

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL



TÍTULO:

Uso de lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Autores:

Br. Jeyner José López Rivas
Br. José Luis Prado Arroliga

Tutor:

Lic. Jairo Paul López Velásquez

Asesor metodológico:

MSc. María Natalia Gutiérrez

Managua, Septiembre del 2015

DEDICATORIA

A Dios:

Por permitirnos llegar hasta esta parte de nuestras vidas, por darnos sabiduría y humildad para lograr nuestros objetivos, por su infinito amor y misericordia. *“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas. Josue 1:9”*

A nuestros padres:

Juana Ligia Arroliga Murrillo

José Luis Prado Fonseca

María Dolores Rivas Solórzano

José Andres López Sequeira

Quienes han sido ejemplo de trabajo arduo y humildad, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante, que nos ha permitido ser personas de bien, pero más que nada, por su amor, paciencia y apoyo. Además de inculcarnos que la educación es el puente y las llaves del éxito.

A nuestras familias y amistades:

A todos y cada uno de nuestros familiares y amistades que han contribuido con su amor y motivación, nuestras hermanas y hermanos, que han compartido en un ejemplo de amor y confianza en el transcurso de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

Damos gracias a nuestro Dios por habernos creado y haber trazado nuestro destino, pues de él viene la sabiduría y la inteligencia.

Agradecemos a nuestros padres quienes nos han guiado con mucha sabiduría a lo largo de nuestra carrera y nos han enseñado que la perseverancia y honestidad siempre deben ser prioridad en la vida.

Agradecemos al Departamento de Química y nuestros profesores, quienes a lo largo de estos cinco años han impartido un sin fin de conocimientos prácticos y científicos sin los cuales no hubiésemos llegado hasta este punto. Sobre todo al Lic. Jairo Paul López Velásquez, por su apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y elaboración de este trabajo; a la MSc. María Natalia Gutiérrez por sus constantes revisiones y sugerencias ofrecidas en este trabajo; al MSc. Frank Medrano Mayorga por su tiempo compartido, apoyo y confianza brindada los últimos tres años, además de impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional, MSc. Rosa María González por brindarnos siempre su apoyo y permitirnos la accesibilidad incondicional de los laboratorios y medios del laboratorio.

Agradecemos a la Cooperativa de Servicio y Crédito para la Producción Agropecuaria Masiguito R.L.; en especial al Presidente de esta Cooperativa Ing. Francisco Aragón Marín, también al Ing. Carlos Luna Roble e Ing. Francisco José Díaz López, quienes proporcionaron el lacto suero y permitieron realizar los análisis del mismo, brindándonos su confianza y apoyo.

También agradecemos a los docentes y amistades que nos apoyaron durante el transcurso de todo el proceso de investigación: MSc. José Luis Suazo, Lic. Sara Negareh, Lic. Roger Manzanares, Lic. Margarita Matamoros, MSc. Dania Martín, Lic. César Quintero y Lic. Karina Brenes por darnos su apoyo incondicionalmente.

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA



RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

OPINIÓN DEL TUTOR Y ASESOR METODOLÓGICO

La presente Monografía titulada "Uso de lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015", ha sido realizada por los bachilleres **Jeyner José López Rivas y José Luis Prado Arroliga** bajo la dirección del **Lic. Jairo Paul López Velásquez** y la asesoría metodológica de la **MSc. María Natalia Gutiérrez**. Ambos damos fe de que los bachilleres **Jeyner José López Rivas y José Luis Prado Arroliga** han cumplido con todas las disposiciones y requisitos académicos en cuanto a la elaboración de la presente monografía para optar al título de Licenciado en Química Industrial.

Managua, 11 de Septiembre del 2015

Jairo Paul López Velásquez, Lic.
Encargado en Catedra con Licenciatura
Departamento de Química
UNAN-Managua

María Natalia Gutiérrez, MSc.
Profesora Titular Universitario
Departamento de Química
UNAN-Managua

RESUMEN

El tema “Uso de lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014 - Agosto 2015” ha sido seleccionado ante la problemática contaminante que presenta el lacto suero para el medio ambiente.

La Cooperativa Láctea Masiguito ubicada en el municipio de Camoapa cuenta con 5 tinajas de desuerado, de las cuales se extrajo 1 litro de muestra por tinaja, almacenándolas en bolsas de plástico para determinar los parámetros físico-químicos del lacto suero. Las muestras se preservaron y trasladaron al Laboratorio de Tecnología Farmacéutica (pabellón 11) donde se realizó su tratamiento e implementó la hidrólisis ácida y simultáneamente se preparó el inóculo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Transcurrida la hidrólisis se enriquecieron las muestras con fosfato de sodio monobásico monohidratado y se inocularon procediendo a la etapa fermentativa.

La cuantificación del etanol obtenido en la fermentación del lacto suero se realizó por cromatografía de gas con detector de ionización de llama, la diferencia en los resultados de los análisis entre cada muestra es significativa, estos resultados se relacionan con el pH corroborando la dependencia del mismo con respecto a la generación de etanol, descartando relación posible al contenido de sustrato y cantidad de levadura. Por lo antes mencionado el proceso de producción explicado por los autores demuestra que se puede obtener etanol a partir de lacto suero hidrolizado ácidamente en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae*.

Palabras clave: *Lacto suero, lactosa, sinergia, Saccharomyces cerevisiae, etanol.*

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	<i>i</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>ii</i>
OPINIÓN DEL TUTOR Y ASESOR METODOLÓGICO	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
CAPITULO I. ASPECTOS GENERALES	0
1.1. Introducción	1
1.2. Objetivos	2
1.3. Planteamiento del problema.....	3
1.4. Justificación	4
1.5. Antecedentes	5
CAPITULO II. MARCO DE REFERENCIA	6
2.1. Leche	7
2.2. Características generales de la leche.....	7
2.2.1. Propiedades físicas.....	7
2.2.2. Propiedades químicas.....	8
2.2.3. Propiedades microbiológicas.....	8
2.3. Composición de la leche	9
2.3.1. Agua.....	9
2.3.2. Carbohidratos.....	9
2.3.3. Proteínas.....	9
2.3.4. Lípidos.....	10
2.3.5. Minerales y vitaminas.....	12
2.4. Queso	12
2.4.1. Propiedades nutricionales del queso.....	13

2.4.2. Descripción del proceso de elaboración del queso.....	13
2.5. Lacto Suero.....	16
2.5.1. Clases de lacto suero.....	16
2.5.2. Composición.....	16
2.5.3. Calidad de lacto suero.....	18
2.5.4. Beneficios que aporta al organismo.....	18
2.5.5. Contaminación por lacto suero.....	19
2.6. Lactosa.....	20
2.6.1. Hidrólisis ácida de la lactosa.....	22
2.7. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.7.1. Nutrición de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.7.2. Factores y condiciones de crecimiento.....	24
2.8. Fermentación Alcohólica	24
2.8.1. Bioquímica de la reacción de fermentación.....	25
2.8.2. Limitaciones del proceso de fermentación.....	27
2.8.3. Etapas en el proceso de fermentación y obtención de etanol.....	28
2.9. Cromatografía de gases (CG).....	30
2.9.1. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG FID).....	31
CAPITULO III. HIPÓTESIS	32
CAPITULO IV. DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
4.1. Descripción del ámbito de estudio y tecnológico.....	35
4.2. Tipo de estudio.....	35
4.3. Población y muestra.....	35
4.3.1. Población.....	35
4.3.2. Muestra.....	36

4.3.2.1. Criterios de inclusión.....	37
4.3.2.2. Criterios de exclusión.....	37
4.4. Variables y operacionalización.....	37
4.4.1. Variables independientes.....	37
4.4.2. Variables dependientes.....	37
4.4.3. Operacionalización de las variables.....	38
4.5. Material y método.....	39
4.5.1. Materiales para recolectar la información.....	39
4.5.2. Materiales para procesar la información.....	39
4.5.3. Método.....	43
4.5.3.1. Muestreo.....	43
4.5.3.2. Análisis físico-químico.....	43
4.5.3.2.1. Optimización y limpieza del Lactoscan LA50.....	43
4.5.3.2.2. Preparación de la muestra.....	44
4.5.3.2.3. Lectura de la muestra en Lactoscan LA50.....	44
4.5.3.2.4. Determinación de ácido láctico por volumetría.....	45
4.5.3.3. Tratamiento de la muestra.....	45
4.5.3.4. Hidrólisis ácida de la lactosa.....	46
4.5.3.5. Proceso fermentativo.....	47
4.5.3.5.1. Inoculación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en el lacto suero.....	47
4.5.3.5.2. Fermentación.....	48
4.5.3.5.3. Culminación de la fermentación.....	49
4.5.3.6. Extracción y purificación de etanol.....	49
4.5.3.7. Cuantificación de etanol.....	50

CAPITULO V. ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	52
5.1. Determinación de parámetros físico-químicos del lacto suero.....	53
5.1.1. Análisis del porcentaje de lactosa.....	55
5.2. Cuantificación de ácido clorhídrico para la hidrólisis ácida.....	59
5.2.1. Análisis de los resultados en la hidrólisis ácida.....	61
5.3. Medición de pH en el lacto suero hidrolizado.....	62
5.3.1. Análisis de los resultados en las mediciones de pH.....	63
5.4. Determinación de la cantidad de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
5.4.1. Análisis de la determinación de masa en levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
5.5. Volumen y concentración de etanol obtenido.....	64
5.5.1. Rendimiento de los volúmenes obtenidos de etanol.....	67
5.5.1. Análisis de resultados en la concentración de etanol obtenidos.....	68
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	70
CAPITULO VII. RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXOS	

ABREVIATURAS

M ₁	Muestra de tina 1.
M ₂	Muestra de tina 2.
M ₃	Muestra de tina 3.
M ₄	Muestra de tina 4.
M ₅	Muestra de tina 5.
M _{1,1}	Muestra tina 1 parte 1.
M _{1,2}	Muestra tina 1 parte 2.
M _{2,1}	Muestra tina 2 parte 1.
M _{2,2}	Muestra tina 2 parte 2.
M _{3,1}	Muestra tina 3 parte 1.
M _{3,2}	Muestra tina 3 parte 2.
M _{4,1}	Muestra tina 4 parte 1.
M _{4,2}	Muestra tina 4 parte 2.
M _{5,1}	Muestra tina 5 parte 1.
M _{5,2}	Muestra tina 5 parte 2.
LevM ₁	Levadura para muestra tina 1.
LevM ₂	Levadura para muestra tina 2.
LevM ₃	Levadura para muestra tina 3.
LevM ₄	Levadura para muestra tina 4.
LevM ₅	Levadura para muestra tina 5.
HTST	(High Temperature/Short Time): Altas temperaturas en corto tiempo.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido.
NADH	Forma reducida del NAD ⁺ .
ADP	Adenosín difosfato.

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

ATP	Adenosín trifosfato.
GADHP	Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa.
pH	Potencial de iones hidronios.
CG	Cromatografía de Gas.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
FID	Detector de Ionización de Llama.
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.
UNI	Universidad Nacional de Ingeniería.
Ec	Ecuación.
Fc	Factor de conversión.
Fa	Fórmula.
SC	Suma de cuadrados.
gl	Grado de libertad.
K	Número de medias.
n	Numero de mediciones.
F	Estadística de Fisher.
SS _{total}	Suma de los cuadrados de todas las observaciones no importando cuál de los tratamientos los produce de la media global.
SS _{entre}	Es la suma de los cuadrados (desviaciones del grupo de medias o media de medias).
SS _{dentro}	Es la suma sobre las sumas de las desviaciones cuadradas alrededor de la media de sus grupos.

ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

Figura 2.1	Leche de vaca.	pág. 7
Figura 2.2	Estructura de las proteínas.	pág. 10
Figura 2.3	Estructura de los triglicéridos.	pág. 11
Figura 2.4	Queso Moraliqúe.	pág. 12
Figura 2.5.	Muestra de lacto suero.	pág. 16
Figura 2.6.	Fórmula estructural de la lactosa.	pág. 21
Figura 2.7.	Molécula de lactosa, descompuesta mediante la hidrólisis en D-glucosa y D-galactosa.	pág. 22
Figura 2.8.	Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	pág. 22
Figura 4.1.	Ubicación de muestreo.	pág. 36
Diagrama 2.1	Mecanismo de reacción para la producción de etanol a partir de glucosa.	pág. 25
Diagrama 2.2	Diagrama de bloque general para el proceso de fermentación.	pág. 30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Análisis químico proximal de la leche de vaca.	pág. 8
Tabla 2.2	Análisis microbiológico de la leche cruda.	pág. 8
Tabla 2.3	Composición de lípidos en la leche.	pág.11
Tabla 2.4	Concentraciones de minerales y vitamínicas en la leche.	pág.12
Tabla 2.5	Composición nutricional del lacto suero.	pág.17
Tabla 2.6	Composición del suero dulce y ácido.	pág.17
Tabla 5.1	Parámetros físico-químicos de lacto suero en T ₁ .	pag.53
Tabla 5.2	Parámetros físico-químicos de lacto suero en T ₂ .	pág.53
Tabla 5.3	Parámetros físico-químicos de lacto suero en T ₃ .	pág.54
Tabla 5.4	Parámetros físico-químicos de lacto suero en T ₄ .	pág.54
Tabla 5.5	Parámetros físico-químicos de lacto suero en T ₅ .	pág.55
Tabla 5.6	Cálculo de la media y desviación estándar del porcentaje de lactosa en cada una de las tinas de desuerado.	pág.55
Tabla 5.7	Conversión de unidades para lactosa presente en el lacto suero.	pág.60
Tabla 5.8	Cálculo del volumen de HCl que debe ser utilizado en la hidrólisis de la lactosa.	pág.61
Tabla 5.9	Porcentaje de lactosa hidrolizado.	pág.62
Tabla 5.10	Valores de pH realizada la hidrólisis del lacto suero.	pág.62
Tabla 5.11	Cálculo de la media y desviación estándar en las mediciones de pH.	pág.63
Tabla 5.12	Masa de levadura Saccharomyces cerevisiae para preparar el medio de cultivo.	pág.64
Tabla 5.13	Volumen de etanol obtenido a partir del lacto suero.	pág.65
Tabla 5.14	Resultados de cuantificación de etanol.	pág.65
Tabla 5.15	Calculo del porcentaje de rendimiento para la obtención de etanol	pág.67
Tabla 5.16	Comparación entre la concentración de etanol y el pH de las muestras.	pág.68

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 5.1	Concentración en porcentaje volumen-volumen de etanol.	pág.66
Grafica 5.2	Dispersión de la concentración de etanol en relación al pH de la muestra.	pág.69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Diagrama de elaboración del queso.	pág.1
Anexo 2	Muestreo.	pág.2
Anexo 3	Limpieza del equipo Lactoscan LA50.	pág.3
Anexo 4	Lectura de la muestra en el equipo Lactoscan LA50.	pág.4
Anexo 5	Determinación de ácido láctico.	pág.6
Anexo 6	Tratamiento de las muestras.	pág.9
Anexo 7	Hidrólisis ácida.	pág.10
Anexo 8	Medición de pH.	pág.12
Anexo 9	Inoculación.	pág.13
Anexo 10	Proceso fermentativo.	pág.17
Anexo 11	Extracción y purificación de etanol.	pág.18
Anexo 12	Cuantificación de etanol.	pág.20
Anexo 13	Informe de la composición nutricional de Lacto suero.	pág.21
Anexo 14	Determinación de etanol por cromatografía de gas con detector de ionización de llamas.	pág.22
Anexo 15	Diagrama de obtención de etanol.	pág.45



CAPITULO I

ASPECTOS GENERALES



1.1. INTRODUCCIÓN

Durante la elaboración del queso la leche se descompone en dos partes: una masa semisólida, compuesta de caseína y un líquido, que es el lacto suero. Históricamente el lacto suero fue utilizado por médicos de gran renombre como Hipócrates, Galeno, Avicena, entre otros, quienes recomendaban dosis reguladas de lacto suero por sus efectos depurativos y desintoxicantes en el organismo. Incluso en el Siglo XVIII, se abrieron sanatorios especializados en curas a base del lacto suero.

La lactosa es el componente principal del lacto suero y la que le confiere sus propiedades más importantes. La lactosa no se disocia por completo en la parte superior del tracto gastrointestinal, sino que permanece en el intestino delgado y el colon en forma de azúcar. El ácido láctico producido a partir de la lactosa favorece asimismo la asimilación del calcio, fósforo, potasio y magnesio al aumentar la solubilidad de estos elementos en el intestino y actúa como un laxante suave y natural con un efecto extraordinario sobre la atonía intestinal y el estreñimiento.

La Cooperativa para la producción agropecuaria Masiguito R.L.; Productores de Leche El Triunfo, R.L.; Cooproleche R.L., entre otras cooperativas lácteas tienen gran impacto en la economía local ya que el 98% de sus productos son exportados a El Salvador, E.E.U.U. y Honduras. Estas empresas lácteas no cuentan con investigaciones que involucren una propuesta para la utilización del lacto suero como materia prima.

Desde esta perspectiva el presente estudio tiene como propósito esencial experimentar la utilidad del lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la obtención de etanol, generando así una nueva alternativa de aprovechamiento al lacto suero. Además de evitar la contaminación ambiental que genera el mismo al ser desechado sin tratamiento.

Cabe destacar que el Departamento de Química de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN, Managua) no registra antecedentes relacionados a investigaciones que propongan el uso de lacto suero como materia prima.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. General

- ☞ Utilizar el lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

1.2.2. Específicos

1. Describir las propiedades físico-químicas del lacto suero que hacen posible su utilización para producir etanol.
2. Destacar la importancia que tiene el lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol.
3. Explicar el proceso de obtención de etanol a partir de lacto suero a escala piloto como una alternativa en la producción de etanol.

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de los derivados de la leche se encuentra el queso, el cual durante su producción genera un residuo llamado lacto suero, una de las sustancias más contaminantes que existen en la industria alimentaria. Se estima que por cada diez litros de leche procesada, se recuperan nueve litros de lacto suero (Alfa-Laval, 1990), cada 1,000 litros de lacto suero genera cerca de 35 mg de O₂/L de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (Alais C., 1986).

