crecimiento (extracto de levaduras, triptona, aminoácidos, vitaminas, minerales, etc.); y
- sustancias amortiguadoras.

(Atkinson, 1974; Demain y Solomon, 1986).

En el cuadro 2.1 se muestra el análisis de un medio nutriente típico.

**Cuadro 2.1**  
**Análisis de un medio nutriente típico**

	Concentración (% p/v)
Sólidos totales	12.50
Azúcares fermentables	9.00
Oxido de potasio	0.60
Oxido de fósforo	1.10
Oxido de calcio	0.05
Oxido de magnesio	0.25
Oxido de azufre	0.15
Oxido de silicio	0.15
Nitrógeno total	0.90
Cenizas totales	2.05

2. Diseño de la fermentación. Para llevar a cabo el diseño de una fermentación por lote alimentado se necesita que antes se determinen los parámetros cinéticos de crecimiento, específicamente  $u_{max}$  y  $Y_{x/s}$ . Para obtener dichos parámetros, previamente se realiza una fermentación por lotes. Es necesario disponer de métodos para cuantificar las concentraciones de biomasa, fuente de carbono y producto. Con base en los datos aquí obtenidos se diseña toda la fermentación. Se deberá definir:

- el volumen inicial de medio en el fermentador
- las condiciones iniciales en cuanto a concentración de biomasa y fuente de carbono
- el flujo de alimentación al fermentador ( $f_v$ )
- la concentración de la fuente de carbono en la alimentación ( $S_f$ )
- otras variables de operación

(Gentina, 1981)

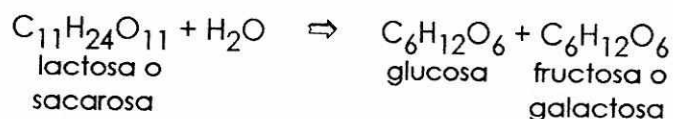
3. Fermentación y control del proceso. Para realizar una fermentación por lote alimentado es necesario llevar a cabo, previamente, una etapa de propagación por lote, al final de la cual se procede a iniciar la alimentación del cultivo. Durante toda la fermentación se debe medir las concentraciones de biomasa, fuente de carbono y producto. Es necesario llevar un control sobre las condiciones de operación tales como pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, etc. Los resultados se analizan con base en las ecuaciones que modelan las fermentaciones por lote alimentado (Gentina, 1981).

#### D. Aspectos generales de la producción de ácido láctico

1. Generalidades. El ácido láctico es un ácido orgánico cuya ocurrencia en la naturaleza es muy extensa. En 1881, Charles E. Avery lo produjo comercialmente por primera vez, pero no tuvo éxito al querer venderlo como sustituto de la crema tártara en polvos de hornear.

Hacia 1942, casi el 50% de la producción de ácido láctico se utilizaba en la industria del cuero y un 20% se empezaba a utilizar en la industria de alimentos. En la actualidad, más del 50% del ácido láctico producido se usa en la industria alimenticia como acidulante y preservante.

Actualmente, alrededor de la mitad de la producción mundial del ácido láctico se obtiene por medio de fermentación, mediante la reacción:





(Moo-Young, 1985; Faith et al, 1957)

2. Tecnología de la producción del ácido láctico.

a) **Microorganismos.** Hay varias especies de bacterias y hongos capaces de producir cantidades relativamente altas de ácido láctico a partir de carbohidratos; el tipo de microorganismo a seleccionar depende del carbohidrato a fermentar. En el cuadro 2.2 se listan varios microorganismos que fermentan los carbohidratos allí indicados.

**Cuadro 2.2**  
**Microorganismos que fermentan varios carbohidratos**

Carbohidrato	Microorganismos que lo fermentan
Lactosa	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Streptococcus lactis</i>
Glucosa o maltosa	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Glucosa	<i>Rhizopus oryzae</i>
Xilosa	<i>Lactobacillus pentoaceticus</i>
Almidón	<i>Lactobacillus amylophilus</i>

En la actualidad, los microorganismos usados industrialmente para la producción de ácido láctico son en su mayoría bacterias lácticas homofermentativas de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*.

Los microorganismos industrialmente importantes crecen en condiciones óptimas de temperatura arriba de los 40°C y valores de pH entre 5 y 7. Las fermentaciones para la producción de ácido láctico se llevan a cabo en sistemas anaerobios, pero los microorganismos usados con aerobios facultativos, lo que hace innecesaria la exclusión estricta del aire. Debido a las altas temperaturas, la baja concentración de oxígeno, la alta concentración de lactato y los bajos valores de pH, la contaminación no es usualmente un problema severo. El problema más serio que se enfrenta es el crecimiento de bacterias productoras de ácido butírico al final de la fermentación.

Las bacterias lácticas tienen requerimientos nutricionales muy complejos, especialmente en lo que respecta a vitamina B. Estos requerimientos se pueden obtener enriqueciendo el medio con extracto o germen de malta.

En general, las características que debe tener un microorganismo para fermentar sustratos y producir ácido láctico a nivel industrial son:

- tener habilidad para fermentar sustratos baratos rápida y completamente con una cantidad mínima de compuestos nitrogenados, y
- tener habilidad para dar altos rendimientos de ácido láctico bajo las condiciones de pH bajo y temperaturas altas, con la producción de cantidades pequeñas de masa celular y cantidades insignificantes de otros subproductos (Moo-Young, 1985; Atkinson y Mavituna, 1983).

b) Las materias primas. Entre los sustratos usados más comúnmente para la producción de ácido láctico están el azúcar de caña o remolacha, la maltosa y la glucosa a partir de almidones hidrolizados. El suero de los productos lácteos es un material de desecho que se ha propuesto y ensayado con anterioridad como una materia prima para producir ácido láctico y, aparentemente, es un material atractivo. Es el residuo que drena del cuajo en la manufactura del queso y está compuesto por:

93% de agua  
4 a 5% de lactosa  
0.7% de proteína  
0.3% de grasas  
0.5% de sales minerales

con variaciones ligeras dependiendo de la fuente.

Se requieren 10 litros de leche para producir 1 kilogramo de queso, obteniéndose 9 litros de suero como subproducto. El consumo mundial de queso es de aproximadamente de 7 a 8 millones de toneladas al año, dando como resultado de 4 a 5 millones de toneladas de sólidos de suero. Aproximadamente del 50 al 60% del suero se utiliza como alimento animal y alimentos procesados como helados, pero el remanente, de casi 2 millones de toneladas de lactosa, es un desecho que presenta un problema de disposición para las industrias lácteas. Se ha estimado que si se descargan 1000 galones diarios de suero, la carga de desechos impuesta sería equivalente a la de 1800 personas (Moo-Young, 1985; Atkinson y Mavituna, 1983; Hacking, 1987).

Otras materias primas importantes en la producción de ácido láctico son suplementos nutricionales ricos en nitrógeno, para ayudar a un crecimiento más rápido de los microorganismos. Entre estas fuentes de nitrógeno se pueden mencionar: extracto y germen de malta, extracto de levaduras, leche sin desnaturalizar, licores de cebada y maíz y melaza de caña. Ocasionalmente se requieren minerales adicionales.

Para neutralizar el ácido formado durante la fermentación se utilizan carbonatos o hidróxidos de calcio o sodio, dependiendo de la sal que se desee obtener.

c) **Procesos de la fermentación.** La fermentación por etapas ha sido el método utilizada industrialmente para la producción de ácido láctico, si bien las fermentaciones continuas han ganado popularidad en los últimos años.

Las condiciones para la fermentación difieren de un productor industrial a otro, así como del microorganismo elegido. En el cuadro 2.3 se muestran las condiciones típicas para la producción de ácido láctico.

**Cuadro 2.3**  
**Condiciones típicas para la producción de ácido láctico**

Condición	Rango
Concentración inicial de carbohidrato	5 - 15 %
Temperatura / pH	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	45-60°C/ 5 - 6.5
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	44-46°C/ 5.6
<i>Rhizopus</i>	30-50°C/ < 6.0
Volumen de inóculo respecto del total	5 - 10 %

El inóculo se propaga de un tubo de cultivo hacia un recipiente de 500 mL, luego hacia uno de 6 L que contenga 3 L de medio, y entonces hacia un tanque de cultivo.

Durante la fermentación el ácido láctico formado se neutraliza con carbonato o hidróxido de calcio o sodio para mantener el pH deseado. Si el ácido no se neutraliza se desarrolla una acidez muy alta la cual no pueden tolerar las bacterias lácticas y la fermentación queda incompleta. El agente neutralizante se puede añadir en exceso como solución al principio de la fermentación, o intermitentemente durante el transcurso de la misma, con base en el pH o en las medidas estequiométricas.

El tiempo de fermentación es de 1 a 2 días para un medio con 5% de azúcares (tal como el suero de leche), y de 2 a 6 días para un medio con 15% de azúcares.

Las productividades de los reactores se hallan alrededor de 1 a 3 Kg/m<sup>3</sup>h. El rendimiento de ácido láctico suele ser de 90 a 95% (p/p) basado en la concentración inicial de carbohidrato.

La fermentación se considera completa cuando la concentración de azúcares residuales cae al 0.1%. El rendimiento de masa celular puede ser tan grande como el 30% (p/p), pero generalmente es menor del 15% (p/p), basado en la concentración inicial de carbohidrato. Este rendimiento depende de la cantidad de nutrientes nitrogenados usados.

Al final de la fermentación, el caldo se calienta a 80-100°C para destruir las bacterias (Moo-Young, 1985; Atkinson y Mavituna, 1983).

d) **Uso de fermentadores continuos en la producción de ácido láctico.**

Las pruebas y estudios que se han hecho para la producción de ácido láctico utilizando fermentadores de este tipo, han demostrado que éstos ofrecen mayores ventajas que los fermentadores por etapas. Las productividades pueden duplicarse, pero usualmente la utilización del sustrato es incompleta.

Se han llevado a cabo diversas fermentaciones en continuo utilizando suero de leche. Whittler y Rogers (1931) realizaron fermentaciones de suero de leche dulce, y, con un tiempo de residencia de un día, obtuvieron un 90% de rendimiento de ácido láctico con base en la concentración original de lactosa. La productividad del reactor fue de 2 - 2.5 Kg/m<sup>3</sup>h. El pH se mantuvo en 5.0 a 5.8 y no se notó contaminación en una corrida que duró dos semanas. Dicha fermentación, si bien se llevó a cabo en condiciones higiénicas, no fue aséptica.

Keller y Gerhardt (1975) llevaron a cabo fermentaciones de suero de leche en continuo, neutralizando el ácido formado con hidróxido de amonio. El microorganismo usado fue *Lactobacillus bulgaricus*. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura de 44°C, ph de 5.5, tiempo de residencia de 15 horas. La concentración residual de lactosa fue de 0.7%.

Mehaia y Cheryan (1987) llevaron a cabo fermentaciones continuas de suero de leche usando varios tipos de fermentadores. El microorganismo con el que trabajaron fue *Lactobacillus bulgaricus*. La temperatura se mantuvo en 45± 1°C y el pH en 5.6 ± 0.2, adicionando hidróxido de amonio 8N. El fermentador que les dio mejores resultados fue uno de reciclado de membrana, con el que obtuvieron productividades de 84 g/L h y conversiones del 99%.

En el cuadro 2.4 se muestra una comparación entre varios tipos de fermentadores para la producción de ácido láctico, en los cuales se utilizó lactosa como fuente de carbono y *Lactobacillus bulgaricus* como microorganismo responsable de la fermentación (Moo-Young, 1985; Mehaia y Cheryan, 1987).

