



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

"REOCINÉTICA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO
A PARTIR DE LEVADURA *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*
EN SUERO DE LECHE."

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

I.BQ. DANIEL MONTALVO SALINAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DENIS CANTÚ LOZANO

CODIRECTOR DE TESIS:

DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

OCTUBRE 2015

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

**“REOCINÉTICA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
LÁCTICO A PARTIR DE SUERO DE LECHE CON LA LEVADURA
KLUYVEROMYCES MARXIANUS”**

TESIS

PRESENTA:

I.BQ. DANIEL MONTALVO SALINAS

ASESOR:

DR. DENIS CANTÚ LOZANO

COASESOR:

DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO. SEPTIEMBRE DE 2015



AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que han hecho posible la realización de este trabajo. Quiero agradecer sinceramente a todos ellos.

*En primer lugar, quiero agradecer al **Dr. Denis Cantú Lozano** por haberme brindado su confianza y amistad, por compartir sus conocimientos, experiencias y por sus consejos que contribuyeron a mi formación. Por enseñarme que en la vida sólo existen dos tipos de personas: las que dan pretextos y las que dan resultados.*

*A mis compañeros de estudio y amigos, por su colaboración en el desarrollo de este trabajo, por su compañía durante todo este camino y por brindarme la oportunidad de formar una pequeña familia, especialmente a: **Lázaro Elioenai, Alma Lucero, Nicolás Alejandro, Karla Ávila, Kevin Ángel y José Roberto** quienes me han soportado, motivado y por estar siempre dispuesto a prestarme su ayuda.*

*A mis compañeros y amigos de laboratorio, los que están y los que ya no están, le doy las gracias por haberme apoyado y hecho pasar muchos ratos agradables: **Miguel Ángel Viera Coello, Sheila Rubí Ginés Palestino, Citlali Gutiérrez Bacilo.***

*De forma especial quiero agradecerle a: **Lázaro Elionai Hernández Ariza**, con el que he compartido la mayor parte de este camino, su inestimable apoyo tanto en lo referente al trabajo como en el plano personal, **Aracely Cortes Pérez y Paola Reyes Viveros** quienes me apoyaron en los momentos difíciles de mi trabajo, gracias chicas por su apoyo y su ayuda incondicional.*

*A **CONACyT** por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo de investigación y culminación de estudios de maestría.*

*A mi jurado por tomar un espacio de su tiempo para revisar este trabajo **Dra. Guadalupe Luna Solano, MC. Adrián Reyes Benítez y MC. María Elena.***

*A mis amigos con quienes compartí los buenos y los malos momentos. Gracias por estar ahí: **Juventino, Cesar, Eduardo** y a todos aquellos amigos que no recordé al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son.*

*Al ingeniero **Roger** y al ingeniero **Erick** por extender sus manos y apoyarme en el desarrollo del trabajo.*

DEDICATORIAS

Con mucho cariño, respeto y orgullo a mis padres que me enseñaron que la vida está llena de retos y que para cumplirlos se necesita de mucha voluntad y paciencia:

Edith Salinas

A ti, que día a día has luchado y preocupado por mí. Gracias mamá, por tu apoyo incondicional y confianza que has depositado en mí en todo momento. Siempre motivándome a salir adelante ante todo. Te amo.

Miguel Moreno

A ti, por enseñarme a ser un hombre de trabajo y responsable, gracias por tu apoyo, por tus consejos, por los ejemplos de perseverancia y constancia que te caracterizan y que me has infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante.

Con cariño y amor para ustedes mis viejitos.

RESUMEN

REOCINÉTICA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DEL SUERO DE LECHE CON LA LEVADURA *Kluyveromyces marxianus*

Elaborado por I.BQ. Daniel Montalvo Salinas

Dirigida por: Dr. Denis Cantú Lozano

Dra. Guadalupe Luna Solano

Este trabajo presenta el comportamiento fenomenológico del suero de leche en función de su composición química para su aprovechamiento en procesos de fermentación. La caracterización química demostró que el suero de leche es un medio adecuado para el crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus* ya que la lactosa es su principal compuesto. En la fermentación láctica se empleó suero de leche como sustrato y la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo de interés biotecnológico. Se evaluaron los efectos de concentración inicial de sustrato, inóculo y oxígeno sobre las fermentaciones mediante la implementación de un diseño factorial 2^3 . Los resultados obtenidos permitieron concluir que los factores que más influyen en la producción de ácido láctico es la concentración inicial de sustrato y del inóculo.