Es importante que la industria láctea tenga un portafolio de opciones para usar el lacto suero con el fin de aprovechar este residuo generado en la producción de queso y además de evitar la contaminación al medio ambiente obtener un valor monetario de este, ya que representa entre el 80 – 90% del volumen total de la leche que va a ser procesada y contiene aproximadamente el 50% de los nutrientes de la leche original: proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales.

El propósito de la investigación es utilizar el lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol, realizando para ello un análisis de las propiedades físico-químicas, tratamiento y procesamiento. Considerando como una alternativa para pequeños y medianos empresarios usar el etanol obtenido, en la mejora y diversificación de los alimentos y procesos industriales en los cuales se emplee como materia prima. Además de ser una opción para la industria láctea dar uso a este residuo y reducir la contaminación ambiental que este genera.

1.4. JUSTIFICACIÓN

Entre los usos que se le da al lacto suero se encuentran: formulación de cosméticos y productos farmacéuticos, leches reconstituidas, productos bajos en grasa y simuladores de grasa que traen como función la gelatinización, retención de agua, emulsión, mejora la viscosidad y adhesión (*Mundolácteo, 2005*), formulación de queso y aumento de sus rendimientos, en la formulación de alimento animal, entre otras utilidades.

En Nicaragua la mayoría de las cooperativas productoras de leche ubicadas en los departamentos de Boaco, Chontales, Estelí, Matagalpa y municipio de Nueva Guinea (*COMPAL, 2008*), no dan utilidad al lacto suero resultante de la elaboración del queso; por esta razón el propósito de la monografía consiste en experimentar el uso del lacto suero como materia prima para producir etanol, presentando sus propiedades físico-químicas y los beneficios que traerá a la industria alimentaria y al consumidor, presentando una nueva opción de producto derivado de la leche.

El lacto suero puede ser utilizado por su gran contenido proteínico y actividad funcional; que traerá como beneficio principal evitar la contaminación ambiental (*McIntosh, y otros, 1998*). Una alternativa de aplicación del etanol obtenido a partir de lacto suero es la elaboración de bebidas alcohólicas, aprovechando este residuo de la producción de queso para generar productos de agrado al consumidor, otra alternativa es la utilidad en los laboratorios como desinfectante, para realizar análisis, entre otros.

Por lo antes mencionado, se considera que llevar a cabo este estudio es de gran importancia puesto que se fundamenta en desarrollar el uso y proceso que debe darse al lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para producir etanol, generando una alternativa de uso del residuo quesero, además de evitar la contaminación ambiental.

1.5. ANTECEDENTES

Las proteínas de lacto suero son usadas ampliamente en una variedad de alimentos gracias a sus propiedades gelificantes y emulsificantes, siendo la β -lactoglobulina el principal agente gelificante (Dickinson, 2007).

Se pueden generar concentrados proteínicos para producir helados, mejorar los panes, etc. Con el lacto suero se puede sintetizar exopolisacáridos (formas de polisacáridos bacterianos encontrados fuera de la pared celular) y producir bebidas fermentadas, bebidas refrescantes y mejorar el contenido proteínico de queso, quesillos y leches infantiles (Huertas, 2008).

En Argentina se han realizado estudios en tecnología de alimentos en los cuales determinaron que el lacto suero puede tratarse y producir subproductos como el suero en polvo, lactosa en polvo, suero en polvo deslactosado y aislados proteínicos de suero. Debido a la funcionalidad tecnológica que poseen algunos de estos concentrados proteínicos se los utiliza como ingredientes en la formulación de nuevos productos en diversos sectores alimentarios y de bebidas, como alternativa en ingredientes tradicionales (Parzanese, 2010).

En la Universidad de Bogotá “Jorge Tadeo Lozano” (Colombia), se experimentó la obtención de etanol a partir del lacto suero a escala piloto. Primero esterilizó el lacto suero, posteriormente hidrolizó la lactosa con la enzima β -galactosidasa y adicionó levadura *Saccharomyces cerevisiae*, dejó en fermentación durante 4 días a 30 °C, sin agitación. El porcentaje de alcohol cuantificado después de una destilación fue del 28%(v/v) (Carrión, 2010).



CAPITULO II

MARCO DE REFERENCIA



2.1. LECHE

La leche es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos. Esta capacidad es una de las características que definen a los mamíferos. La principal función de la leche es la de nutrir a las crías hasta que son capaces de digerir otros alimentos.

La leche es la base de numerosos productos lácteos, como la mantequilla, el queso y el yogurt, entre otros. Es muy frecuente el empleo de derivados de la leche en la industria agroalimentaria, química y farmacéutica, como la leche condensada, en polvo, caseína o lactosa (Jelen, 2003).

Actualmente, la leche que más se utiliza en la producción de derivados lácteos es la de vaca debido a las propiedades que posee, a la cantidad que se obtiene, agradable sabor y fácil digestión. La leche proveniente de la vaca es la más importante para la dieta humana y la que tiene más aplicaciones industriales.

2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LECHE

No todas las leches de los mamíferos poseen las mismas propiedades. La composición y características físico-químicas de la leche varían sensiblemente según las especies animales, e incluso según las diferentes razas.

2.2.1. Propiedades físicas

La leche de vaca tiene una densidad media de 1,032 g/mL. Es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases (Farral, 1963):

- ☞ **Solución:** Los minerales así como los carbohidratos se encuentran disueltos en el agua.
- ☞ **Suspensión:** Las sustancias proteínicas se encuentran con el agua en suspensión.
- ☞ **Emulsión:** La grasa en agua se presenta como emulsión.

Figura 2.1. Leche de vaca



Fuente: Extraído el 18 de mayo del 2015 desde <http://www.zonadiet.com/bebidas/leche.htm>

2.2.2. Propiedades químicas

Una de las propiedades importante en la leche es la cantidad de ácido láctico, que suele ser entre el 0,15 - 0,16%.

Tabla 2.1. Análisis químico proximal de la leche de vaca

Composición de la leche en gramos por cada 100 gramos					
Agua (g)	Energía (Kcal)	Materia Grasa (g)	Proteínas (g)	Lactosa (g)	Materias Minerales (g)
88,0	61,0	3,4	3,2	4,7	0,7

Fuente: (Agrobit, 2015)

Las sustancias proteínicas de la leche son las más importantes en el aspecto químico. Se clasifican en dos grupos: proteínas y enzimas (esta actividad enzimática depende de los factores temperatura y pH).

2.2.3. Propiedades microbiológicas

La leche recién obtenida es un sustrato ideal para un gran número de géneros bacterianos, algunos beneficiosos y otros perjudiciales, que provocan alteraciones diversas del alimento y sus propiedades (Foster & Speck, 1965).

Tabla 2.2. Análisis microbiológico de la leche cruda

Tipo de bacteria	Efecto sobre el alimento.	Condiciones necesarias para su activación
Butíricas	Generan coágulos grasos en la leche no acidificada. La alteración de la grasa puede generar un espesor muy poco deseado.	Requiere de poca acidez y de un pH superior a 6,8.
Lácticas	Son las bacterias que convierten mediante la fermentación la lactosa en ácido láctico.	Requiere de temperatura ambiental o superior.
Patógenas	Alteran todas las propiedades. La acidez disminuye, el pH comienza a hacerse básico, existe una separación irregular de las grasas y la caseína (se "corta") y el olor se hace pútrido.	Requiere de temperaturas de 37 °C y de acidez baja. Usualmente, la leche fuera de refrigeración experimenta estos cambios.

Fuente: (Foster & Speck, 1965. Cap. 2.)

2.3. COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La leche se sintetiza fundamentalmente en la glándula mamaria, pero una gran parte de sus constituyentes provienen del suero de la sangre (Díaz, 2005). La leche está compuesta por (Braverman, 1967):

2.3.1. Agua

El valor nutricional de la leche como un todo es mayor que el valor individual de los nutrientes que la componen debido a su balance nutricional único. La cantidad de agua en la leche refleja ese balance.

En todos los animales, el agua es el nutriente requerido en mayor cantidad y la leche suministra una gran cantidad de agua, conteniendo aproximadamente 90% de la misma. La cantidad de agua en la leche es regulada por la lactosa que se sintetiza en las células secretoras de la glándula mamaria. El agua que va en la leche es transportada a la glándula mamaria por la corriente circulatoria.

2.3.2. Carbohidratos

El principal carbohidrato en la leche es la lactosa. A pesar de que es un azúcar, la lactosa no se percibe por el sabor dulce. La concentración de lactosa en la leche es relativamente constante y promedia alrededor de 5% (4,8% - 5,2%).

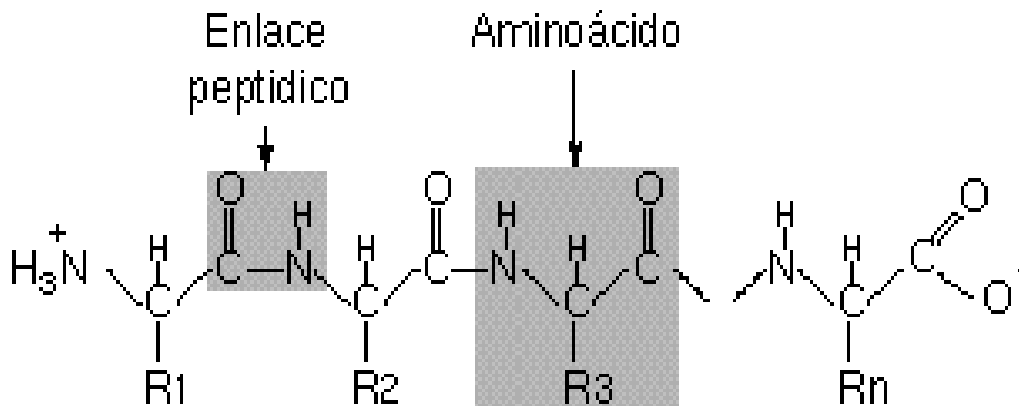
A diferencia de la concentración de grasa en la leche, la concentración de lactosa es similar en todas las razas lecheras y no puede alterarse fácilmente con prácticas de alimentación. La molécula de lactosa se encuentra constituida por glucosa y galactosa.

2.3.3. Proteínas

La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteína (Figura 2.2). Los bloques que construyen a todas las proteínas son los aminoácidos. Existen 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas.

El orden de los aminoácidos en una proteína, se determina por el código genético, y le otorga a la proteína una conformación única. Posteriormente, la conformación espacial de la proteína le otorga su función específica.

Figura 2.2. Estructura de las proteínas (R1, R2, etc., son los radicales específicos de cada aminoácido. El número de aminoácidos en la caseína de la leche varía de 199 a 209)



Fuente: (Agrobit, 2015)

La concentración de proteína en la leche varía de 3,0 a 4,0% (30 - 40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche. Existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la cantidad de proteína en la leche, cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína.

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y séricas (20%). Históricamente, esta clasificación es debida al proceso de fabricación de queso, que consiste en la separación del cuajo de las proteínas séricas luego de que la leche se ha coagulado bajo la acción de la renina (una enzima digestiva colectada del estómago de los terneros).

2.3.4. Lípidos

Las propiedades de la leche son el reflejo de los ácidos grasos que contiene. Así tenemos varios grupos de lípidos presentes en la leche, los cuales se presentan en la siguiente tabla.

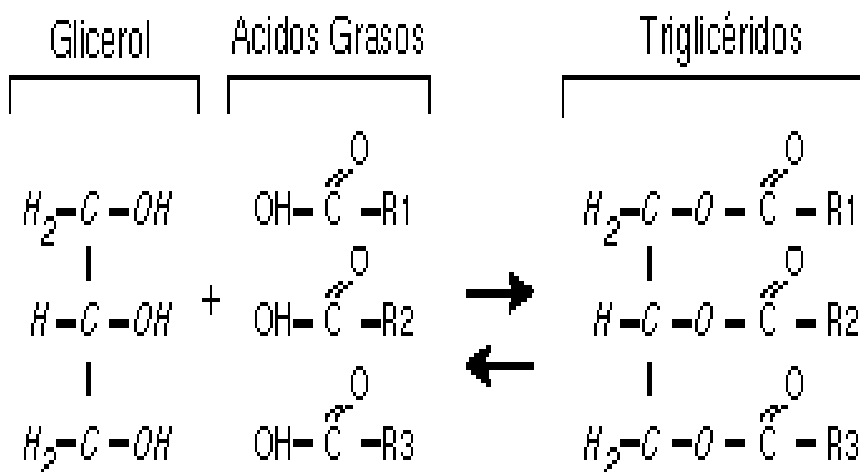
Tabla 2.3. Composición de lípidos en la leche

Lípido	Porcentaje del total de lípidos
Triglicéridos	97 - 98
Diglicéridos	0,4 – 0,6
Monoglicéridos	0,02 – 0,03
Fosfolípidos	0,3 – 0,8
Ácidos grasos libres	0,03 – 0,1
Colesterol	0,25 – 0,35

Fuente: (Hernandez, 1999)

Los Triglicéridos se encuentran como pequeñas partículas llamadas glóbulos. Contienen una gran cantidad de ácidos grasos, identificándose hasta 400 tipos diferentes en la leche de vaca. Sin embargo, el 96% del total lo conforman sólo 14 ácidos grasos, siendo los más importantes el ácido mirístico, palmítico y oleico.

Figura 2.3. Estructura de los triglicéridos (R1, R2, R3, representan las cadenas de ácidos grasos que le otorgan a los triglicéridos sus características individuales)



Fuente: (Agrobit, 2015)

2.3.5. Minerales y vitaminas

Tabla 2.4. Concentraciones de minerales y vitaminas en la leche (mg/100ml)

Minerales	mg/100 ml	Vitaminas	µg/100 ml
Potasio	138	A	30,0
Calcio	125	D	0,06
Cloro	103	E	88,0
Fósforo	96	K	17,0
Sodio	8	B1	37,0
Azufre	3	B2	180,0
Magnesio	12	B6	46,0
Minerales trazas	<0,1	B12	0,42
		C	1,7

Fuente: (Braverman, 1967)

Los minerales trazas en la leche incluyen cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, selenio, yodo y otros. La leche es una fuente excelente de la mayoría de los minerales requeridos para el crecimiento del lactante. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche.

2.4. QUESO

Figura 2.4. Queso Moraliq



Fuente: Specialty Cheese. Extraído el 19 de mayo del 2105 desde <http://www.specialcheese.com/queso.htm>

El queso es un alimento sólido elaborado a partir de la leche cuajada de vaca, cabra, oveja, camello u otros mamíferos rumiantes. Es la conserva ideal pues muy difícilmente se estropea con el transcurso del tiempo ya que al secarse mejoran sus cualidades en relación al peso.

La leche es inducida a cuajarse usando una combinación de cuajo (o algún sustituto) y acidificación. Las bacterias se encargan de acidificar la leche, jugando también un papel importante en la definición de la textura y el sabor de la mayoría de los quesos. Algunos también contienen mohos, tanto en la superficie exterior como en el interior.

Para algunos quesos se cuaja la leche añadiéndole ácidos tales como vinagre o jugo de limón. Sin embargo, la mayoría se acidifica en grado menor gracias a las bacterias que se le añaden, que transforman los azúcares de la leche en ácido láctico, a lo que sigue la adición de cuajo para completar el proceso de cuajado.

El cuajo es una enzima tradicionalmente obtenida del estómago del ganado lactante, pero actualmente también se producen sustitutos microbiológicos en laboratorio.

2.4.1. Propiedades nutricionales del queso

Los datos nutricionales del queso pueden variar en función de su contenido en grasa, pero en general se puede decir que es una rica fuente de calcio, proteínas, y fósforo. El queso también comparte con la leche sus problemas nutricionales, derivados del alto contenido en grasas saturadas, consistentes en triglicéridos y ácido graso saturado (Guzman, 2007).

2.4.2. Descripción del proceso de elaboración del queso

Para elaborar queso industrialmente (Dilanjas, 1976), las empresas lácteas emplean los siguientes pasos (Anexo 1):

a. Acopio de leche en planta:

La leche cruda es transportada en cisternas de acero inoxidable y en bidones plásticos; al acopiar la leche se toman muestras de las mismas para hacer los análisis antes de ser almacenadas en cisternas. Realizada esta operación los bidones y cisternas son lavados en áreas externas a la planta.

b. Higienización / Medición / Enfriamiento:

Se hace pasar por un filtro de tela fina, en ese momento puede ser medida ya sea por volumen (contando el número de pichingas llenas y su nivel) o a través de una balanza incorporada al tanque de recepción para medir el peso.

Luego se bombea hacia el sistema de enfriamiento de placas para bajar su temperatura a 4 °C. Este procedimiento no siempre se cumple en todas las queseras.

c. Almacenamiento de leche en planta:

La leche cruda enfriada a 4 °C es almacenada en los tanques silos de leche cruda, antes de ser impulsada a la línea de proceso.

d. Estandarización:

Es bombeada hacia la descremadora para estandarizar el contenido de materia grasa a 2,5 %, separando la grasa en exceso del parámetro en forma de crema.

e. Pasteurización / Enfriamiento / Traslado de leche:

Es impulsada hacia el intercambiador de calor de placas denominado sistema de pasteurización HTST (High Temperature/Short Time) por medio de bombeo, en el cual se realiza el ciclo de pasteurización a 76 °C durante 15 segundos en la sección de calentamiento del intercambiador de calor y el tubo de mantenimiento (serpentín) para ser enfriada en la sección de enfriamiento del HTST hasta 33 – 34 °C, luego es impulsada a la tina en la que se elaborará el producto.

f. Inoculación:

A la leche enfriada se le agrega los aditivos (cuajo líquido y cultivos lácticos mesófilos) y se agita para lograr una distribución homogénea de los aditivos. Esta operación es realizada en un tiempo aproximado de 10 - 15 minutos.

g. Coagulación:

La mezcla inoculada coagula totalmente a 33 – 34 °C durante un periodo de 30 - 40 minutos.

h. Corte manual de la cuajada:

Una vez que se lleva a cabo la coagulación de la leche se procede al corte del producto formado, utilizando liras de acero inoxidable, que son las que realizan el corte de la leche cuajada.

i. Desuerado:

Se da previamente 30 minutos de agitación rápida auxiliado con las palas plásticas, 10 minutos de agitación lenta y se procede a realizar el desuerado total del producto a 33 – 34 °C durante 45 minutos, haciendo drenar todo el suero contenido en él.

j. Molienda / Salado:

El queso concentrado a 33 – 34 °C, en una alternativa, es llevado en bloque a la máquina picadora para su trituración y se le va agregando la sal con una dosificación de 0,18 libras de sal por cada 4 litros de leche procesada.

k. Moldeo /Prensado:

El producto salado es colocado en moldes de acero inoxidable y prensados a 100 PSI en una prensa hidráulica por un periodo de 48 horas.

l. Maduración:

Es la última fase de la fabricación del queso. La cuajada, antes de iniciarse la maduración, presenta una capacidad, volumen y forma ya determinadas. Suele ser ácida en razón de la presencia de ácido láctico. En el caso de los quesos frescos la fabricación se interrumpe en esta fase.

m. Empaque:

El producto terminado es empacado en bolsas de Poli-Etileno de Baja Densidad.

n. Almacenamiento:

Los quesos son llevados al cuarto frío de almacenamiento de producto terminado manteniéndose la temperatura a 4 – 8 °C para garantizar una vida útil de 60 días.