**Cuadro 2.4**  
**Comparación de productividades y conversiones entre**  
**varios tipos de fermentadores**

Tipo de fermentador	Conversión (%)	Productividad (g/L h)
Por etapas	99	4 - 5
Continuo	73	11
De diálisis	97	11
Hollow fibre	26	2
Reciclo de membrana	99	84

e) Usos y aplicaciones del ácido láctico y sus derivados. El ácido láctico es usado en la industria alimenticia como preservante, acidulante y emulsificante. Además se usa en la producción de celofán, resinas, poliésteres, gomas, pinturas electrostáticas, tintas para textiles, plásticos biodegradables, herbicidas, fungicidas y pesticidas.

El ácido láctico se obtiene en cuatro grados:

- crudo, técnico o comercial, al 22, 44, 66 y 80%;
- comestible, al 50 y 80%;
- para plásticos, al 50 y 80%; y
- USP, al 75 y 85%

De las sales del ácido láctico, los lactatos de calcio y sodio son los más importantes. Ambos se pueden obtener como producto primario de la fermentación controlando el pH durante la misma al usar el carbonato o el hidróxido respectivo. También se pueden obtener mediante la neutralización del ácido láctico formado en la fermentación, usando siempre el carbonato o hidróxido que se necesite.

El lactato de calcio es usado en la industria farmacéutica como una fuente de calcio y como coagulante de la sangre.

El lactato de sodio se usa en la producción de algunos antibióticos, como tampón de algunas preparaciones farmacéuticas, humectante en la preparación de cosméticos, fuente de electrolitos en soluciones intravenosas y sueros orales, y, debido a su higroscopicidad, se ha usado para sustituir al glicerol como humectante y plastificante en el papel y en los textiles.

El lactato de sodio se vende en soluciones acuosas en grados técnico (al 50%) y comestible (al 50 y 60%). Es difícil obtener la sal cristalina, ya que es muy higroscópica y muy soluble en alcohol y agua.

El lactato de amonio crudo se usa como suplemento de proteínas en algunos alimentos para animales.

Los ésteres de alquilo del ácido láctico, tales como los lactatos de etilo, butilo e isopropilo, se usan en la fabricación de solventes, lubricantes, saborizantes, herbicidas, pesticidas, grasas criogénicas, drogas antiinflamatorias, lacas y tintas para escribir (Moo-Young, 1985; Faith et al, 1957).

### III. METODOLOGIA

Para llevar a cabo la fermentación por lote alimentado fue necesario practicar una por lote para así conocer los parámetros de la fermentación del suero de queso hacia lactato utilizando *Lactobacillus bulgaricus* (consumo de lactosa, crecimiento de biomasa, producción de lactato, velocidad específica de crecimiento y rendimiento en células del sustrato limitante).

#### A. Fermentación por lote

1. Preparación del inóculo. Se preparó un medio de cultivo consistente en 10% de leche descremada en polvo y 90% de agua destilada. Se sembró con 20 g/L de *Lactobacillus bulgaricus* proveniente de yogur búlgaro. Se incubó a 44°C durante 5 horas en un baño térmico y se guardó en un refrigerador a 4°C hasta el momento de usarlo. El volumen de inóculo respecto del volumen de sustrato en el fermentador fue de 6% (este volumen se seleccionó basándose en los datos del cuadro 2.3).

2. Formulación del sustrato. El suero de queso contiene alrededor de 5% de lactosa. Para la fermentación de este carbohidrato hacia ácido láctico, los *Lactobacillus bulgaricus* requieren de suplementos ricos en vitaminas del complejo B y minerales. Tomando esto en cuenta el suero de queso se suplementó con jalea real, melaza, fosfato monoácido de potasio, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso en las siguientes proporciones:

jalea real	7 g/L
melaza	3 g/L
fosfato monoácido de potasio	2 g/L
sulfato de magnesio	0.1 g/L
sulfato de manganeso	0.05 g/L

El pH se ajustó a  $5.6 \pm 0.2$  con ácido acético glacial.

3. Esterilización del fermentador. Se siguieron las instrucciones del manual de uso del fermentador (ver apéndice B).

4. Esterilización del sustrato. El suero de queso, proporcionado por Industrias Lácteas S.A., se obtuvo ya pasteurizado.

5. Fermentación y control del proceso.

a) Inicio de la fermentación. El fermentador se cargó con 50 L de sustrato ya formulado. El contenido se llevó a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  haciendo circular una mezcla de vapor y agua a través de la chaqueta del fermentador. Se hizo pasar dióxido de carbono a través del dispersador de gas para que, a la vez que agitara el medio, desalojara el aire, ya que esta fermentación es anaeróbica. Por último se sembró con 3 L de inóculo.

b) Control del pH y de la temperatura. Cada hora se tomaba una muestra para chequear el pH y la temperatura del cultivo. Cuando el pH bajaba se añadía hidróxido de sodio 2N para reajustarlo a  $5.6 \pm 0.2$ . Si la temperatura subía o bajaba se abría la entrada de agua o de vapor, dependiendo si se quería aumentar o disminuir la temperatura.

c) Control de los parámetros de la fermentación. A intervalos regulares de tiempo se tomaba una muestra de 100 mL de cultivo para determinar las concentraciones de lactosa, biomasa y lactato de sodio, usando los métodos analíticos descritos en el apéndice A.

d) Fin de la fermentación. Luego de 29 horas de fermentación se dio fin a ésta llevando el fermentador y su contenido a  $80^\circ\text{C}$  y descargándolo posteriormente.

B. Fermentaciones por lote alimentado

1. Preparación del inóculo. El inóculo se preparó de la misma forma que se hizo para la fermentación por lotes.

2. Formulación del sustrato. El sustrato se formuló de la misma forma que se hizo para la fermentación por lotes.

3. Esterilización del fermentador. Se siguieron las instrucciones del manual de uso del fermentador (ver apéndice B).

4. Elección de las condiciones iniciales de trabajo.

a) Elección del volumen inicial. El volumen inicial de sustrato en el fermentador se eligió con base en dos factores:

- que el volumen inicial estuviera por lo menos al nivel de la llave del tomamuestras para hacer posible la obtención de muestras en las primeras horas de fermentación, y

- que a una  $f_v$  dada (flujo de alimentación al fermentador) se lograra llegar al volumen final máximo permitido por la capacidad del fermentador (50L) en un tiempo adecuado.

Tomando en cuenta estos dos factores se eligió un volumen inicial de 27.27 L para las fos fermentaciones por lote alimentado.

b) Elección de  $f_v$ . El flujo de alimentación al fermentador,  $f_v$ , se determinó con base en la calibración del carboy del que se iba a alimentar al fermentador. Después de tres calibraciones se consiguió un  $f_v$  promedio de 1.22 L/h.

Habiendo elegido el volumen inicial de sustrato en el fermentador y  $f_v$ , se determinó que el tiempo aproximado de cada fermentación por lote alimentado sería de 19 horas.

5. Esterilización del sustrato. Se cargó el fermentador con 27.27 L de sustrato formulado. Inmediatamente después se ajustó el pH a  $5.6 \pm 0.2$  con ácido acético glacial.

6. Fermentación y control del proceso.

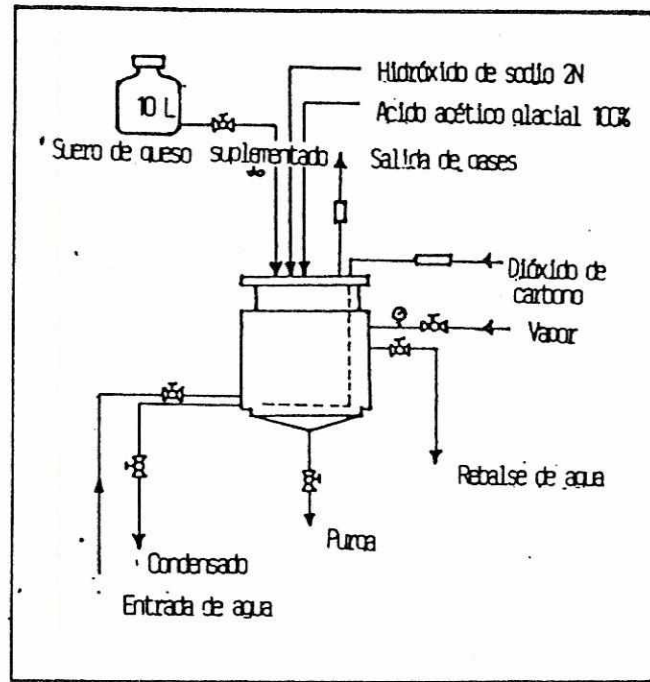
a) Inicio de la fermentación. El fermentador ya cargado se llevó a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  de la misma forma que se hiciera con la fermentación por lotes. Asimismo se hizo circular dióxido de carbono por el dispersador de gas para proveer agitación y condiciones anaeróbicas. Por último se sembró con 1.620 L de inóculo, correspondientes al 6% del volumen de sustrato con que se cargó el fermentador.

b) Control del pH y de la temperatura. Se llevó a cabo de la misma forma que con la fermentación por lotes.

c) Inicio y seguimiento de la fermentación por lote alimentado. Con base en los resultados que se iban obteniendo de los análisis de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio, se dio inicio a la fermentación por lote alimentado cuando dichos parámetros indicaron que el crecimiento tendía a ser máximo. En ese momento se abrió la entrada de la alimentación. El sistema utilizado se puede observar en la figura 3.1. Durante toda la fermentación se analizaron el azúcar residual, la biomasa y el lactato de sodio, y se controlaron el pH y la temperatura.

Luego que finalizó la alimentación de sustrato, se dejó que la fermentación siguiera por más tiempo hasta que el crecimiento de biomasa fuera en disminución y la formación de lactato tendiera a ser constante.

FIGURA 3.1  
DIAGRAMA DE FLUJO DEL SISTEMA DE FERMENTACION  
POR LOTE ALIMENTADO



d) Fin de la fermentación. Al darse las condiciones de biomasa y lactato de sodio mencionadas en el inciso anterior, el fermentador y su contenido se llevaron a 80°C y se descargó posteriormente.

## IV. RESULTADOS

En los cuadros 4.1, 4.2 y 4.3 se encuentran tabulados los datos de concentraciones de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio para cada fermentación llevada a cabo. Las gráficas 4.1 a la 4.9 corresponden a dichos resultados.

### A. Análisis de la fermentación por lotes

1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento máxima y del rendimiento en células del sustrato limitante. La velocidad específica de crecimiento máxima en la fase exponencial se calculó a partir de la ecuación 12 y de la gráfica 4.2. El resultado obtenido fue de 0.28.

El rendimiento en células del sustrato limitante al final de la fase exponencial se calculó usando la ecuación 3, siendo éste de 0.58.

2. Determinación del peso y del rendimiento total de lactato de sodio. El peso de lactato de sodio formado se calculó restando de la concentración de lactato al final de la fermentación, la concentración de lactato al inicio de la misma, y multiplicando este valor por el volumen de sustrato en el fermentador (50 L). El peso total que se obtuvo fue de 347.5 g.

En cuanto al rendimiento total de producto, se calculó usando la ecuación 4, siendo éste de 0.35.

3. Determinación de la productividad. La productividad se calculó dividiendo el peso de lactato de sodio formado, dentro del producto del volumen final de cultivo en el fermentador por el tiempo de fermentación:

$$\frac{\text{peso de lactato de sodio formado (g)}}{\text{volumen de cultivo (L) x tiempo (h)}}$$

El resultado obtenido fue de 0.244 g/L h, equivalente a 0.244 Kg/m<sup>3</sup> h.