La reocinética de la producción de ácido láctico a partir de la levadura *Kluyveromyces marxianus* presentó un comportamiento no newtoniano con características dilatantes, donde la viscosidad de los caldos de fermentación no varió debido a que el crecimiento de la levadura no fue significativo para modificar esta propiedad del fluido.

ABSTRACT
KINETIC RHEOLOGICAL OF PROCESS LACTIC ACID PRODUCTION IN WHEY
WITH THE YEAST *Kluyveromyces marxianus*

By: I.BQ. Daniel Montalvo Salinas
Advisor(s): Dr. Denis Cantú Lozano
Dra. Guadalupe Luna Solano

This work presented the behavior phenomenological of whey in function of chemical composition to utilization in process of fermentation. The chemical characterization showed that whey is a medium suitable for the growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* as lactose is the main compound. Lactic fermentation in whey as substrate and yeast *Kluyveromyces marxianus* as microorganism of biotechnological interest was used. The effects of initial substrate concentration, inoculum and oxygen on fermentation were evaluated by implementing a factorial design 2^3 . The results led to the conclusion that the factors that influence the production of lactic acid is the initial concentration of substrate and inoculum.

The kinetic rheological of producing lactic acid from the yeast *Kluyveromyces marxianus* showed a non-Newtonian behavior dilatant characteristics, wherein the viscosity of the fermentation broths not varied because the yeast growth was not significant to modify this property fluids.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPITULO I FUNDAMETOS TEÓRICOS	4
1.1 Suero de leche	4
1.2 Lactosa	8
1.3 Levaduras	9
1.3.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	10
1.4 Ácido láctico	12
1.5 Fermentación	15
1.6 Fermentadores	16
1.6.1 Fermentadores escala laboratorio	16
1.7 Crecimiento microbiano	17
1.7.1 Estequiometria del crecimiento microbiano	17
1.7.2 Cinética de crecimiento	17
1.7.3 Consumo de sustrato	18
1.8 Curva de crecimiento	19
1.9 Ecuación de Monod	20
1.10 Reología: Fundamentos teóricos	21
1.11 Caldos de fermentación como fluidos complejos	22
1.12 Comportamiento reológico en caldos de fermentación	22
1.13 Constantes reológicas fundamentales de los caldos de fermentación	25
1.14 Reología de suspensiones de levaduras	26
1.15 Número de <i>Péclet</i>	28
1.16 Reynolds de partículas esféricas	29
1.17 Modelos reológicos	30
1.18 Modelos reológicos en función de la temperatura y concentración	31
1.19 Antecedentes	33

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 Obtención de la muestra	35
2.2 Caracterización química del suero de leche	35
2.3 Caracterización reológica del suero de leche	36
2.4 Modelación de proteínas precipitadas	37
2.5 Modelación matemática	37
2.6 Efecto de la temperatura sobre la viscosidad del suero de leche	37
2.7 Efecto de la concentración sobre la viscosidad del suero de leche	38
2.8 Efecto combinado de la temperatura y velocidad de corte sobre la viscosidad del suero de leche	38
2.9 Efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre la viscosidad del suero de leche	39
2.10 Efecto de la concentración sobre la energía de activación	40
2.11 Medio sintético de conservación de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	40
2.12 Desproteínización del suero de leche	41
2.13 Preparación del inóculo	41
2.14 Conteo de células en la cámara de Neubauer	42
2.15 Cálculo del volumen para el tamaño de inóculo	43
2.16 Viabilidad celular	43
2.18 Determinación de Lactosa	44
2.19 Determinación de ácido láctico	45
2.20 Determinación de biomasa	45
2.21 Diseño de experimentos 2 ^k	45
2.22 Fermentación	46
2.23 Determinación reológica de caldos de fermentación	46
2.24 Calculo de la producción de ácido láctico	46
2.25 Velocidad específica de crecimiento	48
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1 Caracterización química del suero de leche	51
3.2 Caracterización reológica del suero de leche	52
3.3 Modelación Matemática	55