2.5. LACTO SUERO

El suero de leche es un líquido obtenido en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación de la cuajada o fase micelar. Sus características corresponden a un líquido fluido, de color amarillento, turbio, de sabor débilmente dulce, de carácter ácido, con un contenido de nutrientes o extracto seco de 63 g/L a 70 g/L (Nutrisol, 2009), tal como se muestra en la tabla 2.5.

Figura 2.5. Muestra de lacto suero



Fuente: Diario Fuerza, Mexico. Extraído el 19 de mayo de 2015 desde <http://fuerza.com.mx/2013/06/04/desarrollan-tecnologias-para-uso-de-suero-lacteo-en-chiapas/>

2.5.1. Clases de lacto suero

Existen dos clases de suero: el dulce y el ácido los cuales dependen de los métodos empleados para la coagulación de la leche (Nutrisol, 2009):

☞ **Lacto suero dulce:** Procedente de fabricaciones por el uso de enzimas coagulantes, presentando un pH próximo a 6,5. La precipitación de las proteínas se produce por hidrólisis específica de la caseína.

☞ **Lacto suero ácido:** Obtenida de una coagulación ácida o láctica de la caseína, presentando un pH próximo a 4,5. Se produce al alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína con anulación de las cargas eléctricas que las mantienen separadas por las fuerzas de repulsión que generan, impidiendo la floculación.

2.5.2. Composición

La composición del lacto suero varía con la composición de la leche cruda y el tipo de queso a fabricar dependiendo de la cuajada, se logra cortar la leche por acidificación o por adición de cuajo y se obtiene una variación importante en el contenido de las sales minerales. En la Tabla 2.5, se puede detallar la composición nutricional del lacto suero dulce y ácido.

Tabla 2.5. Composición nutricional del lacto suero

Componentes	Lacto suero dulce (g/L)	Lacto suero ácido (g/L)
Sólidos totales	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactosa	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
Proteínas	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfatos	1,0 – 3,0	2,0 – 4,5
Cloruros	1,1	1,1
Ácido láctico	2,0	6,4

Fuente: (Panesar & Bunko, 2007)

El suero dulce, obtenido por adición de cuajo, contiene poco calcio, en el caso del suero obtenido por acidificación, el ácido láctico se convierte en lactato cálcico que aparece en el suero. En la Tabla 2.6 se puede ver la composición del suero dulce y ácido.

Tabla 2.6. Composición del suero dulce y ácido.

Componentes	Lacto suero dulce (%)	Lacto suero ácido (%)
Humedad	93 - 94	94 - 95
Lactosa	4,6 – 5,2	4,4 – 4,6
Proteínas	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0
Grasa	0,2 – 0,7	0,04
Minerales	0,05	0,4

Fuente: (Madrid, 1999)

El lacto suero contiene un poco más del 25% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y cerca del 95 % de la lactosa (Inda, 2001).

En cualquiera de los tipos de lacto suero obtenidos, se estima que por cada 10 kg de queso se producen 9 kg de lacto suero, esto representa cerca del 85 - 90 % del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55 % de sus nutrientes (Liu, Chung, & Yuosef, 2005). Entre los más abundantes de estos nutrientes están la lactosa (4,5 - 5 % p/v), proteínas solubles (0,6 – 0,8 % p/v), lípidos (0,4 – 0,5 %) y sales minerales (8 - 10 % de extracto seco) (Muñi, 2005).

También presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del fósforo, sodio y magnesio. Cuenta con vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico (Londoño, 2006).

2.5.3. Calidad del lacto suero

Los sueros obtenidos durante el corte de la cuajada de los quesos texturizados y no texturizados, son menos ácidos que los que se obtienen durante la texturación o el prensado. La concentración de lactosa en el suero es bastante constante pero depende de la producción de lactosa original.

El contenido proteínico depende en su mayor parte del tipo de coagulo, de su tratamiento y la presencia en el mismo de partículas de cuajo puede aumentarla considerablemente. El porcentaje de grasa depende en su mayor parte del tratamiento, el contenido en sales suele ser bastante constante, depende de la adición a la leche de algunos compuestos como nitrato y muy especialmente de cloruros o hidróxidos cálcicos.

2.5.4. Beneficios que aporta en el organismo

Aporta elementos depurativos, desintoxicantes y prebióticos, a la vez que permite acumular una buena reserva de sales minerales y vitaminas que favorecen el rejuvenecimiento interno (*Discovery Home & Health, 2012*):

☞ **Minerales:** Calcio, magnesio, manganeso, sodio, potasio y fósforo.

☞ **Vitaminas:** A, B1, B2, B3, B5, B6, C, E y D.

Sus componentes naturales (beta lactosa, ácido láctico L (-), oligosacáridos e inulina), generan un gran efecto prebiótico fundamental para mantener una flora intestinal correcta y equilibrada, fundamental para el organismo.

Las proteínas del lacto suero no sólo desempeñan un papel nutritivo importante como una fuente balanceada de aminoácidos, sino que además parecen tener en muchos casos efectos biológicos y fisiológicos positivos en nuestro organismo. Por ejemplo, tienen una actividad anticancerosa, pues se ha demostrado su papel preventivo frente al cáncer de

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

colon, y asimismo como un estimulador de la respuesta inmune, o sea, ayudan a prevenir infecciones causadas por virus o bacterias.

Al referirse a las proteínas del suero de queso (lacto suero), no se puede evitar hacer mención del glicomacropéptido, también conocido como caseinomacropéptido o caseinoglicopéptido, que es un glicopéptido presente en el suero que es liberado por la caseína al agregar el cuajo a la leche durante la fabricación del queso. Se le han atribuido numerosos efectos; entre los cuales los más importantes son los siguientes (*Discovery Home & Health, 2012*):

☞ **Efecto en la motilidad gastrointestinal:** Se ha hallado que reduce significativamente la secreción gástrica, ayudando con esto a la prevención de diferentes tipos de diarreas.

☞ **Efecto sobre la actividad antitrombótica:** Posiblemente uno de los papeles fisiológicos más importantes asociados con este péptido es su actividad antitrombótica, pues evita la formación de coágulos responsables de la obstrucción del flujo sanguíneo, lo que ocasiona graves riesgos a la salud.

2.5.5. Contaminación por lacto suero

El lacto suero constituye el principal subproducto de la industria láctea y su alto contenido de materia orgánica lo convierte en un importante contaminante si es vertido directamente al medio acuático o al terreno. Igualmente, cuando es vertido a la red de saneamiento puede saturar las estaciones de depuración de aguas residuales. Su gestión como residuo es muy difícil y costoso por el alto volumen de agua que contiene y por el alto costo de tratamiento que requiere, además, supone una pérdida de materia prima de alto valor nutritivo ya que contiene proteínas, lactosa, vitaminas, etc. (*Pozo, 2013*)

La descomposición del lacto suero en los ríos ha de acarrear fuertes consecuencias para la fauna fluvial: Su riqueza en azúcares, proteína y sales minerales, hacen que este producto sea el principal responsable de la polución (contaminación del medio ambiente) causada por el sector lácteo.

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

La contaminación orgánica de las corrientes fluviales depende de la cantidad de materia orgánica que se vierta en el río y del volumen de agua limpia que existe para su dilución. La incorporación de lacto suero a las corrientes fluviales, y siempre de acuerdo con el caudal de sus aguas, produce un enriquecimiento de materia orgánica, que en pequeñas concentraciones estimulan la producción primaria de peces, bacteria, algas, crustáceos, etc., pero cuando la contaminación es avanzada por una gran concentración de materia orgánica, el consumo de oxígeno aumenta, existe un excesivo crecimiento de seres microscópicos con una demanda enorme de oxígeno en concentraciones mayores que la que es capaz de disolverse en el agua. (Laín, 2000)

Si a pesar de la agitación de la corriente fluvial, hay deficiencias o carencias de oxígeno, el resultado es que los organismos aeróbicos, tanto de plantas como de animales, no pueden vivir muriendo por asfixia, desarrollándose una población anaerobia, en un agua turbia, maloliente, con formación de gases, depositándose lodos, con abundante materia muerta en descomposición al agotarse el oxígeno disuelto.

Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental. La continua descarga de este subproducto en la tierra afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas por las variaciones de pH y provocando serios problemas de contaminación de agua subterránea en las deposición. (Rodríguez, 2012)

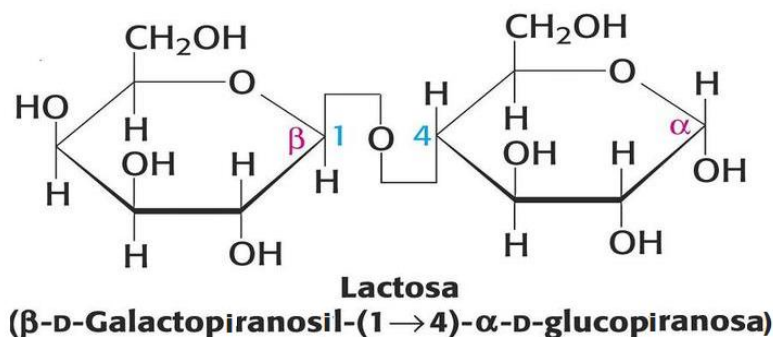
2.6. LACTOSA

La lactosa es un disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa (Díaz de la Vega., 2007). Específicamente intervienen una β -galactopiranososa y una β -glucopiranososa unida por los carbonos 1 y 4 respectivamente (Figura 2.6). Además es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes en todas las leches. De los componentes de la leche es el más abundante (40% de los sólidos de la leche de vaca), el de estructura química más simple y el más constante en proporción.

La lactosa, 4-O-(β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopiranososa) de fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11}$, con una masa molecular de 342 g/mol. Desde el punto de vista químico, la lactosa es un glúcido reductor perteneciente al grupo de los diholósidos (nombre genérico de los carbohidratos que resultan de la unión de dos osas), dando por hidrólisis glucosa y galactosa.

La lactosa se encuentra en la leche en dos formas químicas isómeras: α y β , ellas se diferencian entre sí por la posición del grupo OH^- , por el desigual giro del rayo polarizado y por su diferente solubilidad en el agua.

Figura 2.6. Formula estructural de la lactosa



Fuente: (Académica, 2014)

La lactosa no es tan dulce como otros azúcares como: sacarosa, glucosa y fructuosa. A concentraciones mayores es relativamente más dulce. Así por ejemplo, soluciones de sacarosa de 1, 5, 10 y 20 % tienen el mismo poder edulcorante que soluciones de lactosa del 3,5 %, 15 %, 30 % y 33 %.

Es el componente de la leche más débil frente a la acción microbiana. La leche es fácilmente presa de bacterias de diversos tipos, que transforman la lactosa en ácido láctico y en otros ácidos alifáticos; transformación a veces nociva y frecuentemente muy útil. Los microorganismos transforman la lactosa en ácido láctico, de este modo provocan la fermentación láctica, que trae como consecuencia la coagulación de la leche.

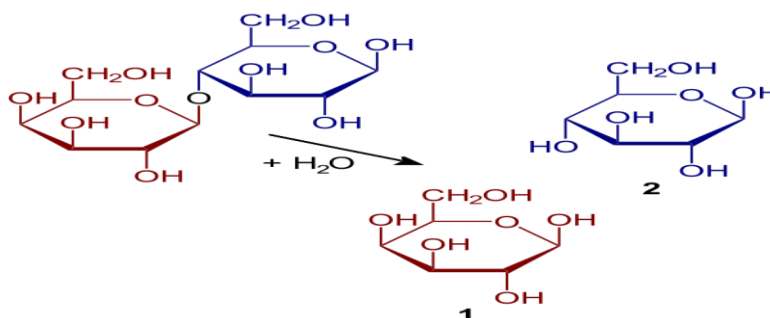
Puede sufrir también la fermentación alcohólica cuando es atacada por levaduras que producen una enzima que hidroliza este azúcar en glucosa y galactosa (Díaz de la Vega., 2007).

2.6.1. Hidrólisis ácida de la lactosa

La hidrólisis ácida es un proceso en el que un ácido prótico se utiliza para catalizar la escisión de un enlace químico a través de una reacción de sustitución nucleófila, con la adición de agua.

La hidrólisis de la lactosa es bastante difícil; es un azúcar que presenta una cierta estabilidad frente a los agentes químicos. Se precisa la acción de los ácidos en caliente para desdoblarla.

Figura 2.7. Molécula de lactosa, descompuesta mediante la hidrólisis en β -D-glucosa (2) y β -D-galactosa (1)



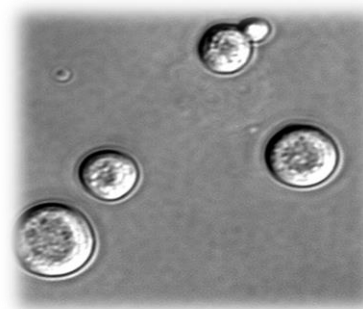
Fuente: (Yikrazuul, 2014)

2.7. SACCHAROMYCES CEREVISIAE

La *Saccharomyces cerevisiae* es una especie de levadura que pertenece al reino Fungí, del orden Saccharomycetales y género *Saccharomyces* (Cáceres J., 2002). Es un hongo unicelular perteneciente a los Ascomicetos, las diferentes morfologías en que se puede encontrar son óvalos, esféricos o cilíndricas; el ciclo de vida de las levaduras alterna dos formas, una haploide y otra diploide.

También estas levaduras se conocen como un sistema eucariota, con una complejidad sólo ligeramente superior a la de la bacteria pero que

Figura 2.8. *Saccharomyces cerevisiae*. Vista microscópica con lente x 40



Fuente: Página de la Sociedad Española de Microbiología. (Extraído el 16 de octubre de 2014 desde http://fresno.pntic.mec.es/msap0005/1eso/T09-virus-bacteria-otros/Tema_9.htm)

comparte con ella muchas de sus ventajas técnicas. Además de su rápido crecimiento, la dispersión de las células, la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, destaca por un sencillo y versátil sistema de transformación de ADN. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con las mínimas precauciones.

Las utilidades industriales más importantes de esta levadura son la producción de cerveza, pan y vino, gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Básicamente este proceso se lleva a cabo cuando esta levadura se encuentra en un medio muy rico en azúcares (como la D-glucosa e incluso bajo ciertas condiciones galactosa). En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación.

2.7.1. Nutrición de *Saccharomyces cerevisiae*

a. Requerimientos de macroelementos

☞ **Requerimientos de Carbono:** Los azúcares son la principal fuente de carbono y energía donde la levadura es capaz de fermentar la sacarosa (glucosa y fructosa), galactosa, manosa y en general hexosas. Por el contrario, no fermenta la maltosa, lactosa y pentosas.

☞ **Requerimientos de Nitrógeno:** Este elemento constituye el 10 % de la materia seca. Las principales fuentes son las sales de amonio inorgánicas, el acetato de amonio, carbonato, bicarbonato, lactato, sulfato y tartrato de amonio. Los aminoácidos necesarios para un óptimo crecimiento son la anilina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina y valina. Aquellos aminoácidos para un crecimiento moderado son la isoleucina, metionina, fenilalanina, serina y triptófano.

☞ **Requerimientos de Fósforo:** El dihidrógeno fosfato de potasio suministra las necesidades de fósforo en la levadura a partir del anión monovalente $H_2PO_4^-$.

☞ **Requerimientos de Azufre:** En cuanto a estas necesidades, el sulfato de amonio, el sulfito y el tiosulfito suple dichos requerimientos.

b. Requerimientos de microelementos

Se encuentran el potasio, magnesio, calcio, zinc, manganeso y el cloro. Además de los mencionados anteriormente también se incluyen el cobalto, boro, cadmio, cromo, cobre, yodo, molibdeno, níquel y vanadio como microelementos.

c. Inhibidores de crecimiento

Entre los elementos inhibidores se tienen la plata, arsénico, bario, litio, níquel, osmio, plomo, selenio y telurio.

2.7.2. Factores y condiciones de crecimiento

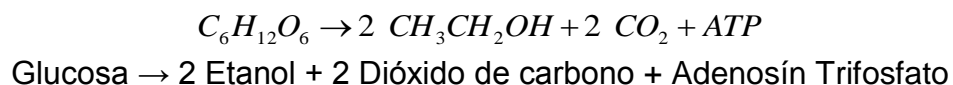
Entre los principales factores para el desarrollo de la levadura se tienen:

- a. Vitaminas:** Biotina, tiamina, piridoxina, ácido p-amino benzoico, niacina, ácido fólico, riboflavina.
- b. Inositol:** Esta sustancia es esencial para la división celular.
- c. pH:** Él pH debe estar entre 5,8 y 6,3.
- d. Temperatura:** Entre 0 °C y 40 °C con un valor óptimo entre los 28 °C y 35 °C.
- e. Actividad de Agua:** Debe ser mayor a 0,6.

2.8. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Es un proceso anaeróbico que genera etanol, desprende grandes cantidades de dióxido de carbono (CO_2) y energía para el metabolismo de las bacterias anaeróbicas y levaduras (Ward, O.P., 1991).