## B. Análisis de las fermentaciones por lote alimentado

1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento máxima y del rendimiento en células del sustrato limitante. Utilizando las gráficas 4.5 y 4.7 y la ecuación 12 se calculó, para cada fermentación por lote alimentado, la velocidad específica de crecimiento máxima en la fase exponencial. Los valores obtenidos fueron 0.24 y 0.25 para la primera y la segunda fermentación, respectivamente.

Los rendimientos en células del sustrato limitante al final de la fase exponencial se calcularon usando la ecuación 3, dando como resultado 0.43 y 0.61 para la primera y segunda fermentación, respectivamente.

2. Determinación del peso y del rendimiento total de lactato de sodio. Para obtener el peso de lactato de sodio formado, se restó al producto de la concentración final de lactato por el volumen final de sustrato, el producto de la concentración inicial de lactato por el volumen inicial de sustrato. Los resultados fueron 646.5 y 764.4 g de lactato de sodio para la primera y segunda fermentación, respectivamente.

Los rendimientos totales de producto se calcularon usando la ecuación 4, siendo éstos de 1.1 para ambas fermentaciones.

3. Determinación de la productividad. La productividad se calculó de igual forma que para la fermentación por lotes, obteniéndose 0.344 y 0.573 g/L h ( $\text{Kg/m}^3 \text{ h}$ ), para la primera y segunda fermentación, respectivamente.

En el cuadro 4.4 se presenta los resultados.

Cuadro 4.1

Fermentación por lotes

Concentración de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio en función del tiempo

Volumen de sustrato: 50 L

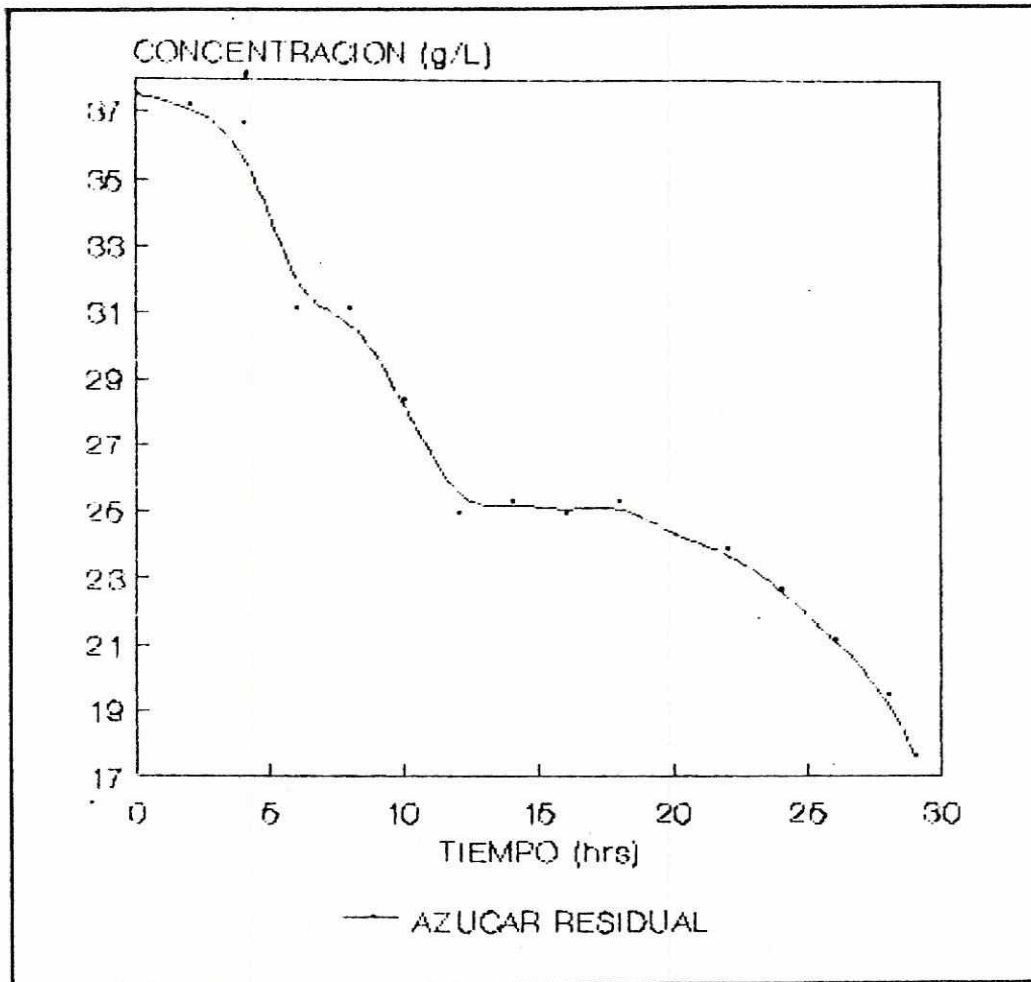
Volumen de inóculo: 3 L

TIEMPO (horas)	CONCENTRACION (g/L)		
	AZUCAR RESIDUAL	BIOMASA	LACTATO DE SODIO
0	37.51	4.475	15.69
2	37.18	4.393	15.91
4	36.65	4.230	15.91
6	31.11	4.630	15.91
8	31.11	5.070	16.14
10	28.38	4.048	16.36
12	24.97	4.963	16.58
14	25.34	5.073	16.58
16	24.97	4.580	16.58
18	25.34	5.315	17.26
20	24.27	12.085	17.71
22	23.84	9.528	19.50
24	22.69	8.285	19.72
26	21.15	7.533	22.07
28	19.49	7.340	22.41
29	17.61	7.210	22.64

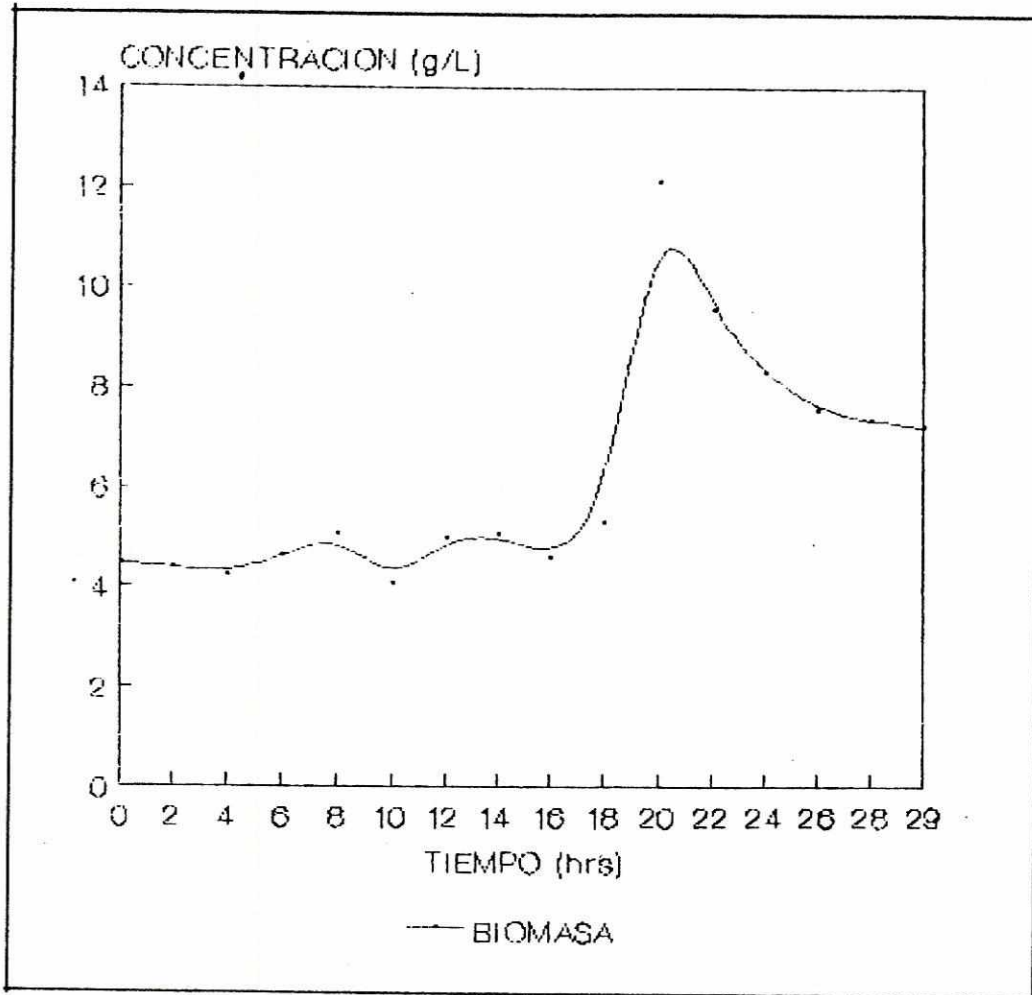
Gráfica 4.1

Fermentación por lotes

Azúcar residual vs. tiempo



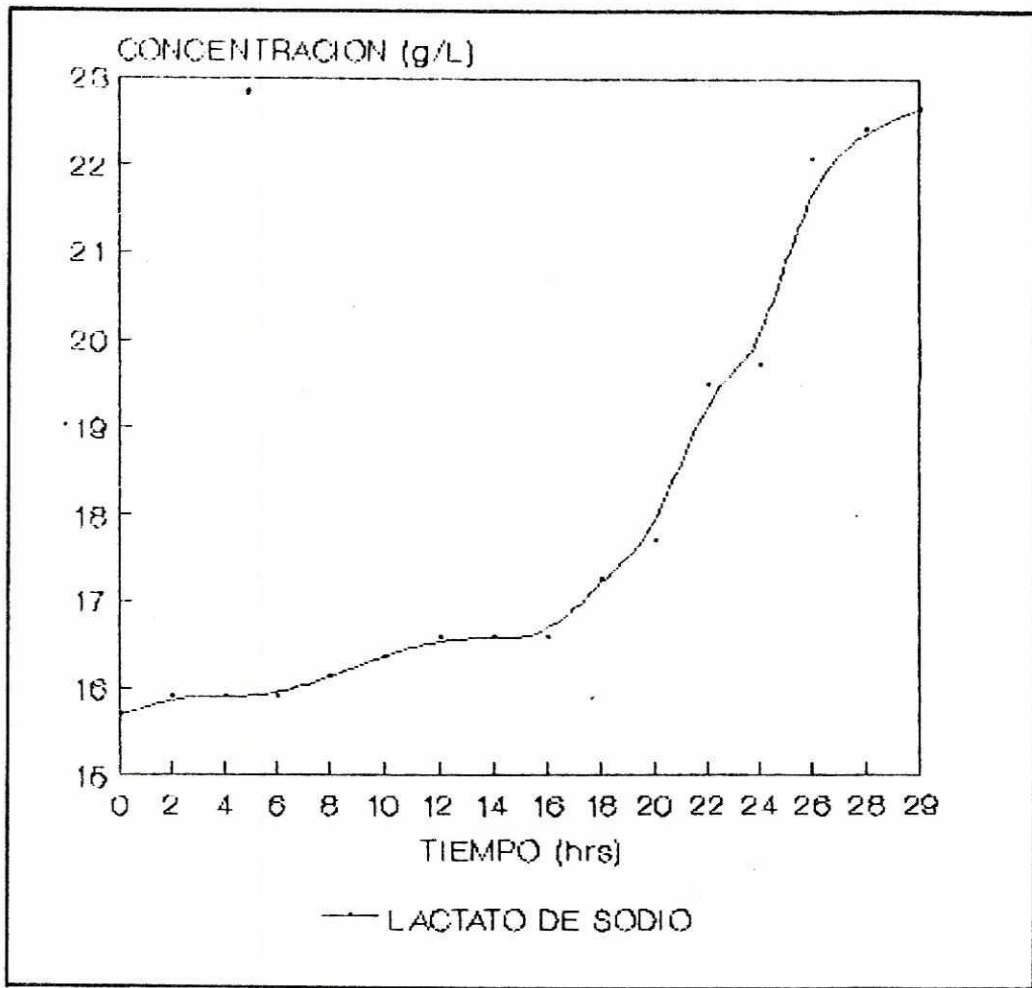
Gráfica 4.2  
Fermentación por lotes  
Biomasa vs. tiempo