3.4 Efecto de la temperatura sobre la viscosidad	56
3.5 Efecto de la concentración sobre la viscosidad	57
3.6 Efecto combinado de la velocidad de corte y temperatura sobre la viscosidad del suero de leche	59
3.7 Efecto combinado de la temperatura y concentración sobre la viscosidad del suero de leche	60
3.8 Efecto de la concentración sobre la energía de activación	64
3.9 Diseño factorial 2^3 para la evaluación de factores en las fermentaciones lácticas	67
3.10 Análisis de regresión en función de la concentración inicial de lactosa, inóculo y oxígeno	70
3.11 Cinéticas de crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	72
3.12 Cálculo de las constantes de Monod	75
3.13 Modelación reológica de los caldos de fermentación	76
3.14 Análisis de varianza de los modelos experimentales de <i>Herschel-Bulkley</i>	82
CONCLUSIONES	84
RECOMENDACIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Síntesis de la lactosa	8
1.2	Levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	11
1.3	Ácido láctico	12
1.4	Curva de crecimiento de un microorganismo	20
1.5	Efecto de la concentración de sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento de un microorganismo	21
1.6	Reograma de los modelos no Newtonianos	24
2.1	Diagrama para determinar el color de la muestra	36
2.2	Crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	41
2.3	Cámara de Neubauer	43
2.4	Representación gráfica del método numérico de Lineweaver-Burk	50
3.1	Reograma del suero de leche	52
3.2	Curvas de fluidez del suero de leche	53
3.3	Precipitación de las proteínas del suero de leche en función de la temperatura	54
3.4	Reogramas del suero de leche, ajuste del modelo	56
3.5	Dependencia de la viscosidad aparente respecto a la temperatura	56
3.6	Variación de la viscosidad respecto a la concentración	58
3.7	Superficie de respuesta. Efecto combinado de la temperatura y la velocidad de corte	59
3.8	Efectos principales: a) Temperatura, b) concentración	61
3.9	Interacción de los factores	62
3.10	Grafica de normalidad del diseño 3^k	63
3.11	Superficie de respuesta. Efecto combinado de la temperatura y concentración	64
3.12	Efecto de la concentración sobre la energía de activación	65
3.13	Efectos principales del diseño 2^k a) lactosa, b)inóculo, c) oxígeno	69
3.14	Interacción significativa del diseño 2^k	70
3.15	Grafica de normalidad del diseño factorial 2^k	71
3.16	Consumo de lactosa y producción de ácido láctico en los niveles bajo de sustrato	72
3.17	Consumo de lactosa y producción de ácido láctico en los niveles alto de sustrato	73
3.18	Crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> en los diferentes tratamientos	74
3.19	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 1	79
3.20	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 2	79
3.21	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 3	79
3.22	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 4	79
3.23	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 5	80

3.24	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 6	80
3.25	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 7	80
3.26	Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 8	80
3.27	Determinación del coeficiente de consistencia e índice de comportamiento reológico	82