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol ($CH_3 - CH_2 - OH$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. La reacción general es la siguiente:



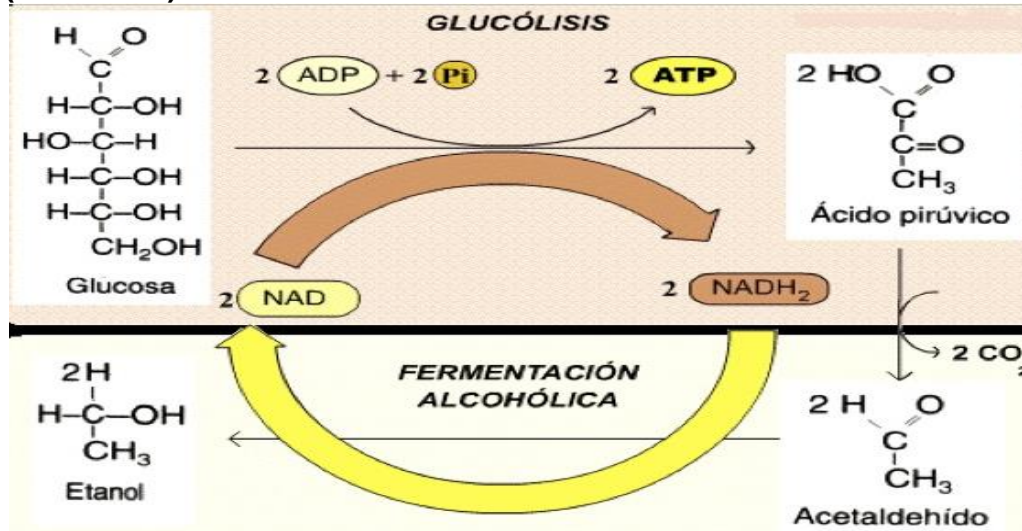
La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno a partir de la glucosa. En el proceso las levaduras obtienen energía disociando las moléculas de glucosa y generan como desechos alcohol y dióxido de carbono CO_2 .

2.8.1. Bioquímica de la reacción de fermentación

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, por lo que necesita de enzimas para su completo funcionamiento. A pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede describirse como una glucólisis de tal forma que puede verse como participa inicialmente una molécula de hexosa (Lehninger, 2004):



Diagrama 2.1. Mecanismo de reacción para la producción de etanol a partir de glucosa (Glucólisis)



Fuente: (Ortiz, 2014).

Como es de todo conocimiento la fermentación alcohólica es una reacción exotérmica, se libera una cierta cantidad de energía. Un cálculo realizado sobre la reacción química que se muestra en el diagrama 2.1 el etanol resultante es de 51 % del peso, los rendimientos obtenidos en la industria alcanzan el 28 %. De igual forma la presencia de fosfatos, es importante para la evolución del proceso de fermentación.

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

La presencia de azúcares asimilables superiores a una concentración de los 0,16 g/L produce invariablemente la formación de alcohol etílico en proceso de crecimiento de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) incluso en presencia de exceso de oxígeno (aeróbico), este efecto es tenido en cuenta a la hora de estudiar y tratar de modificar la producción de etanol durante la fermentación.

Si bien el proceso completo descrito simplificado anteriormente explica los productos resultantes de la fermentación etílica de una hexosa, cabe destacar que el proceso se puede detallar en una glucólisis previa gobernada por un conjunto de enzimas en la que se obtiene 2 moles de piruvato tal y como se describe a continuación (*Audesirk & Audesirk, 2003*):

La reacción química se describe como la reducción de dos moléculas de Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a NADH (forma reducida del NAD^+) con un balance final de dos moléculas de ADP que finalmente por la reacción general mostrada anteriormente se convierten en ATP (adenosín trifosfato). Otros compuestos trazados en menores proporciones que se encuentran presentes tras la fermentación son: el ácido succínico, el glicerol, el ácido fumárico.

En más detalle durante la fermentación etílica en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol). En primer lugar el piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono (CO_2) a partir de iones del hidronios (H^+) y electrones del NADH.

Tras esta operación el NADH sintetizado en la reacción bioquímica catalizada por el GADHP (Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa) se vuelve a oxidar por el alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD^+ para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol. Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12 % de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20 % de concentración de etanol.

2.8.2. Limitaciones del proceso de fermentación

La determinación de los factores que limitan la glucólisis fermentativa son complejos, debido a la interrelación existente y a la naturaleza de los parámetros intervinientes durante el proceso de fermentación. En las limitaciones que surgen durante el proceso se pueden enumerar algunos de los más importantes como son (Riegel & Kent, 2003):

a. Concentración de etanol resultante: Una de las principales limitaciones del proceso, es la resistencia de las levaduras a las concentraciones de etanol que se llegan a producir durante la fermentación, algunos microorganismos como el *Saccharomyces cerevisiae* pueden llegar a soportar hasta el 20 % de concentración en volumen.

b. Acidez del sustrato: El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación ya que las levaduras se encuentran afectadas claramente por el ambiente, bien sea alcalino o ácido.

Por regla general el funcionamiento de las levaduras está en un rango de pH que va aproximadamente desde 3,5 a 5,5. Se debe procurar mantener los niveles óptimos de acidez durante la fermentación usualmente mediante el empleo de disoluciones tampón. Los ácidos de algunas frutas (ácido tartárico, málico) limitan a veces este proceso.

c. Concentración de azúcares: La concentración excesiva de carbohidratos en forma de monosacáridos y disacáridos puede frenar la actividad bacteriana. De la misma forma la baja concentración puede frenar el proceso. Las concentraciones límite dependen del tipo de azúcar así como de la levadura responsable de la fermentación.

d. Contacto con el aire: Una intervención de oxígeno (por mínima que sea) en el proceso lo detiene por completo (es el denominado Efecto Pasteur). Esta es la razón por la que los recipientes fermentadores se cierran herméticamente.

e. La temperatura: El proceso de fermentación es exotérmico, y las levaduras tienen un régimen de funcionamiento en unos rangos de temperatura óptimos, se debe entender además que las levaduras son seres mesófilos.

Si se expone cualquier levadura a una temperatura cercana o superior a 55 °C por un tiempo de 5 minutos se produce su muerte. La mayoría cumple su misión a temperaturas de 30 °C.

f. Ritmo de crecimiento de las cepas: Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levaduras.

2.8.3. Etapas en el proceso de fermentación y obtención de etanol

El proceso de producción de etanol está compuesto por las siguientes etapas o fase (Limpas, 2014):

a. Clarificación

El objetivo de esta etapa es disminuirle a la materia prima el contenido de azúcar para una buena incubación de la levadura; esta preparación consiste en clarificarlos convenientemente, acidularlos y añadirles los nutrientes necesarios para la levadura. Todo ello depende de las condiciones y características de la materia prima que se utilice, ya que como se mencionó en el punto 2.8.2 las propiedades de estas dependen el crecimiento adecuado de la levadura.

b. Esterilización

Se realiza esta etapa con el fin de evitar en la levadura cualquier infección por causa de microorganismos que estén presentes en la materia prima y que al contrario de ser necesarios para la fermentación, son perjudiciales para la misma. La esterilización se opera a temperaturas cercanas a los 107 °C, aunque la temperatura estará en dependencia de la materia prima que se emplea para la fermentación.

c. Fermentación

La fermentación puede llevarse a cabo mediante procesos discontinuos, alimentados a intervalos o continuos. Los cultivos discontinuos pueden considerarse como un sistema cerrado, excepto para la aireación, que contiene una cantidad limitada del medio. Los sistemas de cultivos discontinuos alimentados a intervalos o continuos, se utilizan en la mayoría de los procesos de fermentación industrial y están particularmente adaptados a los procesos de fermentación en los que el producto se forma mayoritariamente después de la fase de crecimiento exponencial.

La principal desventaja de la fermentación discontinua cuando se utiliza para la producción de productos asociados al crecimiento, es que la formación eficiente de producto tiene lugar únicamente durante una fracción del ciclo de fermentación.

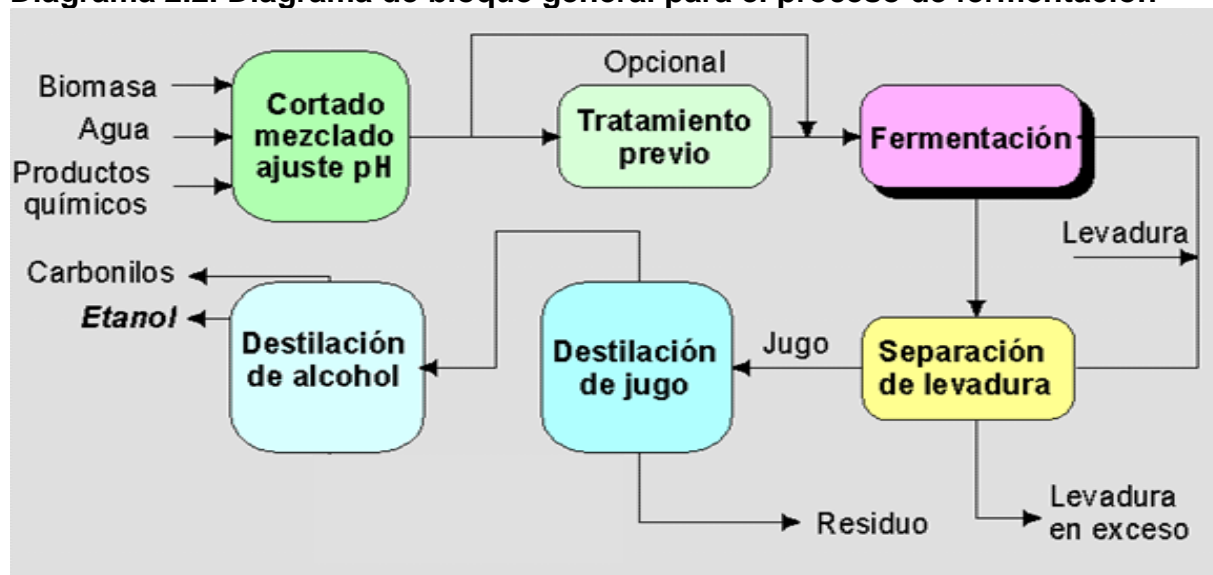
Los sistemas continuos con volúmenes de salida de producto elevados pueden ser, en consecuencia, mucho más eficaces en determinadas aplicaciones en términos de productividad del fermentador. Las fermentaciones continuas pueden considerarse como un sistema abierto en el que el medio se va añadiendo continuamente al bioreactor y se va eliminando simultáneamente igual volumen de medio fermentado.

El proceso fermentativo, es el resultado de una serie de reacciones parciales, las cuales se realizan a una gran velocidad hasta tal punto que el reconocimiento de los productos intermedios en presencia de la célula viva es muy difícil y en algunos casos imposibles. De ahí el gran obstáculo que se tiene para formular un mecanismo de la reacción.

d. Destilación

La destilación es la operación mediante la cual se separan los componentes de una mezcla de varios líquidos; los líquidos se separan suministrando calor a la mezcla, llegando al instante en que la temperatura alcanzada es la temperatura de ebullición del componente más volátil; las moléculas de este se escapan de la mezcla líquida pasando a un estado de vapor y mediante la refrigeración posterior son condensados.

Diagrama 2.2. Diagrama de bloque general para el proceso de fermentación



Fuente: (eBIO, 2014).

2.9. CROMATOGRAFÍA DE GAS (CG)

La **cromatografía de gases** es una técnica muy utilizada para separar los diferentes compuestos volátiles de una muestra. La fase móvil es un gas inerte, (nitrógeno o helio) que transporta la muestra volatilizada en el inyector a través de la columna cromatográfica.

La fase estacionaria generalmente está constituida por una columna de metil polisiloxano, o derivados de éste. Los diferentes compuestos se separan en función de su grado de volatilidad (punto de ebullición, peso molecular) y su afinidad por la fase estacionaria.

La cromatografía de gases tiene la ventaja de disponer de detectores mucho más universales (por ejemplo, el de ionización de llama). Además, para numerosas aplicaciones, los métodos son más simples, más rápidos y más sensibles que los correspondientes a la cromatografía líquida de alta resolución.

Sin embargo, en cromatografía de gases, la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es considerable, a diferencia de la cromatografía líquida. Por ello, la cromatografía de gases presenta limitaciones en tres casos:

- a. Compuestos poco volátiles, generalmente los de peso molecular superior a 300 u.m.a.

- b. Compuestos sensibles a una elevación de la temperatura incluso moderada (determinados compuestos de interés biológico).
- c. Compuestos que se encuentran en forma iónica (puesto que son en general poco volátiles).

Por esta razón, la cromatografía de gases se emplea cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400 °C. A menudo la cromatografía de gases se emplea para confirmar de la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada.

2.9.1. Cromatografía de Gas con Detector de Ionización de Llama (CG-FID)

La **cromatografía de gases con detector de ionización de llama o GC-FID** es una técnica analítica muy común cuyo uso está muy extendido en los mercados petroquímicos, farmacéuticos y de gas natural. Un detector de ionización de llama suele utilizar una llama de aire o hidrógeno por la cual se pasa la muestra para oxidar las moléculas orgánicas y que produce partículas con carga eléctrica (iones). Los iones se recogen y se produce una señal eléctrica, que se mide a continuación.

Como es habitual también en otras técnicas de cromatografía de gases, se necesita un gas portador con pocas impurezas de agua y oxígeno, ya que el agua y el oxígeno pueden interactuar con la fase estacionaria y provocar problemas significativos, como un elevado ruido de línea base y purga de la columna en el cromatograma de gases de salida, lo que reduciría la sensibilidad del analizador y la vida útil de la columna.

El detector de ionización de llama es además extremadamente sensible a las impurezas de hidrocarburo del suministro de hidrógeno y aire de la llama. Estas impurezas pueden aumentar el ruido de línea base y reducir la sensibilidad del detector.



CAPITULO III

HIPÓTESIS



Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Efectuando hidrólisis ácida al lacto suero y después fermentando en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* se obtiene etanol a escala piloto.



CAPITULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO



4.1. Descripción del ámbito de estudio y tecnológico

Este estudio se realizó en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua); Julio 2014- Agosto 2015.

En cuanto al área tecnológica el estudio se ubica en Biotecnología Industrial, ya que la principal materia prima es un residuo procedente de la industria láctea, utilizado en conjunto a microorganismos biológicos para obtener etanol a escala piloto.

4.2. Tipo de estudio

De acuerdo a las características del estudio es descriptivo (*Piura, 2006*), puesto que se seleccionó una serie de conceptos o variables y se mide cada una de ellas independientemente de las otras, con el fin, precisamente, de describirlas.

Si los valores de una variable aumentan en tanto disminuyen los de la otra, se considera un estudio de correlación negativa, por lo tanto a mayor consumo de lactosa por las levaduras (reducción de la misma) aumenta el contenido de etanol producido; esto quiere decir que el estudio cumple con este concepto y es un estudio de correlación negativa. (*Hernández, Fernández, & Baptista, 1991*)

Con respecto a la aplicabilidad que se da a los resultados indica un tipo de investigación aplicada y basado en el nivel de profundidad del conocimiento y su orientación en el tiempo puede considerarse como un estudio longitudinal de carácter explicativo. (*Piura, 2006*)

4.3. Población y muestra

4.3.1. Población:

Una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones (*Hernández, Fernández, & Baptista, 1991*), por lo tanto el universo en estudio es el lacto suero generado como residuo durante la elaboración de queso por las cooperativas lácteas distribuidas en todo el país.

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

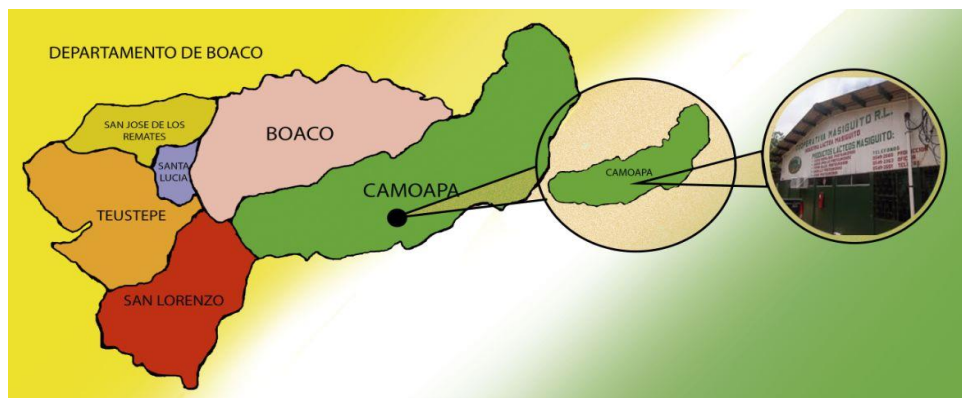
Por consiguiente se ha escogido como población el lacto suero generado en la producción de Queso Moralique en la cooperativa láctea Masiguito.

4.3.2. Muestra:

La muestra seleccionada es no probabilística intencional (Hernández, Fernández, & Baptista, 1991), puesto que las muestras no probabilísticas es la elección de los elementos, no dependiente de la probabilidad, sino de causas relacionadas con el investigador o del que hace la muestra. En base a lo mencionado el lacto suero que se utilizó para producir etanol es el de origen dulce por su mayor contenido de lactosa.

El lacto suero se obtuvo de la Cooperativa de Servicio y Crédito para la Producción Agropecuaria Masiguito R.L.

Figura 4.1. Cooperativa de Servicio y Crédito para la Producción Agropecuaria Masiguito R.L., este negocio se ubica en el municipio de Camoapa, Departamento de Boaco, a 120 km de Managua.



Fuente: Propia.

El suero es desechado en una pila de oxidación que la empresa dispone, al ser un único desecho diario, la muestra se tomó directamente de las tinas de desuerado (un total de cinco tinas diferentes, un litro por cada tina). La muestra de cada tina de desuerado se extrajo con una pala plástica de mano (polipropileno) y se almacenó en bolsas de polietileno de alta densidad (Plyflex) preservándolas a una temperatura de 6 °C. Hasta el momento de la realización de los análisis físico-químicos en la Cooperativa láctea (Anexo 2).