Gráfica 4.3

Fermentación por lotes

Lactato de sodio vs. tiempo



Cuadro 4.2

Primera fermentación por lote alimentado

Concentración de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio en función del tiempo

Volumen inicial de sustrato: 27.27 L

Volumen final de sustrato: 47 L

Volumen de inóculo: 1.620 L

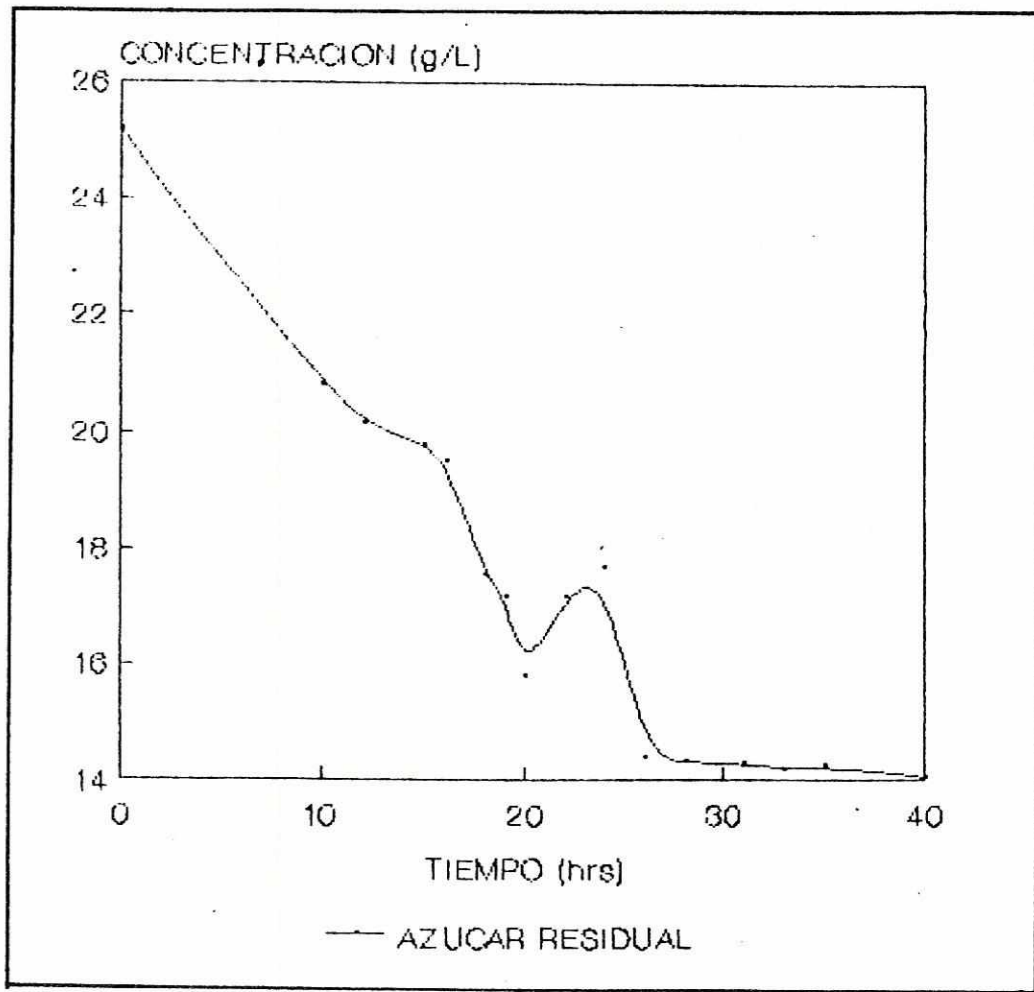
TIEMPO (horas)	CONCENTRACION (g/L)		
	AZUCAR RESIDUAL	BIOMASA	LACTATO DE SODIO
0	25.21	4.520	2.87
10	20.80	4.620	4.12
12	20.16	5.850	4.48
15	19.79	5.970	4.48
16	19.49	5.992	4.66
18	17.55	6.152	7.71
19	17.16	6.484	8.43
20 *	15.79	8.552	8.61
22	17.16	6.608	10.58
24	17.70	6.816	10.58
26	14.39	6.864	11.12
28	14.31	7.642	11.65
31	14.28	7.788	13.09
33	14.20	7.102	13.09
35 *	14.25	6.973	13.63
40	14.05	6.510	15.42

Las marcas (\*) indican el momento en que se abrió y cerró la alimentación.

Gráfica 4.4

Primera fermentación por lote alimentado

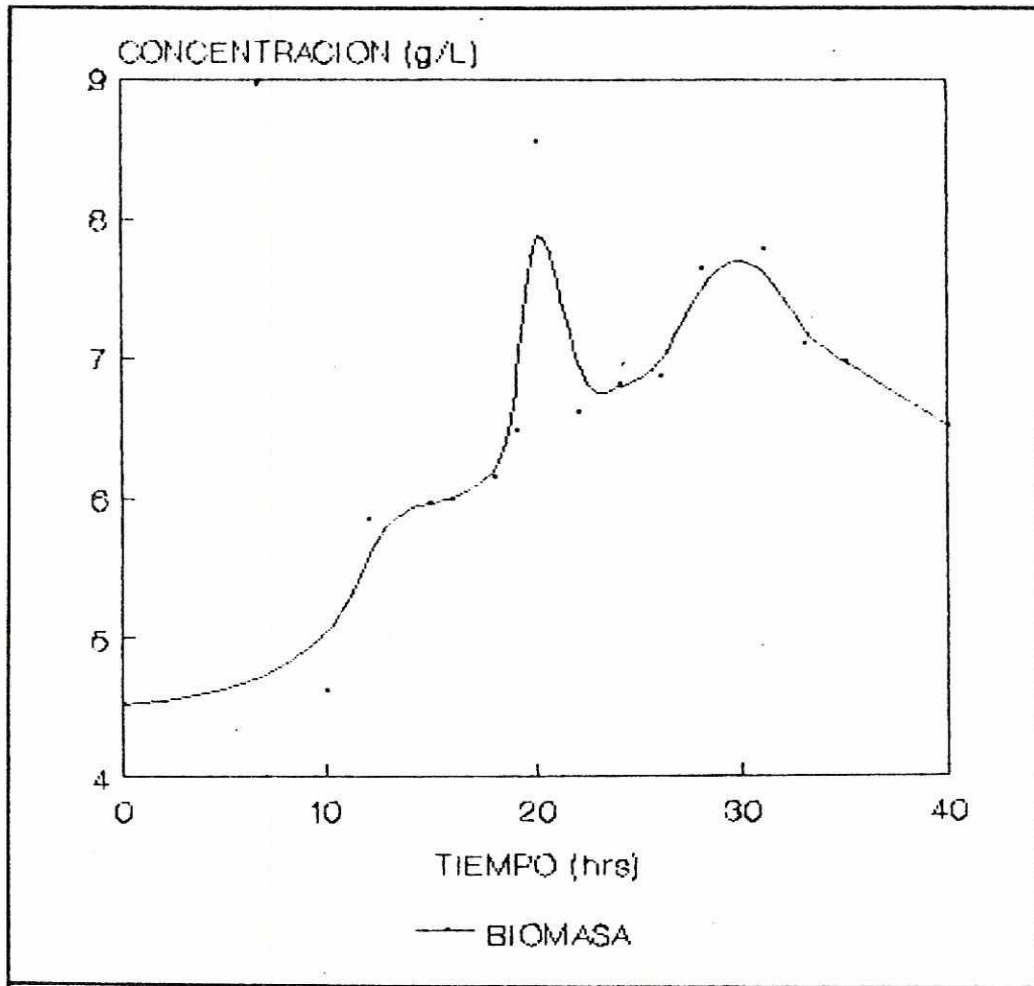
Azúcar residual vs. tiempo



Gráfica 4.5

Primera fermentación por lote alimentado

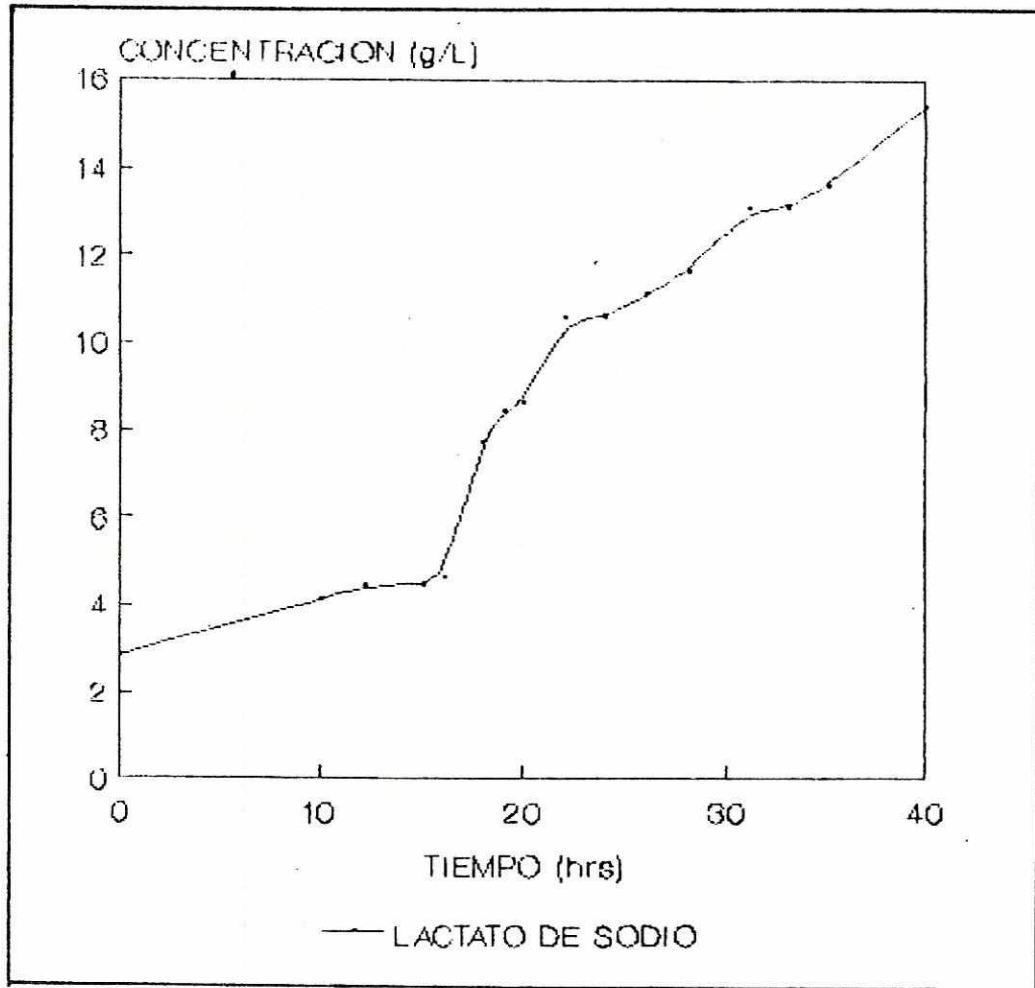
Biomasa vrs. tiempo



Gráfica 4.6

Primera fermentación por lote alimentado

Lactato de sodio vs. tiempo



Cuadro 4.3

Segunda fermentación por lote alimentado

Concentración de azúcar residual, biomasa y lactato de sodio en función del tiempo