4.3.2.1. Criterios de inclusión:

Los criterios de inclusión considerados para la delimitación poblacional son los siguientes:

- a. Lacto suero de origen bovino.
- b. Lacto suero generado en un proceso de coagulación enzimático.
- c. Lacto suero obtenido a partir de la producción de queso Moraliqúe.

4.3.2.2. Criterios de exclusión:

Los criterios de exclusión considerados para la delimitación poblacional son los siguientes:

- a. Lacto suero diferente al de origen bovino.
- b. Lacto suero generado en un proceso de coagulación ácida.
- c. Lacto suero obtenido a partir de la producción de crema, quesillo u otro derivado lácteo.

4.4. Variables y operacionalización

Las variables de estudio en este trabajo se han clasificado de la siguiente forma:

4.4.1. Variables independientes

- a. Porcentaje de lactosa contenido en el lacto suero dulce.
- b. pH del lacto suero dulce.

4.4.2. Variables dependientes

- a. Cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- b. Cantidad de etanol obtenido durante el proceso fermentativo.
- c. Concentración de etanol.

4.4.3. Operacionalización de las variables

Variable	Concepto	Indicador	Valor	Unidad de medida
<u>Independiente</u>				
Porcentaje de lactosa contenido en el lacto suero dulce	Masa de lactosa presente en 100 mL de lacto suero dulce.	Porcentaje masa/volumen	3 – 4	$\frac{\text{g de Lactosa}}{100 \text{ mL de Lacto suero dulce}}$
pH del lacto suero dulce	Concentración de iones hidronio (H ⁺) en el lacto suero dulce.	pH	5,8 – 6,3	Unidades de pH
<u>Dependiente</u>				
Cantidad de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Micorganismo capaz de sintetizar etanol bajo condiciones anaeróbicas.	Masa	6,16 – 6,18	Gramos de levadura
Cantidad de etanol obtenido durante el proceso fermentativo	Alcohol producido por el catabolismo de la glucosa y galactosa en presencia de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Volumen de etanol	45 - 50	Millilitros (mL)
Concentración de etanol	Porcentaje de alcohol resultante de la fermentación.	Porcentaje volumen/volumen	20 - 70	$\frac{\text{mL de Etanol}}{100 \text{ mL de solución}}$

4.5. Material y método

4.5.1. Materiales para recolectar información

Los materiales con los que se contaron son los siguientes:

- a. Fichas de artículos científicos.
- b. Fichas de resumen.
- c. Fichas de citas textuales.
- d. *Técnica de investigación: Entrevista no estructurada al personal laboral de la empresa láctea MASIGUITO.

4.5.2. Materiales para procesar la información

Los materiales utilizados para procesar el trabajo son los siguientes:

- a. Tablas descriptivas.
- b. Figuras, diagramas y procesos.
- c. Software:

Nombre del software	Versión	Compañía
<i>Office Word 2013</i>	15.0.4623.1000	Microsoft Corporation Inc
<i>Office Excel 2013</i>	15.0.4433.1506	Microsoft Corporation Inc.
<i>Office Power Point 2013</i>	15.0.4623.1000	Microsoft Corporation Inc.
<i>Bloc de notas</i>	6.1	Microsoft Corporation Inc.
<i>Paint</i>	6.2.9200.16384	Microsoft Corporation Inc
<i>PROMT Professional</i>	9.0	PROMT Ltd.
<i>Adobe Photoshop CS6</i>	15.0	Adobe Systems Inc.
<i>Adobe Reader XI</i>	11.0.12	Adobe Systems Inc.
<i>Minitab 16 Statistical Software</i>	16.1.0	Minitab Inc.

d. Equipos:

Nombre del equipo	Marca	Modelo	Serie
Termostato eléctrico	Barnstend electrothermal	M242X1	10872425
Termostato eléctrico	Barnstend electrothermal	M242X1	10862230
Termostato eléctrico	Barnstend electrothermal	M242X1	10872449
Termostato eléctrico	Barnstend electrothermal	M242X1	10872451
Termostato eléctrico	Barnstend electrothermal	M242X1	10872452
Manta calefactora 120V 4.17A 8-4 mm Ø	Electrothermal	HM 2000-HS1	7773-8/4
Manta calefactora 120V 3.17A 7-1/2 mm Ø	Brisk heat	HM 1000-HS1	98864/17
Manta calefactora 120V 3.17A 7-1/2 mm Ø	Brisk heat	HM 1000- HS1	98864/7
Manta calefactora 120V 1.5A 5-3/8 mm Ø	Brisk heat	HM0250-HS1	102233/10
Manta calefactora 120V 1.5A 5-3/8 mm Ø	Brisk heat	HM0250-HS1	101974/8
Calentador y agitador magnético. calefacción % agitación RPM 110V 50/60 Hz 500W	BUNSEN	-	29064
Calentador y agitador magnético. calefacción % agitación RPM 110V 50/60 Hz 500W	BUNSEN	-	29065
Calentador y agitador magnético. calefacción % agitación RPM 110V 50/60 Hz 500W	BUNSEN	-	29066
Calentador y agitador magnético. calefacción % agitación RPM 110V 50/60 Hz 500W	BUNSEN	-	29067
Calentador y agitador magnético. calefacción % agitación RPM 110V 50/60 Hz 500W	BUNSEN	-	29069
Micropipeta o pipeta automática 1000 µL.	COMECTA	Dispenfix	51598
Cromatógrafo de Gas	Agilent	7890	A
Balanza de Precisión	JADEVER	SNUG III	1.02
pH-Metro	CRISON INSTRUMENTS, S.A.	GLP 21	
Lactoscan	Milkanalyser ultrasónico	LA50	

Ø: Diámetro

e. Materiales:

Nombre del material	Capacidad	Marca
Balón 100 mL clase A TC 20 °C TOL. ± 0.08 No.5642	100 mL	PIREX®USA
Erlenmeyer esmerilado 24/40 TOL. ± 5% No. 5000	250 mL	PIREX®USA
Termómetros	200 °C	-
Termómetros	120 °C	-
Pizeta wash bottle polyetilene 03-409-22C	1000 mL	FisherBrand
Beacker	25 mL	Simax Czech republic
Beaker No. 7000 TOL. ± 5%	50 mL	PIREX®USA
Beaker No. 7000 TOL. ± 5%	100 mL	PIREX®USA
Beaker No. 7000 TOL. ± 5%	600 mL	PIREX®GERMANY
Beaker No. 7000 TOL. ± 5%	1000 mL	PIREX®GERMANY
Probeta TC 20°C TOL.± 10	100 mL	PIREX®ASIM
Probeta TC 20°C No. 3020	1000 mL	PIREX
Tubos de ensayo 16x125 mm No. catalogo 339-317	10 mL	CURTIN MATHESUM SCIENTIFIC Inc.
Papel filtro No. HB-1 para clarificación de agua muy retencivo y moderadamente rápido Categoría No. E-1047	15 cm Ø	CALGON CORPORATION
Pipeta TD 20°C No. 7080 1 in 1/10 mL	1 mL	PIREX®USA
Pipeta TD 20°C TOL. ± 0.04 mL No.7100	10 mL	PIREX®USA
Succionador	10 mL	-
Frasco winkler 3.3 borosilicato	100 mL	-
Soporte de base metálica		Fisher

Termómetros de 400 mm, mercurio, 76 mm Im inversión 1498556	-10 - 400 °C	FisherBrand
Pinza tres dedos	-	Fisher Castalog®
Conector para destilación 3440	-	PIREX®USA
Codo angular 2440 No. 8940-24	-	PIREX®USA
Perla de ebullición 4 mm No. Catalogo 11-31213	-	FisherScientific
Tapón mono horadado	No. 7	-
Espátulas dobles 8333J95	-	-
Papel aluminio		LUBAN INTERNATINAL

f. Reactivos:

Reactivo	Cantidad	Formula química	Marca	Código cas
Fosfato de sodio monobásico monohidratado	500 g	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fisherbrand	1049-21-5
Ácido clorhídrico	2.5 L	HCl	Fisherquimical	7732-18-5
Agua destilada (Grado 1)	4.40 L	H_2O	Fisherbrand	NC-ISO 3696: 2004
Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	450 g	-	Nevada®	3421
Alcohol etílico	1 L	$CH_3 - CH_2 - OH$	EMPROQUIM	-
Soluciones Lactodaily	1 L		LactoGandolfo	-
Hidróxido de sodio	500 g	$NaOH$	-	-

4.5.3. Método

El procesamiento del lacto suero comienza desde el muestreo hasta la hidrólisis; se inoculan las muestras, empieza la fermentación y luego se extrae etanol para envasarlo. El método aplicado se divide en las siguientes etapas:

4.5.3.1. Muestreo

La muestra de cada tina de desuerado se extrajo con una pala plástica de mano (polipropileno) y se almacenó en bolsas de polietileno de alta densidad (Plyflex) entre las 9:00 a.m. y 10:00 a.m. rotulándose cada bolsa de la siguiente forma: M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅, respectivamente. Se preservaron las muestras a una temperatura de 6 °C hasta el momento de la realización de los análisis físico-químicos en la Cooperativa láctea.

Para el traslado de las muestras desde Camoapa hasta Managua se almacenaron en una hielera (Rubermid) con suficiente hielo para mantener la temperatura a 6 °C, para continuar con su tratamiento.

4.5.3.2. Análisis físico-químicos

El análisis físico-químico del lacto suero se realizó con un analizador de leche ultrasónico, el equipo es un Lactoscan LA50, los parámetros físico-químicos analizados con el respectivo equipo son porcentaje de grasa, sólidos no grasos, lactosa, sólidos, proteína, humedad, densidad, punto de congelación, pH y conductividad eléctrica.

4.5.3.2.1. Optimización y limpieza del Lactoscan LA50

El equipo se enciende y automáticamente se estabiliza en un tiempo aproximado de 3 a 4 minutos, pita y aparece "Ready to Start" (listo para usarse) en la pantalla del mismo. En segunda instancia se hicieron tres corridas con agua destilada Grado 1 (NC-ISO 3696: 2004) con el fin de cerciorar que el equipo no presente interferencias o trazas de análisis previos.

Además para evitar inexactitud durante la medición entre cada una de las repeticiones y muestras por contaminación de análisis previos, el equipo se ajusta a una limpieza automática, la cual consiste en hacer pasar una solución alcalina al 3 % (Lactodaily, distribuido por LACTOGANDOLFO) para eliminar cualquier residuo que pudo haber quedado en el equipo, esta solución se encuentra conectada por mangueras al equipo (Anexo 3). Por último se realiza un corrido con agua destilada Grado 1 (NC-ISO 3696: 2004).

4.5.3.2.2. Preparación de la muestra

La muestra debe estar a una temperatura de 25 °C según indicaciones del equipo (Lactoscan LA50), para este paso en un matraz volumétrico de 500 mL se adicionó 100 mL de lacto suero y se mantuvo en refrigeración durante 5 minutos aproximadamente (este paso se realiza al haber expuesto las muestras fuera del refrigerador).

Utilizando un termómetro (-10 °C a 120 °C) se midió la temperatura. La muestra no necesita ningún tratamiento, por lo tanto es colocada directamente.

4.5.3.2.3. Lectura de la muestra en Lactoscan LA50

Se adicionó 25 mL de muestra en el portamuestras (graduado de plástico con capacidad de 30 mL). Se colocó el portamuestra en la tubería de entrada del analizador, se presiona el botón OK del equipo y aparece reflejado en la pantalla el menú Milk Selector (Selector de leche), se escoge la opción Cal1-Cow (Cal1-Vaca).

Instantáneamente el analizador succiona la muestra de lacto suero, pasa por el tubo neopreno y de silicona hasta el titular de pH, después por el sensor ultrasónico y por último entra al conducto para la recogida de líquidos residuales (Anexo 4). Durante la medición de la muestra la temperatura se muestra en la pantalla.

Una vez finalizada la medición los resultados se muestran en la pantalla hasta que se inicia una nueva medición. Como el analizador está conectado a una impresora por un puerto serial RS232, los resultados son impresos automáticamente.

4.5.3.2.4. Determinación de ácido láctico por volumetría

Con un dosificador de acidez (bureta y frasco sople) con capacidad de 1 mL se determinó el porcentaje de acidez titulable (ácido láctico). En un matraz de 250 mL se adicionó 100 mL de lacto suero, se endulzo con 10 mL de muestra un Beaker con capacidad de 50 mL y una pipeta graduada de 10 mL.

Se midió con la pipeta 9 mL de muestra, se desalojó en el Beaker de 50 mL y se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína al 1 %. Se aforó con solución de NaOH 0,1 N el dosificador de acidez y se comenzó a titular la muestra de lacto suero hasta la aparición de un color rosa persistente por 30 segundos (Anexo 5).

4.5.3.3. Tratamiento de la muestra

Para el tratamiento de las muestras se ejerció la filtración, se empleó un montaje de filtración simple con embudo, soporte universal, soporte para embudos (madera), Beaker de 600 mL y papel filtro circular.

Las muestras se adicionaron a los embudos con probetas de 100 mL (una probeta por muestra); al ser la capacidad de los Beaker de 500 mL en los cuales se depositaba el lacto suero filtrado, al llegar a su capacidad se trasvasó cada muestra a Beaker de 1000 mL respectivamente.

La filtración de las muestras fue simultánea para las cinco muestras (Anexo 6). Los tiempos de filtración son los siguientes: $M_1 = 10$ horas; $M_2 = 11,15$ horas; $M_3 = 10,05$ horas; $M_4 = 10$ horas; $M_5 = 10,15$ horas.

Este método de separación se aplicó con el fin de separar materia grasa, sólidos no grasos y otros sólidos (como minerales), los cuales desfavorecen el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae*.

4.5.3.4. Hidrólisis ácida de lactosa

La hidrólisis se llevó a cabo en dos partes, por lo tanto las muestras se codificaron de la siguiente forma: M_{1,1}; M_{1,2}; M_{2,1}; M_{2,2}; M_{3,1}; M_{3,2}; M_{4,1}; M_{4,2}; M_{5,1} y M_{5,2}. La hidrólisis de las muestras M_{1,1}; M_{2,1}; M_{3,1}; M_{4,1}; y M_{5,1} se realizó simultáneamente, de igual forma la hidrólisis de las muestras M_{1,2}; M_{2,2}; M_{3,2}; M_{4,2} y M_{5,2} (Anexo 7).

Cada muestra se trasvasó a un Beaker Pyrex con capacidad de 600 mL respectivamente. Para efectuar la hidrólisis en el lacto suero se tomó como base las condiciones de hidrólisis para sacarosa, teniendo en cuenta la similitud estructural de los dos disacáridos (lactosa y sacarosa). Por lo tanto se utilizó la siguiente relación:

$$\frac{3,0289 \text{ g de ácido}}{\text{Kg de lactosa}}$$

El montaje para la hidrólisis consta de un soporte universal, un termostato eléctrico con agitador magnético, magnetos, pinza para termómetro, termómetro (-10 °C a 120 °C).

Se introdujo el magneto dentro del Beaker con lacto suero y se activó el termostato. Cuando la temperatura del lacto suero fue constante a 80 °C se adicionó con una micropipeta de 1000 µL el volumen de ácido clorhídrico al 32 % calculado con la relación mencionada anteriormente, en ese instante se activó la agitación del termostato a 600 rpm.

El tiempo de hidrólisis estimado para cada una de las muestras fue de 74,14 minutos. Donde los factores temperatura, agitación y tiempo son las condiciones óptimas para hidrólizar lactosa en lacto suero con una conversión de 88,59 % (Rios, 2006).

Transcurrido 30 minutos después de la hidrólisis (tiempo de enfriamiento) se tomó una alícuota de 25 mL con una pipeta de 50 mL y se midió el pH del lacto suero (con el objetivo de cerciorar el grado de acidez adecuado al inocular), se utilizó un pH-Meter GLP 21 CRISON INSTRUMENTS (Anexo 8).

Se trasvasó cada muestra de lacto suero a su respectiva botella de borosilicato con capacidad de 3,3 litros codificadas como: Muestra 1, Muestra 2, Muestra 3, Muestra 4 y Muestra 5. Se tapó cada botella con un corcho número 7 monohoradado unido a una manguera en espera de la adición del medio de cultivo para la fermentación.

4.5.3.5. Proceso fermentativo

El lacto suero se preparó como sustrato para la acción de las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*); por lo tanto se enriqueció con los siguientes componentes: como nutrientes se adicionó con un Beaker de 25 mL la cantidad de 20,4 gramos de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) como fuente de fósforo y sodio (Anexo 9). También los fosfatos actúan como agentes catalizadores (*Grajales B., 2001*). Además como antiséptico y regulador del pH se agregó con una pipeta automática 800 μ L de ácido clorhídrico como fuente de iones cloruro.

El proceso fermentativo se divide en adición de la levadura, propagación de los microorganismos y la generación de etanol.

4.5.3.5.1. Inoculación de la levadura en el suero lácteo

La presentación de levadura *Saccharomyces cerevisiae* es seca e inactiva, por lo tanto se requiere una preparación del mismo para lograr su activación y poder inocular en el medio que contiene el sustrato necesario para su crecimiento y reproducción.