Volumen inicial de sustrato: 27.27 L

Volumen final de sustrato: 43 L

Volumen de inóculo: 1.620 L

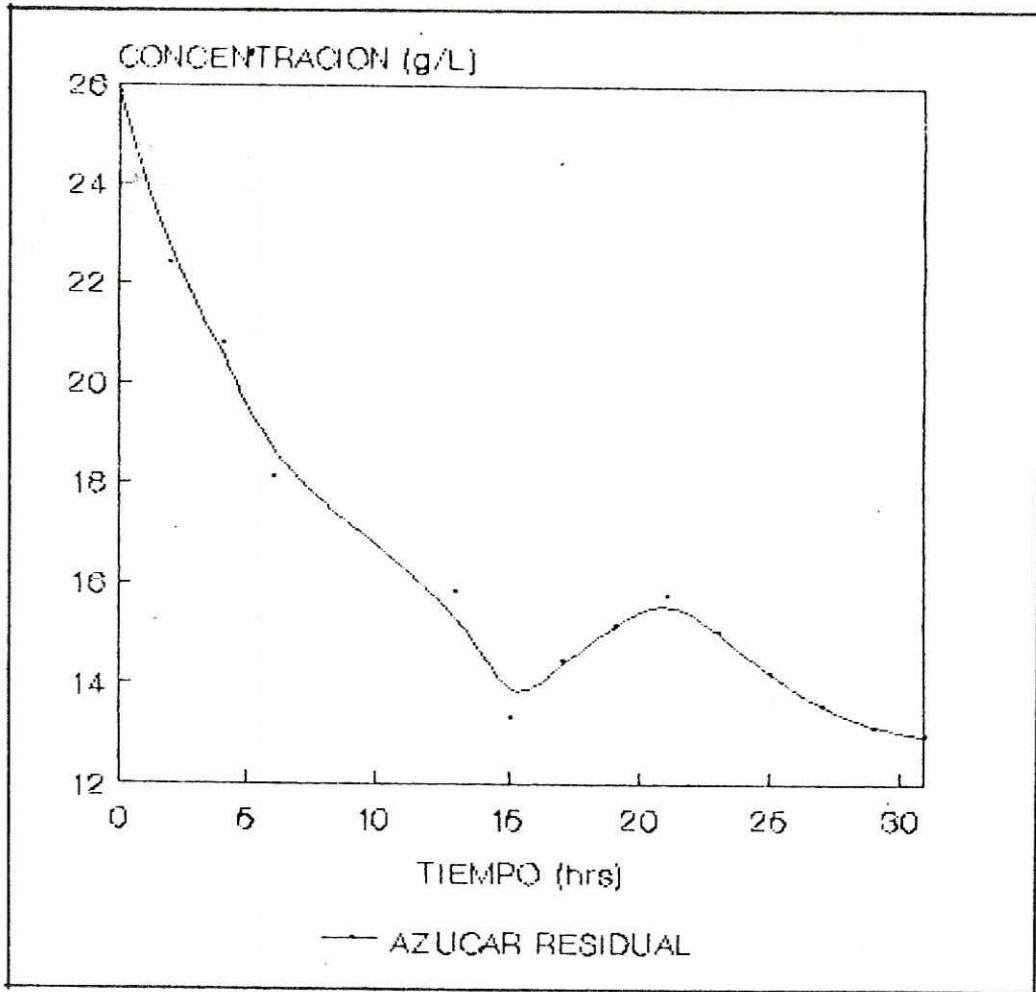
TIEMPO (horas)	CONCENTRACION (g/L)		
	AZUCAR RESIDUAL	BIOMASA	LACTATO DE SODIO
0	25.84	5.360	9.86
2	22.40	5.886	10.75
4	20.80	6.306	13.63
6	18.09	6.360	15.60
13	15.83	6.386	18.11
15 *	13.33	13.012	18.65
17	14.47	10.260	20.26
19	15.12	8.540	21.52
21	15.75	8.670	21.16
23	15.03	9.578	21.52
25	14.20	8.492	22.59
27 *	13.56	8.130	23.31
29	13.13	7.320	23.31
31	12.97	5.402	24.03

Las marcas (\*) indican el momento en que se abrió y cerró la alimentación.

Gráfica 4.7

Segunda fermentación por lote alimentado

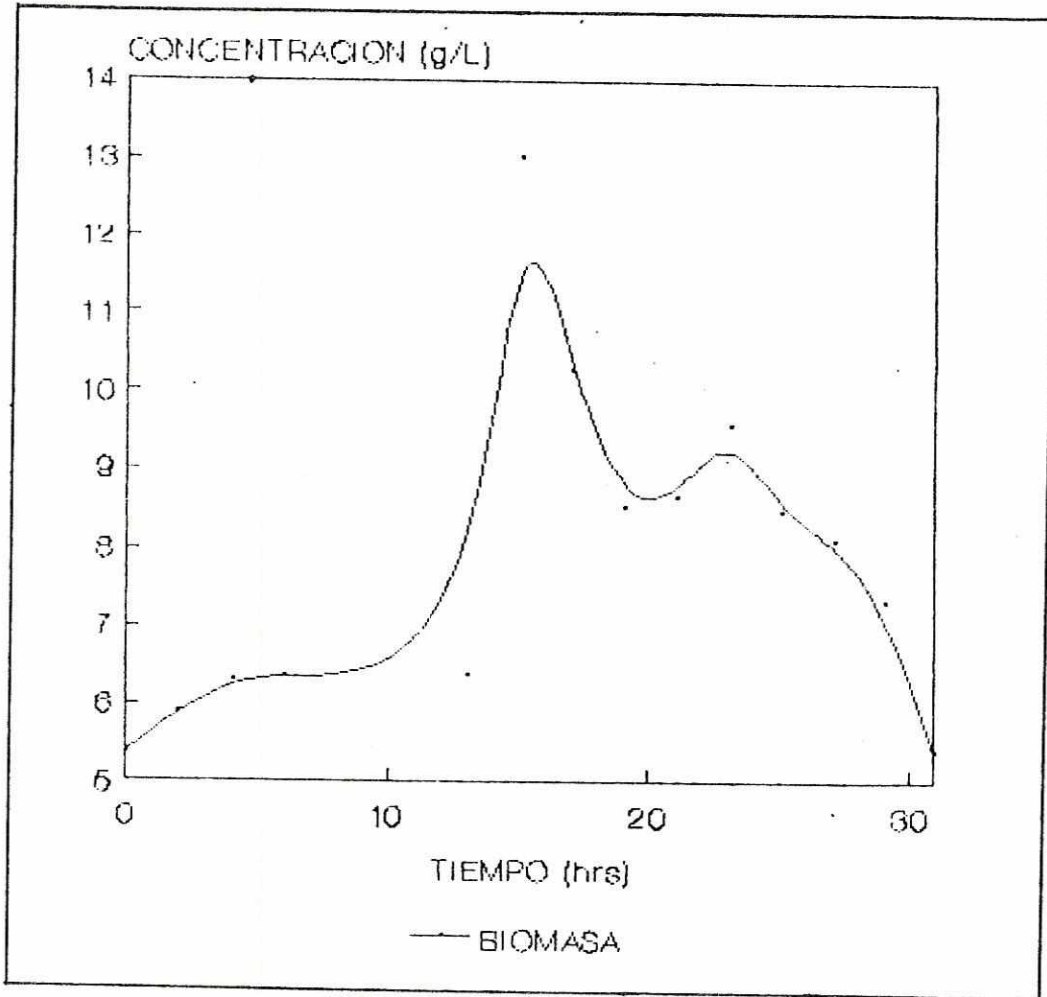
Azúcar residual vs. tiempo



Gráfica 4.8

Segunda fermentación por lote alimentado

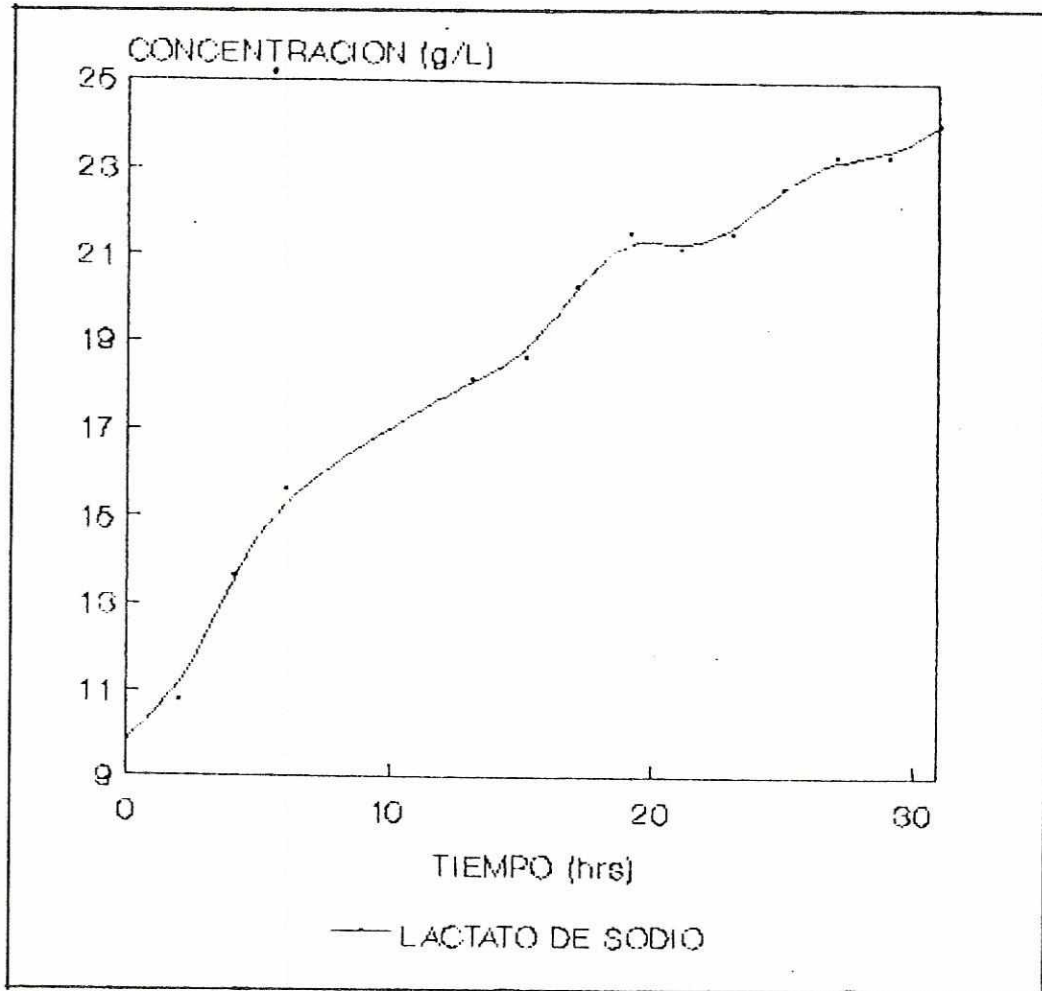
Biomasa vrs. tiempo



Gráfica 4.9

Segunda fermentación por lote alimentado

Lactato de sodio vs. tiempo



Cuadro 4.4

Análisis de las fermentaciones por lote alimentado

Resultados finales

	FERMENTACION POR LOTES	FERMENTACIONES POR LOTE ALIMENTADO	
		#1	#2
u max (1/h)	0.28	0.24	0.25
Y x/s (1)	0.58	0.43	0.61
Peso de lactato de sodio formado (g)	347.5	646.5	764.4
Y p/s	0.35	1.1	1.1
Productividad (Kg/m <sup>3</sup> h)	0.244	0.334	0.573

(1) Calculado al final de la fase exponencial.

## V. DISCUSION DE RESULTADOS

### A. Fermentación por lotes

El comportamiento seguido por el consumo de azúcares, el crecimiento de la biomasa y la producción de lactato de sodio (véase gráficas 4.1 a 4.3) es muy similar al descrito por la teoría.

Al principio hay un período de adaptación de los microorganismos en el cual su crecimiento es lento y la producción de lactato es escasa.

A medida que se llega a la etapa exponencial, el crecimiento de biomasa aumenta rápidamente hasta llegar a un máximo, el sustrato disminuye y hay mayor producción de lactato.

Pasada la etapa exponencial, los microorganismos empiezan a morir debido a que el sustrato se agota. El producto tiende a estabilizarse al igual que lo hace el sustrato remanente.

Tanto la productividad ( $0.244 \text{ Kg/m}^3 \text{ h}$ ) como el rendimiento (35%) obtenidos en esta fermentación, están muy por debajo de lo reportado en la teoría respecto de fermentaciones similares ( $1 \text{ a } 3 \text{ Kg/m}^3 \text{ h}$  de productividad y 90-95% de rendimiento).

### B. Fermentaciones por lote alimentado

Las gráficas 4.4 a la 4.9 indican el comportamiento seguido por el sustrato, la biomasa y el producto durante las fermentaciones por lote alimentado.

El sustrato y el lactato siguieron el patrón dictado por la teoría. Luego que se ha llegado al máximo de la etapa exponencial y se abre la alimentación, empieza a darse una acumulación de sustrato debido a que la oferta es mayor que la demanda.

A medida que transcurre el tiempo, la oferta y la demanda se van igualando y deja de haber acumulación. Poco a poco los nutrientes se van agotando hasta estabilizarse.

El crecimiento de biomasa siguió un comportamiento parecido al descrito por la teoría, pero no del todo igual. Se esperaba que al abrir la alimentación el crecimiento de biomasa aumentara para luego alcanzar una fase estacionaria y por último un decaimiento gradual a medida que se agotaban los nutrientes y morían los microorganismo. Sucedió que la concentración de biomasa, luego de abrir la alimentación, disminuyó y volvió a aumentar pero sin alcanzar el máximo que había logrado al final de la fase exponencial. Al irse agotando los nutrientes, la

concentración de biomasa se fue haciendo cada vez menor. Este comportamiento se dio en las dos fermentaciones por lote alimentado y se pudo deber a tres razones:

1) No se contaba con una bomba para alimentar el sustrato en forma realmente constante. La alimentación se hizo por gravedad, manteniendo el carboy que contenía a la alimentación entre 5 y 10 litros para lograr que el flujo de alimentación ( $f_v$ ) fuera en promedio de 1.22 L/h. Al no ser  $f_v$  siempre el mismo, la tasa específica de crecimiento máxima no fue constante todo el tiempo y pudo haber irregularidad en el crecimiento de los microorganismos.

2) Es posible que los microorganismos hayan sufrido algún tipo de shock al iniciar la alimentación debido a la diferencia en la concentración del medio que se alimentó y del medio que se tenía desde el principio de la fermentación. Los microorganismos tuvieron entonces que acostumbrarse a las nuevas condiciones y se dio la oscilación en el crecimiento hasta volver a su comportamiento esperado.

3) Debido a que se encontraron dificultades en la agitación y los sólidos tendían a sedimentarse, las lecturas de biomasa no son 100% confiables.

En general, a pesar de las dificultades que se encontraron en el manejo del fermentador, las tres fermentaciones dieron resultados satisfactorios. Los parámetros cinéticos ( $\mu_{max}$  y  $Y_{x/s}$ ) fueron similares entre las tres fermentaciones. Esto indica que los resultados son reproducibles.

Tal y como se esperaba, el peso de lactato de sodio formado, así como los rendimientos y las productividades, fueron mayores para las fermentaciones por lote alimentado que para la fermentación por lotes. La teoría predice que los sistemas por lote alimentado incrementan las productividades y los rendimientos de las fermentaciones por lotes. Aun así, no se lograron productividades ni rendimientos tan altos como los descritos en la teoría para fermentaciones similares.

En cuanto al diseño del fermentador, se le encontraron los siguientes defectos:

1) Debido a la forma en que están dispuestas las entradas de vapor y agua en la chaqueta (véase figura 3.1), se hace muy difícil el control de la temperatura. Con esta distribución, el lado que queda cerca de la entrada de vapor se calienta mucho, mientras que el lado cercano a la entrada de agua se mantiene más frío. Por consiguiente, la distribución del calor no es uniforme en todo momento.

2) El termómetro con que se controla la temperatura sólo registra la de la chaqueta, y no la del cultivo que está en el interior. Cada vez que se desea verificar la temperatura del cultivo es necesario tomar una muestra. Esto trae consigo pérdida de tiempo y desperdicio de cultivo.

3) Los sólidos del cultivo tienden a asentarse en el fondo cónico del fermentador. El dispersor de gas del sistema de agitación por burbujeo queda muy alejado del fondo del fermentador y no tiene la fuerza suficiente para levantar los sólidos asentados y mantenerlos suspendidos en el cultivo.

4) A veces entra cultivo al dispersor de gases del sistema de agitación y es expulsado por la salida de los gases. En cada uno de estos "lavados" se pierden hasta 5 litros de cultivo. Este fenómeno ocurrió tres veces durante las fermentaciones que se llevaron a cabo.

## VI. TRATAMIENTO DE DESECHOS DE LA INDUSTRIA LACTEA EN GUATEMALA: LA FERMENTACION DEL SUERO DE QUESO HACIA PRODUCTOS APROVECHABLES COMO UNA ALTERNATIVA

El objetivo de esta sección es dar una idea general sobre las necesidades que se tendrían en cuanto a materia prima y equipo, en el caso que se llegara a determinar que la fermentación del suero de queso hacia lactato de sodio constituye una alternativa favorable para el tratamiento de desechos lácteos.

### A. Las materias primas

Para cualquier proceso de fermentación en el que se pretende obtener un producto aprovechable a partir de un desecho industrial, la selección de dicho desecho debe basarse en los siguientes criterios:

#### ✓ Precio

No siempre el material más barato es el mejor, debido a factores tales como almacenamiento, manejo, pretratamiento, transporte, etc.

#### ✓ Disponibilidad

Este criterio es dictado por el uso y productividad de la tierra, la capacidad de almacenamiento y los mercados. También influye que el desecho que se quiere obtener sea estacional.

#### ✓ Composición

Muchas materias primas están limitadas debido a que algunos microorganismos no pueden metabolizarlas, contienen componentes tóxicos que inhiben el proceso, o son muy diluidas, haciendo difícil su manejo y almacenamiento. Esto recae en los costos de operación, ya que la materia prima requerirá de algún tipo de pretratamiento, el cual podría necesitar una tecnología cara y complicada. Esto sucede con la mayoría de desechos: si bien su precio de adquisición puede ser bajo, los costos de pretratamiento o almacenamiento pueden ser altos.

#### ✓ Forma y estado de oxidación de la fuente de carbono

La utilidad de muchas materias primas se ve restringida por la dificultad que tienen los microorganismos para metabolizarla, y los métodos alternativos (enzimáticos, físicos o químicos) resultan caros.

Los rendimientos de los productos a partir de las materias primas también dependen del estado de oxidación del sustrato. Al comparar sustratos reducidos, como aceites e hidrocarburos, contra sustratos oxidados tales como carbohidratos, sus eficiencias de conversión pueden hacerlos más caros aun cuando con base en pesos parezcan más baratos (Hacking, 1987).

En el caso específico del suero de los productos lácteos, se puede hacer el siguiente análisis:

✓ **Precio**

La mayor parte del suero obtenido durante la elaboración del queso (80%) se vende fresco para alimento de cerdos a un precio de Q 0.08 a Q 0.012 el litro. El resto (20%) se tira como desecho (Alvarez, 1990). Este restante 20 % es el que sería necesario tratar para que no constituya una carga de contaminación.

En este rubro habría que incluir también los gastos de transporte. El suero tendría que ser trasladado estando fresco o recién pasteurizado, y utilizar transportes similares a los de leche. Las siete industrias lácteas consideradas en este trabajo y mencionadas más adelante, están situadas en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez y Escuintla, por lo que las carreteras y la distancia no presentarían mayor problema, siempre que la planta de fermentación esté localizada adecuadamente.

✓ **Disponibilidad**

En Guatemala existen siete industrias lácteas que procesan quesos desuerados. En el cuadro 6.1 se muestran los datos de leche requerida para procesar este tipo de quesos, así como las producciones de queso y suero (en litros por año) de estas industrias. Estos datos fueron estimados a partir del requerimiento diario que tiene cada planta (Castañeda, 1990), sabiendo que de esta leche el 30% se transforma en queso y 70% es suero (Alvarez, 1990).

Actualmente las lecherías no usan el suero que obtienen como subproducto, y lo que no venden como alimento animal lo desechan. En algunas ocasiones lo usan para hacer ensayos de mezclas para helados, o bien, para hacer otros tipos de quesos a partir de los sólidos del suero que son tan sólo el 0.7% del mismo. Esta práctica resulta antieconómica, ya que para deshidratar el suero necesitan dos cosas:

- 1) tanques muy grandes para almacenar cantidades considerables de suero, y
- 2) mucho vapor para deshidratar el suero, lo que lleva consigo altos gastos de combustibles para generar el vapor.

CUADRO 6.1

Requerimiento anual de leche para la elaboración de quesos desuerados y producciones anuales de queso y suero por industria láctea en Guatemala (datos de julio de 1990)

INDUSTRIA LACTEA	L / año		
	LECHE REQUERIDA	QUESO PRODUCIDO	SUERO PRODUCIDO
1	2 016 000	604 800	1 411 200
2	7 920 000	2 376 000	5 544 000
3	5 040 000	1 512 000	3 528 000
4	1 152 000	345 600	806 400
5	936 000	280 800	655 200
6	544 000	163 200	380 800
7	2 485 000	745 500	1 739 500
<b>TOTALES</b>	<b>20 093 000</b>	<b>6 027 900</b>	<b>14 065 100</b>

✓ **Composición**

La composición del suero es quizás el factor que presenta más problemas al querer usarlo como materia prima de la fermentación que se está analizando. Debido a que posee gran cantidad de agua y se descompone fácilmente a temperatura ambiente, puede presentar dificultades de almacenamiento o conservación.

En cuanto al almacenamiento se tendrían dos alternativas:

- 1) Almacenar el suero líquido. Para ellos se requerirían tanques grandes con enfriamiento o bien cuartos fríos grandes. Aun pasteurizándolo (lo que implicaría un costo de operación adicional) el suero no dura más de tres días en refrigeración sin descomponerse.
- 2) Almacenar el suero deshidratado. En este caso sería necesario un proceso de deshidratación aparte, lo cual traería consigo un aumento en los costos de operación.