La preparación consiste en rehidratar la levadura seca en un recipiente antes de su inoculación, para esta acción se utilizaron Beakers de 600 mL de capacidad. La cantidad de levadura a pesar y después preparar está en dependencia de la cantidad de sustrato, esta proporción se calculó con la siguiente relación (*Merchuk, 2003*):

"12% en masa de levadura en relación a la masa de sustrato en el medio de cultivación"

Esta relación nos indica que en dependencia de la masa de lactosa (también se toma en cuenta los azúcares libres de glucosa y galactosa) presente en el suero lácteo se preparara 12 % en masa de levadura. El procedimiento de preparación fue el siguiente:

- a. Se lavó con detergente y agua destilada el Beaker. Además se esterilizó con etanol al 70 %, se secó con papel toalla y se tapó con papel aluminio. Los Beakers se codificaron de la siguiente forma: LevM₁, LevM₂, LevM₃, LevM₄, LevM₅.
- b. Se pesó en una balanza analítica con sensibilidad de 0,05 g (Jadever) el Beaker y se adicionó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* hasta llegar al peso calculado. Se tapó nuevamente con papel aluminio, evitando contaminación durante el traslado de cada Beaker con levadura.
- c. En un Beaker de 100 mL se calentó 100 mL de agua destilada a una temperatura de 32 °C (temperatura a la cual la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no es eliminada).
- d. El agua a la temperatura mencionada en el punto anterior se trasvaso a una probeta de 100 mL y se adicionó lentamente los 100 mL de agua estéril sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae* contenida en el Beaker, sin mezclar.
- e. Se homogenizó el contenido del Beaker con una espátula (previamente lavada y esterilizada con alcohol al 70 %) durante 15 minutos hasta que se consiguió una especie de pasta o crema densa.
- f. Obtenida la pasta o crema se procedió a realizar la oxigenación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de tal forma que se agitó durante media hora. Trascurrido 14 minutos la crema comenzó a desprender gases y aumentar su volumen.
- g. Una vez pasado este tiempo se inocula la crema resultante en el fermentador (botella de borosilicato). Se adicionó utilizando un embudo plástico y haciendo lavados al Beaker con lacto suero hidrolizado, con el fin de no perder levadura (Anexo 9).

4.5.3.5.2. Fermentación

Cada fermentador se construyó con una botella de borosilicato con capacidad de 3,3 litros, un tapón de hule número 7 monohoradado unido a una manguera la cual el extremo

de salida se sumergió en un Beaker (capacidad 600 mL) con 500 mL de agua para completar un sistema anaeróbico (Anexo 10).

Después de la inoculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se tapó el fermentador y se agitó para liberar el oxígeno que se encontraba dentro del fermentador (este paso se realizó con el fin de acelerar el metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*). El control de la fermentación se realizó bajo las siguientes condiciones:

- a. Temperatura del sistema entre los 30 - 32 °C. Medida con un termómetro colocado en los alrededores de los fermentadores, también se introducía dentro del Beaker con agua para indicador real de la temperatura del sistema.
- b. Agitación manual constante durante un tiempo de 15 minutos dos veces al día (9:00 a.m. y 3:00 p.m.) para cada uno de los cinco fermentadores.
- c. Eliminación de gases (CO_2) generados durante la fermentación.

El proceso fermentativo duró 7 días y 7 horas. En las primeras 7 horas no se observó ninguna actividad (observable de forma macroscópica ante la producción de CO_2 , es decir un burbujeo en el agua contenida en el Beaker donde está sumergida la salida de la manguera del fermentador). Se observó liberación de CO_2 hasta el control del primer día a las 3:00 p.m.; en el transcurso de los días 2, 3, 4, 5 y 6 se observó constante liberación de CO_2 durante la agitación manual.

4.5.3.5.3. Culminación de la fermentación

La fermentación se dio por culminada el día 7 al no presenciar liberación de CO_2 , este suceso indica que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* redujo el sustrato y su ciclo de vida ha terminado, es decir ya no existen levaduras *Saccharomyces cerevisiae* por las concentraciones de etanol.

4.5.3.6. Extracción y purificación del etanol

Para la extracción del etanol se utilizó un montaje con mantas calefactoras, termostato, soporte universal, pinzas tres dedos, aro metálico y Kits de destilación 14/24 (condensador lineal o sencillo), el alcohol obtenido en la destilación se almacenó en Erlenmeyers de 250 mL esmerilados, codificados como: 1, 2, 3, 4 y 5 (Anexo 11).

La extracción de etanol se realizó en 2 horas por cada muestra, a una temperatura constante de 78 °C (temperatura de ebullición del etanol). Los destilados obtenidos se trasvasaron a unos balones de 500 mL y se adicionó 100 mL de agua destilada a cada balón.

Los destilados diluidos se sometieron a una segunda destilación como método de purificación. Esta segunda destilación duró 45 minutos a temperatura constante de 78 °C. Cada muestra obtenida se adicionó nuevamente en Erlenmeyers de 250 mL codificados de la misma forma descrita en el primer párrafo del punto 4.5.3.6.

Con una pipeta graduada de 10 mL se tomó una alícuota de 15 mL por cada muestra y se adicionó en tubos de ensayo con capacidad de 20 mL, se taparon los tubos con tapones de hule y codificaron como M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅; estas alícuotas se refrigeraron y se realizó la cuantificación de etanol. Cada Erlenmeyer se tapó, envolvió el borde del tapón y boca del mismo con cinta adhesiva para su preservación (refrigeración).

4.5.3.7. Cuantificación de etanol

La cuantificación del porcentaje de etanol obtenido se determinó con un Cromatografo de Gas (CG) marca Agilent 7890. Se creó la curva de calibración del método con estándares de 20, 40, 60, 80 y 96 % de etanol absoluto grado HPLC, el valor de correlación en la curva de calibrado (tipo lineal) es de 0,99901 (Anexo 12). Se realizó dos corridas por cada muestra, el volumen de muestra inyectado fue de 0,2 µL y el tiempo de retención promedio para el analito de interés fue de 2,423 minutos.

En primera instancia se filtró cada muestra con un econofiltro de nylon (0,45 µm de poro), se cargó el método en el equipo (Method ETANOLPERCENTS.M), se colocó cada vial, se preparó la jeringa mediante secuencias de lavado previo y posterior a cada corrida (jeringa de 5 µl, FN 23-26s/42/HP, 5181-1273) y se realizó la inyección de la muestra. La muestra pasa por el inyector (Split/Splitless a 250 °C, con relación de split 01:10:00) donde se vaporiza la muestra.

El gas portador es Nitrógeno a 30 mL/s, isotérmico a 40 °C durante 5 minutos y luego se realiza una rampa de temperatura de 40 a 120 °C lo cual genera una rampa con un incremento de 20 °C por cada minuto, siendo el tiempo final de cada corrida de 9 minutos.

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Luego la muestra vaporizada pasa por la columna (HP-5 19091J-413 30 m x 0,25 μm , 320 μm), el horno debe funcionar a 40 °C durante 5 min, 40-120 °C a 20 °C/min y 260 °C durante 3 min para separar los componentes de la muestra. Llega al detector FID (Detector de ionización de llama a 320 °C, el gas auxiliar utilizado fue nitrógeno a 30 mL/min) donde cada componente se ioniza para que el detector cuantifique cada señal y obtener el cromatograma.



CAPITULO V
ORGANIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS
RESULTADOS



La organización y análisis de los resultados que se presentan se fundamentan en las variables del estudio.

5.1. Determinación de parámetros físico-químicos del lacto suero

El análisis físico-químico del lacto suero se realizó con un analizador de leche ultrasónico, el equipo es un Lactoscan LA50; excluyendo el porcentaje de ácido láctico el cual se determinó por volumetría. Se realizaron seis réplicas por cada una de las cinco tinas de desuerado, los resultados son los siguientes:

Tabla 5.1. Parámetros físico-químicos de lacto suero en T₁

T ₁	Número de réplicas					
Parámetros	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Grasa (%)	0,01	0,09	0,01	0,09	0,13	0,13
SNF (sólidos no grasos) (%)	5,84	5,93	5,84	5,93	5,94	5,94
Densidad (Kg/m ³)	1025,60	1025,85	1025,60	1025,85	1025,88	1025,88
Lactosa (%)	3,28	3,28	3,28	3,28	3,29	3,29
Sólidos (%)	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Proteínas (%)	2,15	2,18	2,15	2,18	2,19	2,19
Cantidad de agua (%)	32,69	31,53	32,69	31,53	31,34	31,34
Temperatura (°C)	26,1	26,1	28	28	28,7	28,7
Punto de congelación (°C)	-0,350	-0,356	-0,350	-0,356	-0,357	-0,357
pH	6,58	6,70	6,58	6,70	5,27	5,27
Conductividad (mS/cm)	7,46	6,90	7,46	6,90	6,64	6,64
Ácido láctico (%)	8,5	9	8,5	9	9	9

Tabla 5.2. Parámetros físico-químicos de lacto suero en T₂

T ₂	Número de réplicas					
Parámetros	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Grasa (%)	0,18	0,18	0,21	0,21	0,23	0,23
SNF (sólidos no grasos) (%)	5,97	5,97	5,99	5,99	5,99	5,99
Densidad (Kg/m ³)	1025,97	1025,97	1026,00	1026,00	1026,02	1026,02
Lactosa (%)	3,31	3,31	3,31	3,31	3,32	3,32
Sólidos (%)	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Proteínas (%)	2,20	2,20	2,21	2,21	2,21	2,21
Cantidad de agua (%)	30,96	30,96	30,76	30,76	30,57	30,57
Temperatura (°C)	28,2	28,2	27,8	27,8	28,0	28,0
Punto de congelación (°C)	-0,359	-0,359	-0,360	-0,360	-0,361	-0,361
pH	6,44	6,44	5,89	5,89	5,89	5,89
Conductividad (mS/cm)	6,36	6,36	6,23	6,23	6,23	6,23
Ácido láctico (%)	8,5	8,5	9	9	9	9

Tabla 5.3. Parámetros físico-químicos de lacto suero en T₃

T ₃	Número de réplicas					
Parámetros	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Grasa (%)	0,21	0,21	0,21	0,21	0,23	0,23
SNF (sólidos no grasos) (%)	6,00	6,00	5,99	5,99	5,99	5,99
Densidad (Kg/m ³)	1026,06	1026,06	1026,00	1026,00	1026,02	1026,02
Lactosa (%)	3,32	3,32	3,31	3,31	3,32	3,32
Sólidos (%)	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Proteínas (%)	2,21	2,21	2,21	2,21	2,21	2,21
Cantidad de agua (%)	30,57	30,57	30,76	30,76	30,57	30,57
Temperatura (°C)	28,7	28,7	29,0	29,0	28,0	28,0
Punto de congelación (°C)	-0,361	-0,361	-0,360	-0,360	-0,361	-0,361
pH	4,90	4,90	5,41	5,41	5,22	5,22
Conductividad (mS/cm)	6,05	6,05	6,00	6,00	6,02	6,02
Ácido láctico (%)	9	9	9	9	9	9

Tabla 5.4. Parámetros físico-químicos de lacto suero en T₄

T ₄	Número de réplicas					
Parámetros	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Grasa (%)	0,23	0,23	0,22	0,22	0,25	0,25
SNF (sólidos no grasos) (%)	6,03	6,03	6,01	6,01	6,03	6,03
Densidad (Kg/m ³)	1026,16	1026,16	1026,07	1026,07	1026,15	1026,15
Lactosa (%)	3,34	3,34	3,33	3,33	3,34	3,34
Sólidos (%)	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Proteínas (%)	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22
Cantidad de agua (%)	30,19	30,19	30,57	30,57	30,19	30,19
Temperatura (°C)	28,7	28,7	27,8	27,8	27,8	27,8
Punto de congelación (°C)	-0,363	-0,363	-0,361	-0,361	-0,363	-0,363
pH	5,93	5,93	4,92	4,92	4,83	4,83
Conductividad (mS/cm)	5,88	5,88	5,92	5,92	5,88	5,88
Ácido láctico (%)	9	9	9	9	9	9

Tabla 5.5. Parámetros físico-químicos de lacto suero en T₅

T ₅	Número de réplicas					
Parámetros	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Grasa (%)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
SNF (sólidos no grasos) (%)	6,03	6,03	6,03	6,03	6,03	6,03
Densidad (Kg/m ³)	1026,15	1026,15	1026,13	1026,13	1026,13	1026,13
Lactosa (%)	3,33	3,34	3,33	3,34	3,34	3,34
Sólidos (%)	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Proteínas (%)	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22	2,22
Cantidad de agua (%)	30,19	30,19	30,19	30,19	30,19	30,19
Temperatura (°C)	27,8	27,8	27,9	27,9	27,9	27,9
Punto de congelación (°C)	-0,363	-0,363	-0,363	-0,363	-0,363	-0,363
pH	5,35	5,35	5,07	5,07	5,39	5,39
Conductividad (mS/cm)	5,84	5,84	5,82	5,82	5,78	5,78
Ácido láctico (%)	9	9	9	9	9	9

5.1.1. Análisis del porcentaje de lactosa

Se determinó la media y la desviación estándar de cada uno de los valores del porcentaje de lactosa con respecto a las cinco tinas evaluadas. Las fórmulas utilizadas son las siguientes:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Los resultados se presentan en la tabla 5.6:

Tabla 5.6. Cálculo de la media y desviación estándar del porcentaje de lactosa en cada una de las tinas de desuerado

Nº Tina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	\bar{X}	S
1	3,28	3,28	3,28	3,28	3,29	3,29	3,2800	0,00516398
2	3,31	3,31	3,31	3,31	3,32	3,32	3,3133	0,00516398
3	3,32	3,32	3,31	3,31	3,32	3,32	3,3200	0,00516398
4	3,34	3,34	3,33	3,33	3,34	3,34	3,3467	0,00516398
5	3,33	3,34	3,33	3,34	3,34	3,34	3,3400	0,00516398

El valor de la media para el porcentaje de lactosa en cada tina de desuerado se encuentra en un rango cercano, con una diferencia entre el valor máximo y mínimo para cada réplica de 0,01. La desviación estándar calculada es de 0,00516398, este valor indica que los datos obtenidos en las seis replicas para cada tina de desuerado no se encuentran dispersos o bien dicho de otra forma la variabilidad es mínima.

Por lo tanto desde el punto de vista de los autores, no existe mucha dispersión entre las repeticiones y se concluye que el promedio del porcentaje en lactosa tiene una tendencia a variar por debajo o por encima de 0,00516398 por ciento; es decir que no hay variación significativa en los datos.

El porcentaje de lactosa teórico presente en el lacto suero no coincide con el valor cuantificado; esto se debe a que en las bibliografías (Panesar & Bunko, 2007) y (Madrid, 1999) caracterizan la cantidad de lactosa presentes en el lacto suero como carbohidratos totales, es decir que incluyen los monosacáridos libres presentes en el mismo.

Por otro lado en las tablas de composición nutricional presentadas por USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) en su base de datos nutricional no especifica el valor del contenido de lactosa en lacto suero, más bien especifican cantidad de azúcares el cual su valor coincide con el de carbohidratos totales, donde este valor se determina por diferencia (Anexo 13). Por tal razón no se contrastan los datos obtenidos en relación al porcentaje de lactosa al no tener una referencia teórica específica.

Con el fin de comprobar la distribución y comportamiento de los resultados obtenidos en los análisis del porcentaje de lactosa entre cada tina (comparación entre las medias) se aplicó análisis de varianza (ANOVA). A partir de los datos presentados en la tabla 5.6 se establecieron los parámetros para comprobar si existe evidencia de diferencia significativa entre las medias del porcentaje de lactosa en las cinco tinas de desuerado:

Se formuló una hipótesis nula y una alternativa:

$$\begin{array}{l} H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5. \\ H_1: \mu_1 \neq \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5. \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{Esta hipótesis se interpreta así: Las medias de las 5} \\ \text{tinas son iguales.} \\ \text{Al menos uno de las tinas de desuerado tiene una} \\ \text{media distinta del resto.} \end{array} \right.$$

Uso de lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Se aplicó el análisis de varianza unidireccional con un nivel de confianza del 95 % utilizando Minitab 16, las fórmulas utilizadas son las siguientes:

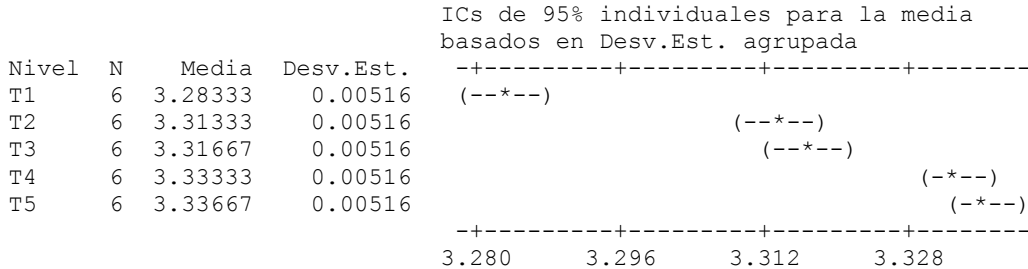
$$\begin{aligned}
 SS_{entre} &= n \cdot \sum (\bar{X}_j - \bar{\bar{X}})^2 \quad (\text{Ec. 3}) & \text{gl} &= K-1 \quad (\text{Ec. 6}) & S_1^2 &= SS_{entre}/K-1 \quad (\text{Ec. 9}) & S_1^2/S_2^2 &= \quad (\text{Ec. 11}) \\
 SS_{Dentro} &= \sum (\bar{X}_j - \bar{\bar{X}})^2 \quad (\text{Ec. 4}) & &= K \cdot (n-1) \quad (\text{Ec. 7}) & S_2^2 &= SS_{Dentro}/K \cdot (n-1) \quad (\text{Ec. 10}) \\
 SS_{Total} &= SS_{entre} - SS_{Dentro} \quad (\text{Ec. 5}) & &= (K \cdot n) - 1 \quad (\text{Ec. 8})
 \end{aligned}$$

El resultado de la prueba de análisis de varianza es el siguiente:

ANOVA unidireccional: T1, T2, T3, T4, T5.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	4	0.0108000	0.0027000	101.25	0.000
Error	25	0.0006667	0.0000267		
Total	29	0.0114667			

S = 0.005164 R-cuad. = 94.19% R-cuad.(ajustado) = 93.26%



Desv.Est. agrupada = 0.00516

Como el $F_{calculado} > F_{tabla}$ ($101,25 > 2,76$) se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe diferencia significativa en el valor de la media del porcentaje de lactosa al menos de una tina de desuerado con respecto a las otras cuatro a un nivel de confianza del 95 %.

Ante esta conclusión el problema radica en saber entre qué tinas se encuentran las diferencias, para dar respuesta ante esta situación se aplicó el método de Tukey; los resultados en minitab son los siguientes:

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Agrupar información utilizando el método de Tukey

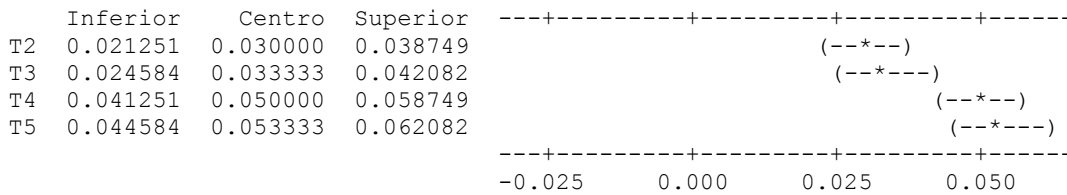
	N	Media	Agrupación
T5	6	3.336667	A
T4	6	3.333333	A
T3	6	3.316667	B
T2	6	3.313333	B
T1	6	3.283333	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

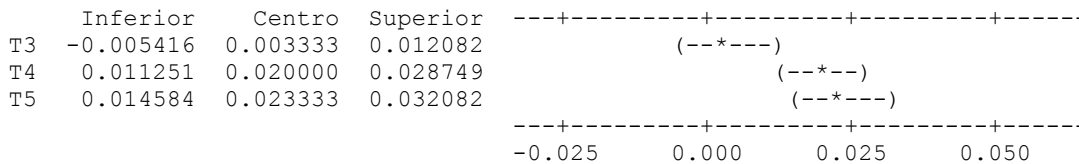
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.29%

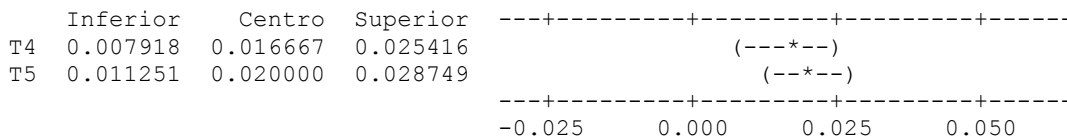
Se restó T1 a:



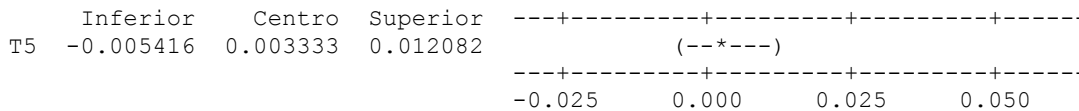
Se restó T2 a:



Se restó T3 a:



Se restó T4 a:



En el método de Tukey si la diferencia entre dos promedios es mayor que el comparador de Tukey, se concluye que los dos promedios no son iguales, en caso contrario se concluye que sí son iguales. Se utiliza el mismo comparador para todos los pares de promedios que se comparan. Los resultados se indican con letras, por lo tanto las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Al aplicar el método de Tukey se determinó que la media del porcentaje de lactosa para la tina 1 es significativamente diferente en comparación a las cuatro tinas de desuerado restante. En el caso de las medias correspondientes al porcentaje de lactosa de la tina 2 y 3 no presentan diferencia significativa, no obstante en comparación a las tres tinas restantes (1, 4 y 5) si presentan diferencia. Con respecto a las medias del porcentaje de lactosa de las tinas 4 y 5 son similares, pero significativamente diferente en relación a las otras tres tinas de desuerado (1, 2 y 3).

En conclusión a Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95 % y Nivel de confianza individual del 99.29 %, existe diferencia significativa entre las medias del porcentaje de lactosa entre las tinas indicando que las muestras no provienen de la misma población. Sin embargo la desviación estándar y por consiguiente la varianza es igual para los datos correspondientes al porcentaje de lactosa en cada una de las tinas de desuerado, por lo tanto las medias son homogéneas.

5.2. Estimación del volumen de ácido clorhídrico para la hidrólisis ácida

En la tabla 5.7 se presentan los datos de conversión en las unidades de la lactosa ($\% \rightarrow \frac{Kg}{L}$), adecuando los valores para el cálculo de ácido clorhídrico. La relación de conversión es la siguiente:

Se calculó la masa de lactosa promedia a partir del porcentaje de lactosa promedia calculada para cada tina de desuerado; el volumen utilizado corresponde al tamaño de la muestra analítica analizada en el Lactoscan:

$$\% \frac{m}{V} = \frac{m_{lactosa}(g)}{V_{Lactosuero}(mL)} \times 100 \% \quad (Ec. 12)$$

$$\Rightarrow m_{lactosa}(mL) = \frac{\left(\% \frac{m}{V}\right) * [V_{Lactosuero}(mL)]}{100 \%} \quad (Ec. 13)$$

La masa calculada con la ecuación anterior se expresa en unidades de volumen (mL), por lo tanto se multiplica por la densidad promedia del lacto suero para convertir la unidad a gramos:

$$m_{lactosa}(g) = \bar{\rho}_{Lactosuero} * m_{Lactosa} \quad (Ec. 14)$$

Se convierten las unidades de gramos a kilogramos, utilizando la siguiente relación:

$$\frac{m_{Lactosa}(g)}{25 mL} \times \frac{1000 mL}{1 L} \times \frac{1 Kg}{1000 g} = \frac{Kg \text{ de Lactosa}}{L \text{ de Lacto Suero}} \quad (FC. 1)$$

Tabla 5.7. Conversión de unidades para la lactosa presente en el lacto suero

Muestra	% Lactosa	$\bar{\rho}$	$m_{Lactosa}(g)$	$\frac{Kg}{L}$
M_1	3,2800	1,0258	0,8411	0,0336
M_2	3,3133	1,0259	0,8497	0,0339
M_3	3,3200	1,0260	0,8515	0,0340
M_4	3,3367	1,0261	0,8558	0,0342
M_5	3,3400	1,0261	0,8567	0,0342

Nota: El valor del porcentaje de lactosa en cada una de las muestras es el valor promedio de los datos presentados en la tabla 5.6.

Convertidas las unidades de medida del contenido de lactosa en el lacto suero se procedió a calcular el volumen de ácido clorhídrico con la relación descrita en el apartado 4.5.3.4. Los resultados se presentan en la tabla 5.8. La relación queda de la siguiente forma:

$$3,0289 \text{ g de HCl} \approx 1 \text{ Kg de lactosa} \Rightarrow x \text{ g de HCl} = \frac{(3,0289 \text{ g de HCl})(x \text{ Kg de lactosa})}{1 \text{ Kg de lactosa}} \quad (FC. 2)$$

El volumen de ácido clorhídrico se calculó utilizando su densidad (1,16 g/mL; al 32 %). La ecuación es la siguiente:

$$\rho = \frac{m}{V} \therefore \text{despejando en relación al volumen} \Rightarrow V_{HCl} = \frac{m_{HCl}}{\rho_{HCl}} \quad (Ec. 14)$$

Por último se convirtieron las unidades de medida, pasando de mL \rightarrow μ L:

$$1 \text{ mL} \equiv 1000 \mu\text{L} \Rightarrow x \mu\text{L} = \frac{(x \text{ mL})(1000 \mu\text{L})}{1 \text{ mL}} \quad (FC. 3)$$

Tabla 5.8. Cálculo del volumen de HCl que debe ser utilizado en la hidrólisis de la lactosa

Muestra	Masa del ácido clorhídrico (g)	Volumen (mL)	Volumen (μ L)
M ₁	0,1017710	0,0877336	87,7336
M ₂	0,1026797	0,0885169	88,5169
M ₃	0,1029826	0,0887781	88,7781
M ₄	0,1035883	0,0893002	89,3002
M ₅	0,1035883	0,0893002	89,3002

Al haber realizado la hidrólisis ácida en dos partes como se explica en el punto 4.5.3.4, los volúmenes de ácido clorhídrico se redondearon a su número entero próximo y se adicionaron en partes iguales a cada muestra. Por lo tanto en la primera y segunda parte de la hidrólisis se adicionaron los siguientes volúmenes de ácido clorhídrico respectivamente: M₁ = 44 μ L , M₂ = 44 μ L , M₃ = 44 μ L , M₄ = 45 μ L y M₅ = 45 μ L .

5.2.1. Análisis de los resultados en la hidrólisis ácida

Al haber transcurridos 20 minutos de hidrólisis las muestras presentaron un ligero cambio de coloración (amarillo verdoso a un amarillo tenue) y la formación de dos fases, una de las cuales era color blanca en el fondo del Beaker. Este fenómeno se debe a la descomposición de la lactosa en sus monosacáridos (glucosa y galactosa) ante la acción del ácido clorhídrico. Al terminar la hidrólisis y al disminuir la temperatura de las muestras hasta condiciones ambientales se observó un precipitado color blanco de 0,1 cm de espesor (medido con una regla desde el exterior, es decir por la parte lateral del Beaker).

En conclusión teóricamente como indica (Ríos, 2006) el rendimiento en la conversión de lactosa es del 88,59 %, esto nos indica que con respecto al contenido de lactosa de cada uno de los valores de las medias expuestas en la tabla 5.6 los resultados de la hidrólisis ácida son los siguientes:

$$\% \text{ Lactosa hidrolizado} = \frac{\% \text{ Lactosa inicial} * 88,59\%}{100\%} \quad (\text{FC. 4})$$

$$\% \text{ Lactosa final} = \% \text{ Lactosa inicial} - \% \text{ Lactosa hidrolizado} \quad (\text{Fa. 1})$$

Tabla 5.9. Porcentaje de lactosa hidrolizado

Muestra	% Lactosa inicial	% Lactosa hidrolizado	% Lactosa final
M₁	3,2800	2,9057	0,3743
M₂	3,3133	2,9353	0,3780
M₃	3,3200	2,9411	0,3789
M₄	3,3367	2,9560	0,3807
M₅	3,3400	2,9589	0,3811

Por lo tanto existe un 11,41 % de lactosa que no fue hidrolizada en cada una de las muestra, generando pérdidas de sustrato, por lo que disminuye el contenido de monosacáridos ante la acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Entonces con respecto al dato presentado en la tabla 5.9 de forma general se puede decir que hay 1,45 % aproximadamente de cada monosacáridos (glucosa y galactosa) en las muestras como resultado de la hidrólisis ácida.

5.3. Medición de pH en el lacto suero hidrolizado

Hidrolizado el lacto suero se tomaron alícuotas de las muestras como se indica en el punto 4.5.3.4 y se midió el pH de las muestras. Los resultados de la medición del pH se presentan en la tabla 5.10.

Tabla 5.10. Valores de pH realizada la hidrólisis del lacto suero

Muestra	R₁	R₂	R₃
M₁	5,90	5,91	5,90
M₂	6,11	6,12	6,12
M₃	6,02	6,02	6,03
M₄	5,95	5,94	5,95
M₅	5,95	5,96	5,96

5.3.1. Análisis de resultados en las mediciones del pH

Con los datos obtenidos en la medición del pH de la tabla 5.10 se calculó la media y la desviación estándar con las ecuación 1 y 2 respectivamente, los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5.11. Cálculo de la media y desviación estándar de las mediciones de pH

Muestra	\bar{X}	S
<i>M</i>₁	5,903	0,006
<i>M</i>₂	6,117	0,006
<i>M</i>₃	6,023	0,006
<i>M</i>₄	5,947	0,006
<i>M</i>₅	5,957	0,006

El valor de las medias y desviaciones estándar calculadas para cada una de las muestras indica que los datos para cada muestra de forma independiente no presentan dispersión considerables (confirma el valor de la desviación estándar), incluyendo el rango entre cada una de las réplicas el cual tiene un valor de 0,01. Además se cumple el intervalo establecido en la operacionalización de las variables, puesto que todos los resultados se encuentran dentro del intervalo mencionado.

5.4. Determinación de la cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Para determinar la cantidad de levadura que debe ser pesada para la inoculación se tomó como base la cantidad de lactosa presente en el lacto suero y los monosacáridos libres, considerando la suma de ambos como carbohidratos totales.

Para realizar el cálculo se utilizó la relación presentada en el apartado 4.5.3.5.1, quedando de la siguiente forma:

$$Masa\ de\ Levadura = \frac{(masa\ total\ de\ Carbohidratos)(12\%)}{100\%} \quad (FC. 5)$$

Por lo tanto la masa de lactosa (g/L) en cada muestra se suma a la cantidad de monosacáridos teóricos presentes en el lacto suero (Agriculture, 2011), los resultados se presentan en la tabla 5.12.

Tabla 5.12. Masa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para preparar el medio de cultivo

Muestra	Masa de lactosa por litro ($\frac{g}{L}$)	Masa de monosacáridos ($\frac{g}{L}$)	Masa total de carbohidratos ($\frac{g}{L}$)	Masa de levadura (g)
M ₁	33,60	17,8	51,4	6,168
M ₂	33,98	17,42	51,4	6,168
M ₃	34,00	17,4	51,4	6,168
M ₄	34,20	17,2	51,4	6,168
M ₅	34,20	17,2	51,4	6,168

5.4.1. Análisis de la determinación de masa en levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Al determinar la masa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se consideró la referencia de la USDA, pues es recomendable pesar mayor cantidad de levadura por las pérdidas que se dan al preparar el inóculo (oxigenación y propagación) y al trasvasar al fermentador (inoculación). Se considera que solamente el 1,45 % de lactosa no es hidrolizada según el rendimiento en la conversión de lactosa del 88,59 % de Ríos, 2006.

Además es necesario considerar que no debe ser la levadura el reactivo limitante con relación al sustrato, por lo que es apropiado un exceso en microorganismo. También al momento de generarse el alcohol en dependencia del porcentaje al cual se obtenga, dentro del fermentador los microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) mueren puesto que el mismo medio se vuelve nocivo para los mismos.

5.5. Volumen y concentración de etanol obtenido

Los volúmenes de etanol obtenidos en la segunda destilación (purificación) se encuentran en la tabla 5.13. Para medir los volúmenes se utilizó una probeta de 100 mL, se almacenó en un Erlenmeyer de 250 mL (uno por cada muestra) y refrigerados como medio de preservación.

Tabla 5.13. Volumen de etanol obtenido a partir del lacto suero

Muestra	Volumen (mL)
M ₁	52
M ₂	40
M ₃	50
M ₄	51
M ₅	51

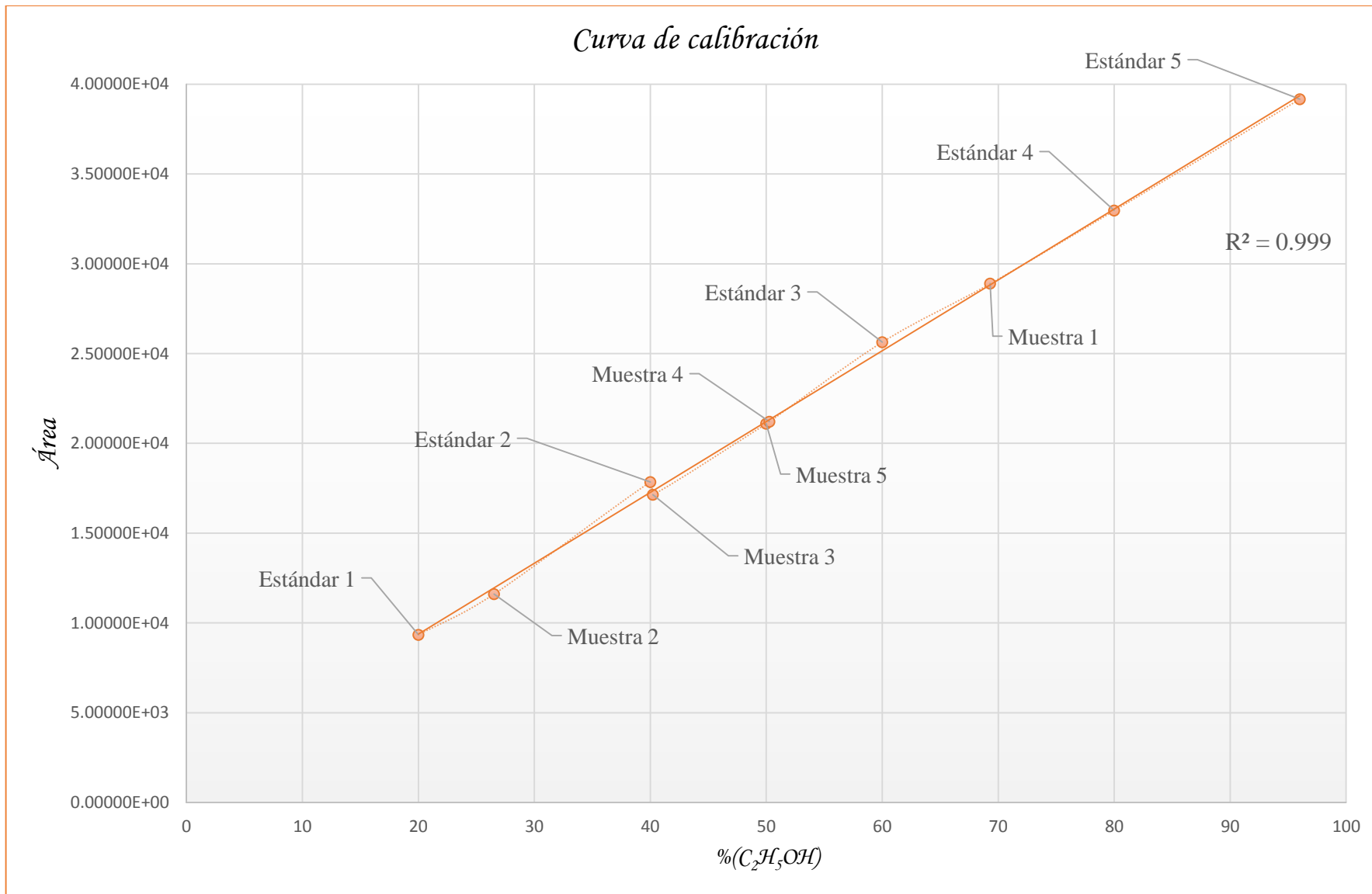
La concentración de etanol obtenida en las muestras se determinó por Cromatografía de Gas como se indica en el apartado 4.5.3.7. El reporte de la curva de calibración, los cromatogramas y tablas de resultados proporcionados por el Laboratorio de Cromatografía perteneciente al Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI) se presenta en el anexo 14. De forma conjunta en la tabla 5.14 y gráfica 5.1 se presenta los datos obtenidos en el análisis (analitos y estándares).