✓ **Forma y estado de oxidación de la fuente de carbono**

En este caso, la fuente de carbono es un carbohidrato: la lactosa que contiene el suero. Este aspecto no presenta mayor problema, ya que, como se demostró en la parte experimental de este trabajo, el microorganismo seleccionado, *Lactobacillus bulgaricus*, metaboliza satisfactoriamente la lactosa y resiste condiciones de pH y temperatura bastante variables, sin afectar considerablemente el resultado de la fermentación. Para obtener rendimientos altos de lactato de sodio, sólo habría que cuidar que el suero fuera fresco, ya que si no lo es, la concentración inicial de ácido

láctico es muy alta y el pH muy bajo, pudiendo dar problemas a las bacterias para llevar a cabo la fermentación.

## B. La fermentación y la recuperación del producto

Como se pudo observar en este trabajo, la fermentación del suero de queso hacia lactato de sodio es sencilla y da buenos resultados. El microorganismo usado es noble y fermenta eficientemente la lactosa del suero. Además soporta cambios de temperatura de hasta  $\pm 5^\circ \text{C}$ , sin afectar considerablemente los resultados.

El equipo que se requiere para llevar a cabo esta fermentación es simple: un fermentador, bombas para la alimentación del sustrato y la base y/o ácido, dióxido de carbono para proveer condiciones anaerobias, recipientes para contener la alimentación y una fuente de vapor (caldera).

Diseñar y construir un fermentador eficiente es sencillo y probablemente resulte más barato que comprarlo ya fabricado. Esto se pudo comprobar con el fermentador experimental que se usó en este trabajo, el cual fue diseñado por dos estudiantes de la Universidad Del Valle, y construido en un taller industrial de Guatemala.

La recuperación del lactato de sodio sería la parte del proceso que tendría los costos de manufactura más elevados. Ya que se está usando una materia prima cruda y el lactato de sodio se está obteniendo como producto primario de la fermentación, el proceso de recuperación que más se adapta es el siguiente:

- 1) Al final de la fermentación el caldo es llevado a  $80-100^\circ\text{C}$  y a un pH de 10-11. Esto tiene como fin matar a los microorganismos, coagular las proteínas y degradar algunos azúcares residuales.
- 2) El caldo se descarga del fermentador hacia un filtro prensa para separar los sólidos del líquido.
- 3) El licor filtrado se evapora al vacío.
- 4) Si se desea obtener lactato de sodio grado técnico, el proceso a seguir es el siguiente:
  - el licor se evapora al 50%
  - se blanquea con carbón activado
  - se le remueven metales pesados por precipitación con sulfito de sodio
  - se filtra
  - se obtiene el producto.
- 5) Si se desea obtener lactato de sodio grado alimenticio o USP, se sigue el siguiente proceso:
  - luego de la evaporación al vacío se enfría
  - se cristaliza
  - se lava
  - se redissuelve

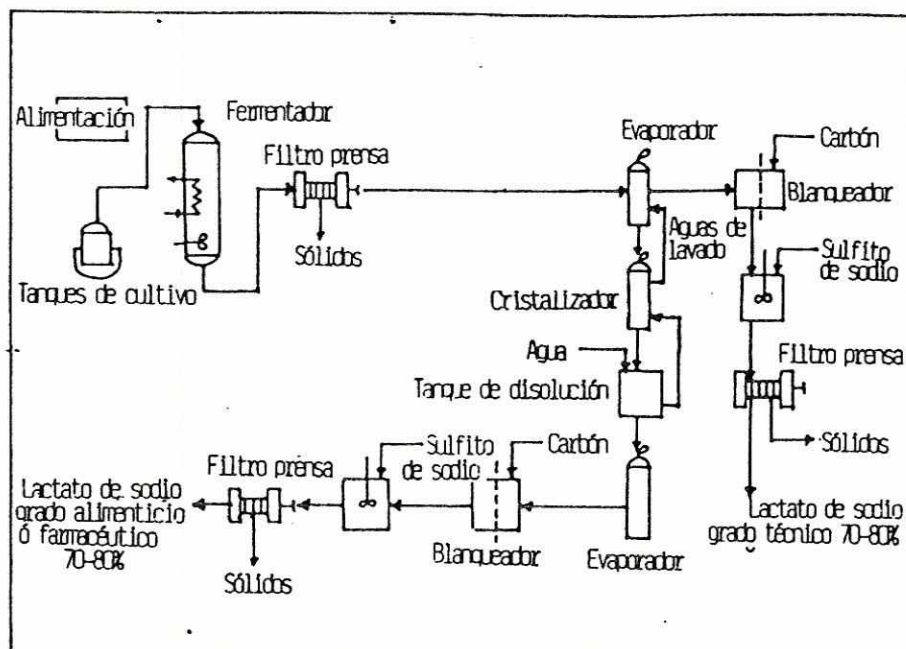
- se recristaliza
- se disuelven los cristales en agua
- se evapora al 50-60%
- se trata con carbón activado y sulfito de sodio
- se filtra

Durante las cristalizaciones del lactato de sodio, todas las aguas de lavado deben recircularse porque contienen grandes cantidades del producto debido a su alta solubilidad. Estas pérdidas de producción constituyen uno de los gastos más importantes en el proceso de recuperación.

Los materiales de construcción para el equipo se ven limitados por la naturaleza corrosiva del ácido láctico que se forma, y esta inversión contribuye significativamente al costo final de los productos. El material que se usa regularmente es el acero inoxidable 316. Algunos materiales como el hierro, el acero, el acero cromado, el monel, el inconel y el níquel, son insatisfactorios para el proceso.

En la figura 6.1 se presenta el diagrama de la producción de lactato de sodio a partir de suero de queso.

FIGURA 6.1  
PRODUCCION DE LACTATO DE SODIO



## VII. CONCLUSIONES

- 1) En el fermentador que se diseñó para el cultivo de biomasa y que se trabajó por lotes, a temperatura ambiente y en condiciones aeróbicas, se pueden llevar a cabo otras fermentaciones operándolo por lote alimentado, a temperaturas mayores que la ambiente y en condiciones anaeróbicas. Los resultados que se obtienen son aceptables y reproducibles.
- 2) Los resultados demuestran que, para las fermentaciones que se llevaron a cabo en este trabajo, al operar el fermentador por lote alimentado se obtuvieron rendimientos de aproximadamente el doble de producto que operándolo por lotes.
- 3) Tanto la fermentación por lotes como las fermentaciones por lote alimentado dieron resultados que concuerdan con lo establecido en la teoría.
- 4) La fermentación del suero de queso hacia lactato de sodio utilizando *Lactobacillus bulgaricus* como microorganismo, no presenta mayores problemas y da resultados satisfactorios. Los rendimientos en lactato son altos y el microorganismo es capaz de crecer incluso cuando las condiciones de temperatura no son las óptimas.

## VIII. RECOMENDACIONES

- 1) Colocar en la chaqueta del fermentador una entrada de vapor a la misma altura de la entrada de agua para así obtener una mejor distribución del calor.
  
- 2) Instalar un termómetro que registre directamente la temperatura del cultivo.
  
- 3) Revisar el sistema de agitación para determinar cuál es la causa de que expulse cultivo por la salida de los gases y corregirlo. Asimismo, determinar si se le pueden hacer mejoras para que dé una agitación más eficiente y se evite la sedimentación de sólidos en el fondo del fermentador.
  
- 4) Es necesario adquirir bombas peristálticas para las fermentaciones por lote alimentado. Controlar los flujos de alimentación por gravedad es muy inexacto. Además, con ese equipo se podrían incluso llevar a cabo fermentaciones continuas y sería útil también para laboratorios de otros cursos.
  
- 5) Ya que la fermentación del suero de queso hacia lactato de sodio usando un sistema por lote alimentado dio buenos resultados a nivel experimental, sería interesante hacer un estudio de prefactibilidad para determinar si la producción de lactato de sodio a nivel industrial es económicamente rentable. De ser así, se podría pensar en usarla como un método de tratamiento de este desecho de la industria láctea, obteniendo un producto aprovechable, tal como lo es el lactato de sodio.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, F. 1990 Entrevista personal. Encargado de producción, Industrias Lácteas, S.A.
- Atkinson, B. 1974 Biochemical reactors, London, Pion Limited. 1-152 pp.
- \_\_\_\_\_ ; 1983 F. Mavituna. Biochemical engineering and biotechnology handbook, London, The Nature Press. 1044-48 pp.
- Bailey, J.E.; 1977 D.F. Ollis. Biochemical engineering fundamentals, New York, Mc.Graw Hill Book, Co.
- Bjurstrom, E. 1985 "Biotechnology: fermentation and downstream processing". Chemical engineering (New York); (3): 127-158.
- Castañeda, J. 1990 Entrevista personal. Departamento de Inspección de Lácteos y Derivados, Control de Alimentos. Dirección General de Servicios Pecuarios (DIGESEPE).
- Demain, A.; 1986 N. Solomon. Manual of industrial microbiology, Washington, D.C., American Society of Microbiology. 84-96, 137-151 pp.
- \_\_\_\_\_ ; 1985 N. Solomon. Biology of industrial microorganism, California, The Benjamin Cummings Publishing Co. 160-166 pp.
- Faith, W.K.; 1957 D.B. Keyes; R.L. Clark. Industrial chemicals, New York, John Wiley & Sons. 479-483. p.p.
- Hacking, A. 1987 Economic aspects of biotechnology, Cambridge, Cambridge University Press.
- Hanson, T.P.; 1972 G.T. Tsao. "Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures". Biotechnology and bioengineering, (New York); 14 ( ): 233-252.
- Heredia, M. 1988 "Diseño, construcción, montaje y evaluación de un sistema de fermentación para la producción de biomasa microbiana". Tesis, (Guatemala).
- Ishizaki, A.; 1989 T. Ohta. "Batch culture kinetics of L-lactate fermentation employing *Streptococcus sp.* IO-1". Journal of fermentation and biotechnology, (Japan); 6Z ( ): 46-51.

- Keller, A.K.; 1975 P. Gerhardt. "Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein". Biotechnology and bioengineering. (New York); 17 ( ): 997-1018.
- Mehaia, M.; 1987 M. Cheryan. "Production of lactic acid from sweet whey permeate concentrates". Process biochemistry. (New York); \_\_ (12): 185-188.
- Miller, R.; 1987 M. Melick. "Modeling bioreactors". Chemical engineering. (New York); \_\_ (3): 112-120.
- Moo-Young, M. 1985 Comprehensive biotechnology (V. III). Oxford, Pergamon Press. 761-776 pp.
- 1984 Official methods of analysis. 14th. ed. Association of official analytical chemist. Arlington, AOAC Inc. 579 pp.
- Siggia, S.; 1979 J.G. Hanna. Quantitative organic analysis via functional groups. New York, John Wiley & Sons. 165-168 pp.
- Valenzuela, F. 1988 "Evaluación del funcionamiento de un fermentador para la producción de biomasa microbiana". Tesis (Guatemala).

## APENDICE A

### Métodos analíticos

#### A. Determinación del porcentaje de lactosa residual como azúcar invertida mediante el método volumétrico general de Lane-Eynon

##### 1. Aparatos.

Balones aforados de 100, 500 y 1000 mL  
Pipetas volumétricas de 5, 10 y 50 mL  
Pipetas graduadas de 10 mL  
Bureta de 50 mL  
Erlenmeyer de 250 mL  
Probeta de 100 mL  
Beakers  
Perlas de ebullición  
Baño térmico  
Estufa con agitador magnético  
Espátula  
Pinzas para bureta  
Llenador universal de pipetas  
Balanza

##### 2. Reactivos.

(a) Solución de sulfato de cobre: disolver 34.6390 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua destilada. Aforar hasta 500 mL y filtrar a través de lana de vidrio.

(b) Solución alcalina de tartrato: disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 50 g de hidróxido de sodio en agua destilada y aforar a 500 mL. Dejar reposar esta solución por dos días antes de usarla.

(c) Solución de Fehling modificada por Soxhlet: mezclar volúmenes iguales de las soluciones (a) y (b) inmediatamente antes de usarla.

(d) Solución estándar de azúcar invertida: disolver 9.5 g de sacarosa p.a. en agua y añadir 5 mL de ácido clorhídrico concentrado. Diluir con agua hasta aproximadamente 100 mL y dejar en reposo por tres días a temperatura ambiente. Luego aforar a un litro.

(e) Solución acuosa de azul de metileno al 1%.

(f) Hidróxido de sodio al 20%.

(g) Acido clorhídrico 0.5 N: diluir 45 mL de ácido clorhídrico concentrado en agua. Aforar a un litro.

(h) Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%.

3. Preparación de la muestra.

En un balón de 100 mL colocar 10 mL de la muestra, añadir 3 mL de ácido clorhídrico concentrado y colocar en un baño térmico a 65°C por 15 minutos. Agregar 3 gotas de fenolftaleína y neutralizar con hidróxido de sodio al 20%. Añadir ácido clorhídrico 0.5 N hasta que desaparezca el color rojo. Aforar con agua.

4. Determinación de azúcar invertida en la muestra.

Llenar la bureta con la muestra. En un erlenmeyer de 250 mL, colocar 10 mL de reactivo de Fehling, mezclar y añadir 15 mL de agua. Colocar un agitador magnético y perlas de ebullición. Calentar hasta que ebulle. Añadir 4 gotas de azul de metileno al 1% en agua y titular mientras la solución hierve y es agitada, hasta que el color cambie a naranja.

5. Estandarización del reactivo de Fehling.

En un balón de 100 mL colocar 50 mL de la solución estándar de azúcar invertida, añadir 3 gotas de fenolftaleína y neutralizar con hidróxido de sodio al 20%. Seguir los pasos indicados en el inciso anterior.

6. Cálculos.

$$C = ( T * 0.055276 ) + 49.81184$$

$$\text{g de lactosa / L} = ( C * 10 ) / T$$

donde: C = azúcar reducida total  
T = título

(AOAC, 1984)

B. Determinación del peso de células secas por unidad de volumen

1. Aparatos y cristalería.

Centrífuga  
Tubos para centrífuga de 50 mL  
Cajas de humedad  
Horno  
Balanza analítica  
Desecadora

2. Procedimiento.

Centrifugar 50 mL de la muestra por 20 min a 1500 rpm. Decantar el líquido y colocar el sólido en una caja para humedad previamente tarada. Lavar el tubo con unos pocos mililitros de agua. Colocar la caja y su contenido en el horno durante media a una hora. Colocar en la desecadora y pesar.

3. Cálculos.

$$\text{biomasa (g/L)} = \text{peso de muestra (g)} * 20$$

C. Determinación de la concentración de lactato de sodio

1. Aparatos y cristalería.

Erlenmeyer de 250 mL  
Probeta de 100 mL  
Pipeta volumétrica de 25 mL  
Bureta de 50 mL

2. Reactivos.

- (a) Solución de etilenglicol-isopropanol 1:1.
- (b) Acido clorhídrico 0.5 N en solución de etilenglicol-isopropanol 1:1.
- (c) Solución alcohólica de naranja de metilo al 0.05%.

3. Procedimiento.

Colocar una alícuota de 25 mL de muestra en un erlenmeyer de 250 mL. Añadir 25 mL de la solución de etilenglicol-isopropanol 1:1 y 3-5 gotas de naranja de metilo. Titular la solución con el ácido clorhídrico 0.5 N en etilenglicol-isopropanol 1:1, hasta que el color vire hacia rosado.

4. Cálculos.

$$\text{g lactato de sodio/ L} = (\text{mL HCl 0.5 N}) * (2.2412)$$

(Siggia y Hanna, 1979)

## APENDICE 2

### Manual de operaciones para el fermentador discontinuo

#### A. Esterilización del fermentador

1. Poner en marcha la caldera.
2. Retirar los tornillos que sujetan la tapadera al cuerpo del fermentador.
3. Separar los filtros de aire de la tapadera.
4. Levantar con cuidado la tapadera, tratando de no dañar el dispersor de aire, y colocarla en un lugar adecuado para su limpieza.
5. Separar el filtro de aire haciendo girar las dos uniones universales que lo unen a la fuente de aire y a la línea de vapor.
6. Lavar el interior del fermentador con suficiente agua y detergente para eliminar cualquier material extraño que eventualmente origine un foco de contaminación. Lavar bien la zona donde se encuentra la toma de muestra y el termómetro. Abrir la válvula del fondo del tanque para drenar y asegurar la limpieza de ésta.
7. Proceder a limpiar el interior de los filtros de aire removiendo la lana de vidrio sucia y sustituyéndola por una nueva. Asegurarse que quede compacta, pero no en exceso, lo que podría ocasionar una caída de presión muy grande del aire entrando al fermentador.
8. Lavar la tapadera enfatizando la limpieza del dispersor de aire. Se puede introducir agua a presión a través del dispersor para eliminar cualquier material atrapado en los agujeros del anillo.
9. Limpiar el vidrio del visor y los tubos de entrada del ácido, base y antiespumante.
10. Colocar la tapadera sobre el cuerpo del fermentador y apretar los tornillos que los unen.
11. Unir los filtros de aire a la tapadera y el resto de la tubería.

12. Colocar las mangueras de hule que unen las entradas de ácido, base y antiespumante con los recipientes correspondientes en la repisa superior de la estructura de soporte.

13. Asegurarse que todas las válvulas estén cerradas: entrada y salida de agua, entrada y salida de aire, entrada y salida de vapor, entradas de ácido, base y antiespumante, toma de muestra, drenado del tanque y entrada de gas inerte.

14. Revisar si están apretados los tornillos que unen la tapadera con el cuerpo del fermentador, los del visor y los de la entrada para la alimentación.

15. Colocar el termómetro en el lugar correspondiente en la chaqueta.

16. Eliminar el condensado de la línea de vapor.

17. Abrir lentamente la válvula de entrada del vapor. Este debe introducirse en la chaqueta y a través del dispersor de aire.

18. El proceso de esterilización se efectúa mediante un calentamiento a 100°C durante 30 minutos.

19. Al finalizar el período de esterilización cerrar la válvula de entrada de vapor.

20. Abrir la válvula de salida de condensado que conduce al tanque recolector.

21. Cerrar la válvula de salida de condensado luego de que éste haya terminado.

22. Introducir agua fría a la chaqueta abriendo las válvulas de entrada y salida de agua hasta que se alcance temperatura ambiente.

23. Vaciar la chaqueta.

24. Drenar el interior del tanque para eliminar el condensado que se formó.

25. Cerrar todas las válvulas.

#### B. Esterilización del sustrato

1. Formular el medio de cultivo de acuerdo a las condiciones de operación escogidas.

2. Quitar los tornillos de la entrada para la alimentación en la tapadera del fermentador.
3. Retirar la tapadera de la entrada de alimentación.
4. Introducir al fermentador la solución de sustrato. Se puede hacer uso de un embudo previamente esterilizado con alcohol. Los reactivos que sufren descomposición al aplicar una temperatura arriba de 100°C no deben adicionarse en esta etapa.
5. Colocar la tapadera de la entrada de alimentación y apretar los tornillos.
6. Revisar que todas las válvulas estén cerradas.
7. Abrir lentamente la válvula de entrada de vapor e introducir el mismo solamente en la chaqueta.
8. Aplicar calentamiento a 100°C durante 30 minutos.
9. El medio puede agitarse introduciendo aire a través del dispersor interno. Para ello, abrir la válvula de entrada de aire hasta alcanzar una presión del mismo de 10.35 kPa (1.5 psi). La válvula de salida de aire también debe abrirse para evitar la formación de una presión excesiva en el interior del fermentador.
10. Luego de finalizado el período de esterilización, cerrar la válvula de la entrada de vapor. Asegurarse que las válvulas de entrada y salida de aire estén cerradas.
11. Abrir la válvula de salida de condensado que conduce a un tanque recolector.
12. Cerrar la válvula de salida de condensado.
13. Abrir las válvulas de entrada y salida de agua e introducir agua para enfriar el medio a temperatura ambiente.
14. En este momento, introducir los reactivos que no se adicionaron antes por ser susceptibles al calor.

## C. Control del proceso de fermentación

### 1. Aireación y agitación.

El fermentador experimental utiliza el aire o gas inerte alimentado para agitar el medio y como fuente de oxígeno (si se alimenta aire) o para proveer condiciones anaeróbicas (si se alimenta un gas inerte).

(a) Una vez que el fermentador ha sido inoculado con el microorganismo deseado, se debe proceder a airear/desairear y agitar el medio.

(b) Para introducir el fermentador el gas escogido, abrir la válvula de entrada de aire o la de gas inerte, según sea el caso. Se recomienda usar una presión de 10.35 kPa (1.5 psi).

(c) Abrir la válvula de salida de gases del fermentador.

### 2. Temperatura.

(a) Introducir el termómetro dentro del protector colocado a la mitad de la chaqueta.

(b) Al momento de detectar un aumento de temperatura, abrir la válvula de entrada de agua y permitir el ingreso de la misma a la chaqueta.

(c) Abrir la válvula de salida de agua.

(d) Al alcanzarse la temperatura deseada, cerrar la válvula de entrada de agua.

(e) Vaciar la chaqueta y cerrar la válvula de salida de agua.

(f) Si es necesario, efectuar mezclas vapor-agua dentro de la chaqueta para alcanzar una temperatura específica. Deben abrirse las válvulas de entrada y salida de agua introduciendo vapor lentamente. Esta operación debe efectuarse cuidadosamente para no ocasionar cambios bruscos de temperatura.

### 3. Control del pH.

(a) Deben prepararse soluciones de ácido y base colocándolas en recipientes adecuados en la parte superior de la estructura de soporte. Dichos recipientes deben de tener válvulas o llaves que regulen el flujo de estos reactivos.

(b) Adaptar a estos recipientes mangueras de hule de 6.35 mm de diámetro que permitan la introducción de los reactivos al fermentador a través de los tubos correspondientes en la tapadera.

- (c) Medir el pH. Adicionar ácido o base, según sea el caso.
- (d) Agitar el medio.
- (e) Tomar una muestra y medir el pH.
- (f) Continuar añadiendo ácido o base sólomente si es necesario. El ajuste del pH debe requerir el mínimo de reactivos para no afectar el medio.

4. Formación de espuma.

- (a) Colocar el antiespumante seleccionado en un recipiente similar al utilizado para el ácido, en la parte superior de la estructura de soporte.
- (b) A través del visor observar el nivel de espuma dentro del fermentador.
- (c) Si existe una formación excesiva de espuma, añadir unas gotas del antiespumante al medio de cultivo.
- (d) Agitar el medio.
- (e) Si la espuma persiste, adicionar más antiespumante.

5. Toma de muestras.

- (a) Abrir la válvula colocada a la mitad de la chaqueta.
- (b) Desechar los primeros 50 mL y tomar la cantidad de muestra necesaria para los análisis.