Tabla 5.14. Resultados de cuantificación de etanol

Nombre	Porcentaje	Área
Estándar 1 (20 %)	20,00000	9343,78125
M ₂	26,51638	1,16097x10 ⁴
Estándar 2 (40 %)	40,00000	1,78468 x10 ⁴
M ₃	40,21560	1,71438 x10 ⁴
M ₅	49,99353	2,10939 x10 ⁴
M ₄	50,26672	2,12042 x10 ⁴
Estándar 3 (60 %)	60,00000	2,56402 x10 ⁴
M ₁	69,30315	2,88945 x10 ⁴
Estándar 4 (80 %)	80,00000	3,29616 x10 ⁴
Estándar 5 (96 %)	96,00000	3,91706 x10 ⁴

El coeficiente de relación para la distribución de los resultados es de 0.999, esto indica que los datos tienen correlación lineal, también que presenta precisión y confiabilidad.

Gráfica 5.1. Concentración en porcentaje volumen-volumen de etanol



Fuente: Elaborada por los autores.

5.5.1. Rendimiento de los volúmenes obtenidos de etanol.

Para determinar si generará un beneficio económico la producción de etanol a partir de lacto suero se calcula el porcentaje de rendimiento en la fermentación para cada una de las muestras:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{volumen del etanol}}{\text{volumen del lacto suero}} \times 100 \quad (\text{Ec. 15})$$

El volumen de etanol corresponde al obtenido después de la segunda destilación o purificación y el volumen del lacto suero al utilizado para la fermentación. Los cálculos del porcentaje de rendimiento para cada una de las muestras se presentan en la tabla 5.15.

Tabla 5.15. Cálculo del porcentaje de rendimiento para la obtención de etanol

Muestra	Volumen de etanol mL	Volumen del lacto suero mL	% Rendimiento
M ₁	52	925	5,6216
M ₂	40	925	4,3243
M ₃	50	925	5,4054
M ₄	51	925	5,5135
M ₅	51	925	5,5135

Desde el punto de vista industrial el rendimiento en un proceso de producción, específicamente en los productos obtenidos tiene gran impacto en la rentabilidad empresarial. Por lo tanto si el rendimiento de un proceso es bajo, a la empresa no le conviene generar ese determinado producto, puesto que no se remunerara el capital invertido al no obtener la cantidad de sustancia necesaria para distribuir y generar ingresos.

El porcentaje de rendimiento en los volúmenes de etanol obtenido de la fermentación son pobres (menor al 40 %). En referencia al volumen de lacto suero fermentado (925 mL) y la cantidad de etanol producido no cumple con el rendimiento esperado.

5.5.2. Análisis de resultados en la concentración de etanol obtenido

Todo el proceso de producción de etanol a partir de lacto suero se realizó bajo las mismas condiciones, al analizar los resultados del porcentaje de etanol obtenido y cada una de las variables del proceso se encontró la relación y dependencia no solamente del sustrato y de la cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae* inoculada, sino también del pH.

En lo que respecta a la cantidad de sustrato todas las muestras fueron controladas y se ha demostrado con los resultados presentados en sus respectivos apartados. La cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae* no varía pues se inoculó la misma cantidad en cada muestra. Pero la otra variante es el pH, el cual es primordial ante la proliferación de los microorganismos empleados en este proceso.

Tabla 5.16. Comparación entre la concentración de etanol y el pH de las muestras

Muestra	pH	Concentración de etanol
M₁	5,903	69,30315
M₂	6,117	26,51638
M₃	6,023	40,21560
M₄	5,947	50,26672
M₅	5,957	49,99353

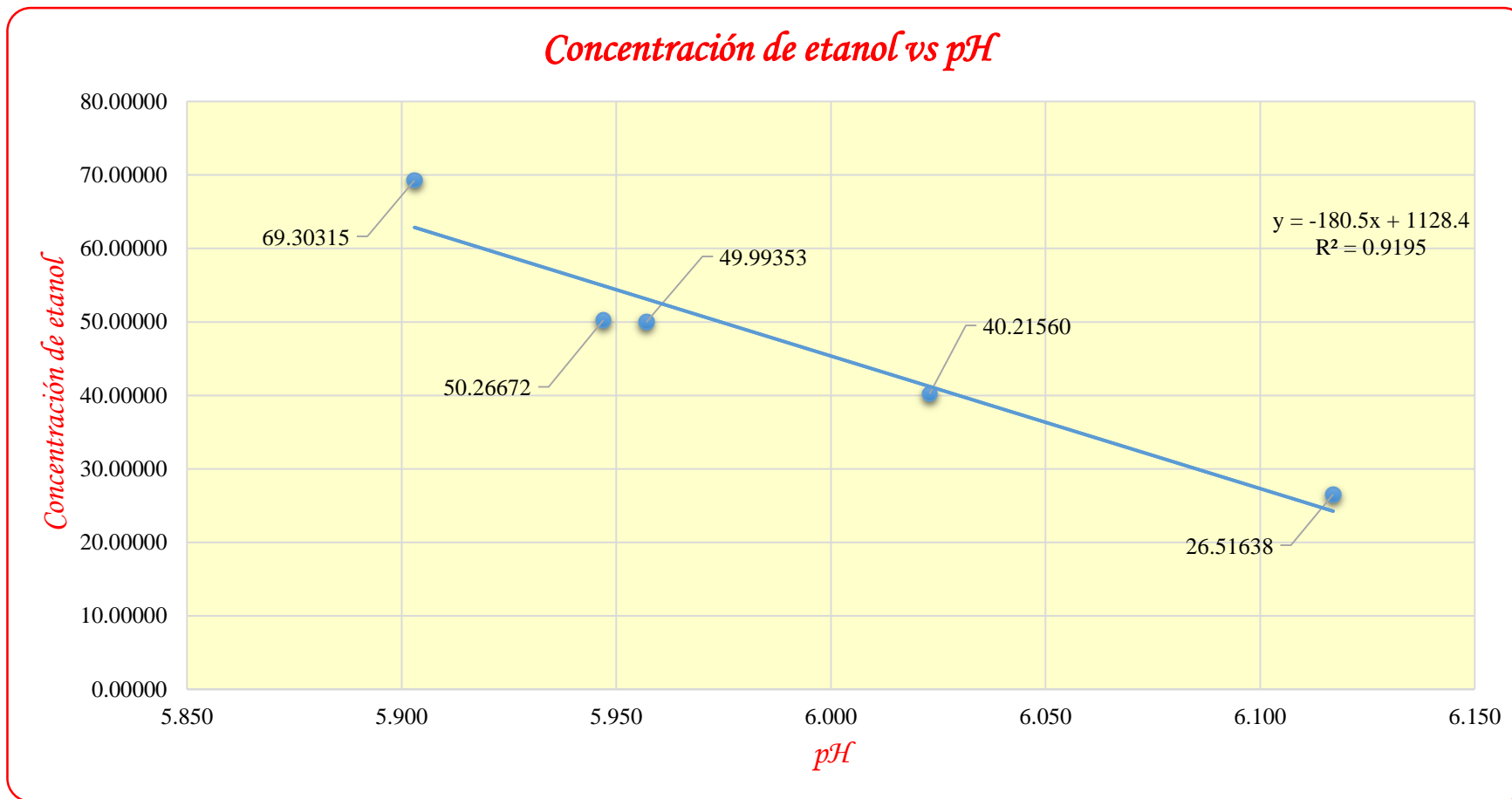
En la tabla 5.16 se encuentran los datos de pH y concentración de etanol obtenido para cada muestra. En la gráfica 5.2 se observa claramente la dependencia de la concentración de etanol ante el pH.

En la muestra 1 el pH es más ácido en relación a las otras cuatro muestras, del cual se obtuvo el mayor porcentaje de etanol, seguido de la muestra 4 la cual presenta un pH no muy diferente al de la muestra 1.

En la muestra 5 se obtuvo etanol con una concentración por debajo solamente de 0,27 por ciento y la diferencia de pH es de 0,010.

Por último se encuentran la muestra 3 en la cual la concentración disminuye 9,7797 por ciento al aumentar el pH en 0,076 y en la muestra 2 la concentración disminuye 13,699 por ciento al aumentar el pH 0.094.

Grafica 5.2. Dispersión de la concentración de etanol en relación al pH de la muestra



Fuente: Elaborada por los autores.

Esto indica que a medida que disminuye el grado ácido en las muestras aumenta el porcentaje de etanol de forma gradual. Por lo tanto se puede interpretar que a un pH de 5.8 valor referido al mínimo grado de acidez indicado en la operacionalización de las variables, puede obtenerse etanol a una mayor concentración.



CAPITULO VI

CONCLUSIONES



Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Teniendo en cuenta que la obtención de etanol a partir de lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* realizada en el presente estudio ha alcanzado los objetivos planteados y en base a los resultados obtenidos se formulan las siguientes conclusiones:

El porcentaje de lactosa en conjunto a los monosacáridos libres (glucosa, galactosa) y el pH son las propiedades químicas que permiten el uso de lacto suero como materia prima para producir etanol.

Al lacto suero por ser uno de los mayores contaminantes generados por la industria láctea debe dársele utilidad con el fin de evitar la contaminación ambiental y dar un aprovechamiento a su contenido proteínico.

El proceso considerado para utilizar el lacto suero en sinergia con *Saccharomyces cerevisiae* como materia prima para la producción de etanol a escala piloto no cumple con el rendimiento esperado, en relación al volumen obtenido.



CAPITULO VII

RECOMENDACIONES



Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Cuando se realiza una investigación se desea que haya una mejora continua de la misma, por lo tanto recomendamos lo siguiente:

Evaluar el control de las condiciones operacionales en cada uno de los puntos críticos del proceso con el fin de mejorar el proceso de obtención de etanol a partir de lacto suero a escala piloto.

Proponer diferentes aplicaciones que se pueden dar al lacto suero como materia prima o complemento en procesos ya existente con el fin de tratar este residuo y presentar ofertas de utilidad proporcionando ingresos económicos a las cooperativas o bien a cualquier empresa que disponga a dar utilidad al lacto suero; erradicando la contaminación ambiental que genera al ser desechado en los suelos o ríos cercanos a las plantas procesadoras.



BIBLIOGRAFÍA



Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Académica, D. N. (10 de Octubre de 2014). *Biología virtual*. Obtenido de http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap01/01_01_04.htm

Agilent. (8 de Mayo de 2015). *Analisis de Alcoholes Methods*. Obtenido de Aplicaciones para productos industriales : www.agilent.com/chem/store

Agriculture, U. S. (7 de Diciembre de 2011). *USDA National Nutrient Database for Standard Reference*. Obtenido de USDA National Nutrient Database for Standard Reference: <http://ndb.nal.usda.gov/>

Agrobit. (18 de Mayo de 2015). *Composición de leche y su valor nutritivo*. Obtenido de http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/prod_lechera/GA000002pr.htm

Alais, C. (1986). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. España: Reverte.

Alfa-Laval. (1990). *Manual de industrias lacteas*. Madrid: Iraga.

Álvarez, E. (27 de Enero de 2015). *Introducción a las Ciencias de la Salud*. Obtenido de <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/concep.htm>

Audesirk, T., & Audesirk, G. (2003). *Biología: La vida en la tierra*. Pearson Educación.

Belmonte, M. I. (2013). *Laboratorios analíticos*. Obtenido de Cromatografía de gases: <http://laboratorioteccnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-gases>

Braverman, J. (1967). *Introducción a la Bioquímica de los Alimentos*. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.

Cáceres, J. (2002). *Modelamiento microbiológico para la levadura Saccharomyces cerevisiae*. Bogota. pag. 14-18.: Universidad de la Sabana.

Carrión, S. (2010). *Produccion de etanol a partir de suero de leche*. Bogota: Universidad Jorge Tadeo Lozano.

COMPAL, U. (2008). *Estudio sobre la Cadena de Comercialización de Productos*. Managua: Proyectos de Nicaragua.

Corona, F. J. (1996). *Elementos de estadística: aplicaicones al metodo experimental*. Mexico: Trillas, S.A. de C.V.

Díaz de la Vega, L. (2007). *Tecnología de la leche*. Pueblo y educación.

Díaz, M. (2005). *Agroindustria, productos lacteos*. Camoapa.

Dickinson, A. &. (2007). *Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: An alternative to gum arabic*. Food Hydrocolloids.

Dilanjas, S. (1976). *Fundamentos de elaboracion de quesos*. Viena: Zaragoza. pag. 175-210.

Dimitrov, I. d. (2014). *ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DEL SUERO DE LECHE QUE INCORPORA LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS Y*

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS. Bayamo. Granma: Revista Cubana de Alimentación y Nutrición.

Discovery Home & Health. (12 de Enero de 2014). Obtenido de <http://www.dsalud.com/index.php?pagina=articulo&c=966>

eBIO. (16 de Octubre de 2014). *European Bioethanol Fuel Association.* Obtenido de <http://www.datuopinion.com/fermentacion-alcoholica>

Elorza, G. d. (2008). *Gran Enciclopedia Estudiantil.* Colombia: Zamora Editores LTDA.

Farral, A. (1963). *Ingeniería para la industria lechera.* Madrid: Herrero.

Foster, N., & Speck, O. (1965). *Microbiología de la leche.* Barcelona: Herrero.

Grajales, R. B. (Septiembre de 2001). Guías de Laboratorio de Operaciones Unitarias III. *Difusividad-Fabricación de Alcohol.* Manizales, Colombia: Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales.

Guzman, E. (2007). *Productos lácteos Masiguito, Queso pasteurizado.* Camoapa: Unica edición.

Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (1991). *Metodología de la investigación.* México: MCGRAW - HILL INTERAMERICANA DE MÉXICO, S.A. de C.V.

Hernandez, M. (1999). Tratado de nutrición. Madrid: Díaz Santos.

Huertas. (2009). *Lactosuero: importancia en la industria de alimentos.* Bogota: Universidad Pedagógica y Tecnología de Colombia. pag. 1-5.

Huertas, R. (2008). *Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos.*

Inda, A. (2001). *Manejo y usos del lactosuero de quesería.* Zamorano.

Jelen, P. (2003). *Whey processing. Utilization and Products.* London: Encyclopedia of Dairy Sciences. .

Laín, E. R. (9 de Febrero de 2000). *Real Academia de Ciencias Veterinarias de España.* Obtenido de Conferencia pronunciada por el Académico de Número: <http://racve.es/publicaciones/el-suero-lacteo-de-queseria-el-ayer-y-el-presente/>

Lehninger. (2004). *Principles of Biochemistry, Fourth Edition.* W. H. Freeman.

Limpías, T. (12 de Mayo de 2014). *ETAPAS Y EQUIPOS DEL PROCESO.* Obtenido de http://www.tecnologiaslimpias.org/html/central/313101/313101_ee.htm

Liu, X., Chung, K., & Yuosef, S. Y. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilised *Lactococcus lactis*. *Journal process Biochemistry.*

Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en Nutrición Humana- Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia* 16: , 11-20.

Madrid, V. A. (1999). *Tecnología Quesera*. AMW Ediciones Mundi-Peña.

McIntosh, H., Royle, J., Leu, L., Regester, O., Johnson, A., Grinsted, L., & Smithers., S. K. (1998). *Whey proteins as functional food ingredients*. *Journal Dairy International* 8.

Merchuk, J. (2003). *Microbiología Industrial*. Beer Sheva, Israel: Ben Gurion University.

Mirkin, D. (2007). Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. *Benzene and related aromatic hydrocarbons* (pág. 94). Philadelphia: Saunders Elsevier.

Mundolácteo. (2005). Obtenido de www.mundolacteoycarnico.com

Muñi, A. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica*: 15 (4) .

Nutrisol. (Mayo de 2009). *Informacion actual suero lacteo*. Obtenido de http://www.nutrisol.com.ar/info_suero_lacteo.htm

Ortiz, L. P. (16 de Octubre de 2014). *Biotecnología, Testigos de las Tecnologías de la Biología Molecular y Celular*. Obtenido de <http://blogs.creamoselfuturo.com/biotecnologia/2011/03/14/la-fermentacion-alcoholica-como-se-produce-y-aplicaciones/>.

Panesar, P., & Bunko, D. K. (2007). *Bioutilisation of whey for lactic acid production*. *Food Chemistry*.

Parzanese, M. (2010). *Tecnologías para la industria alimentaria*. Obtenido de Procesamiento de Lacto suero. Ficha No 13. pag. 1-3 de 9: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnología/Ficha_13_Lactosuero.pdf.

Pinilla, V. D. (2009). *Análisis estadístico de datos muestrales*. Mexico: Facultad de ingeniería, UNAM.

Piura López, J. (2006). *Metodología de la investigación científica. Un enfoque integrador*. Publicidad Arellano Vásquez S. A.

Pozo, D. (25 de Enero de 2013). *Área de sostenibilidad de la cadena alimentaria de Azti-Tecnalia*. Obtenido de Inter empresas: <http://www.interempresas.net/Alimentaria/Articulos/104908-Un-proyecto-para-la-valorizacion-integral-del-lactosuero-generado-por-las-queserías.html>

Riegel, E. R., & Kent, J. A. (2003). *Riegel's Handbook of Industrial Chemistry*. Ecuador: Springer Verlag.

Rios, C. A. (2006). *PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO CON Aspergillus niger NRRL 2270 A PARTIR DE SUERO DE LECHE*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.

Uso de lacto suero en sinergia con Saccharomyces cerevisiae como materia prima para la producción de etanol a escala piloto, en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Química, UNAN-Managua, Julio 2014-Agosto 2015.

Rodríguez, J. W. (31 de Agosto de 2012). *XI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS*. Obtenido de LACTOSUERO Y SU PROBLEMÁTICA EN EL MEDIO AMBIENTE: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:H8oHgfkNf3oJ:www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_MicroAlim/Javier_Castro/10.pdf+&cd=10&hl=es-419&ct=clnk&gl=ni

Rodriguez, U. J. (2012). *Cromatografía de Gases FID*.

Salgado, C. (2008). *Contaminacion del suero lacteo en el suelo*. Camoapa.

Taro, Y. (1999). *Estadística*. Mexico: Harla.

Ward, O. (1991). *Bioteconología de la fermentacion*. Acribia. Cap. 8.: Zaragoza.

Yikrazuul. (10 de Octubre de 2014). Obtenido de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hydrolysis_of_lactose.svg