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Composición química del suero dulce y ácido	7
1.2	Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico	13
2.1	Matriz del diseño 3^k	39
2.2	Matriz del diseño de experimento 2^k	46
3.1	Caracterización fisicoquímica del suero de leche	51
3.2	Parámetros de la ecuación tipo <i>Arrhenius</i>	54
3.3	Parámetros del modelo de <i>Herschel-Bulkley</i>	55
3.4	Parámetros del modelo de <i>Arrhenius</i> y la ecuación propuesta por Kosmerl, 2000	57
3.5	Parámetros del modelo tipo potencia y modelo tipo exponencial	58
3.6	Factores y niveles utilizados en el diseño de experimentos 3^k	60
3.7	Análisis de varianza del diseño de experimentos 3^k	61
3.8	Efecto de la concentración sobre la energía de activación	65
3.9	Factores y niveles utilizados en el diseño de experimentos 2^k	67
3.10	Análisis de varianza del diseño factorial 2^k	68
3.11	Parámetros cinéticos de las fermentaciones lácticas realizadas	74
3.12	Ecuaciones lineales con el modelo de Lineweaver-Burk	76
3.13	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> Tratamiento 1	76
3.14	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> Tratamiento 2	77
3.15	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> tratamiento 3	77
3.16	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> Tratamiento 4	77
3.17	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> Tratamiento 5	78

3.18	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> Tratamiento 6	78
3.19	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> tratamiento 7	78
3.20	Parámetros reológicos del modelo <i>Herschel-Bulkley</i> Tratamiento 8	79
3.21	Análisis de varianza del modelo de <i>Herschel-Bulkley</i>	83

NOMENCLATURA

Símbolo	Definición	Unidades
AL	Ácido láctico	$[g/L]$
A_1	Constante de la ecuación 2.9	$[-]$
A_2	Constante de la ecuación 2.10	$[-]$
a_1	Constante de la ecuación 2.5	$[-]$
a_2	Constante de la ecuación 2.6	$[-]$
b	Constante de la ecuación 2.3	$[K^{-1}]$
b_1	Constante de la ecuación 2.9	$[-]$
b_2	Constante de la ecuación 2.10	$[-]$
C	Concentración	$[g/L]$
C_1	Concentración celular	$[cel/mL]$
C_2	Concentración celular a propagar	$[cel/mL]$
c	Constante de la ecuación 2.3	$[K^{-2}]$
d	Constante de la ecuación 3.4	$[-]$
E	Eficiencia de conversión	$[\%]$
Ea	Energía de activación	$[J/gmol]$
K_s	Constante de saturación	$[g/L]$
k	Coefficiente de consistencia	$[Pa s^n]$
N_{CV}	Número de células vivas	$[cel/mL]$
N_T	Número total de células contadas	$[cel/mL]$
n	Índice de comportamiento reológico	$[-]$
\bar{n}	Índice de comportamiento reológico promedio	$[-]$
P	Producto	$[g/L]$
\dot{P}	Productividad	$[gAL/hL]$
p	Proteína precipitada	$[g/L]$
p_0	Constante de la ecuación 2.1	$[g/L]$
R	Constante de los gases	$[J/gmolK]$
S	Sustrato	$[g/L]$
T	Temperatura absoluta	$[K]$
t	Tiempo	$[h]$
t_d	Tiempo de duplicación	$[h]$
X	Concentración celular de <i>K. marxianus</i>	$[g/L]$
X_0	Concentración celular de <i>K. marxianus</i> inicial	$[g/L]$
V_2	Volumen del medio a propagar	$[mL]$
$Y_{\frac{X}{S}}$	Rendimiento de biomasa en sustrato	$[gcel/gS]$
$Y_{\frac{P}{X}}$	Rendimiento de producto en biomasa	$[gP/gX]$
$Y_{\frac{P}{S}}$	Rendimiento de producto en sustrato	$[gP/gS]$
$\%V$	Porcentaje de viabilidad	$[\%]$

LETRAS GRIEGAS

Símbolo	Definición	Unidades
β	Constante de la ecuación 2.8	[—]
η	Viscosidad aparente	[Pa s]
η_0	Viscosidad aparente inicial	[Pa s]
$\dot{\gamma}$	Velocidad de corte	[s ⁻¹]
τ	Esfuerzo de corte	[Pa]
τ_0	Esfuerzo de corte inicial	[Pa]
μ	Velocidad de crecimiento específica	[h ⁻¹]
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidad de crecimiento máxima	[h ⁻¹]

INTRODUCCIÓN

El suero de leche se genera en la producción y obtención del queso, tras la separación de la caseína. Las industrias de este rubro presentan cada vez más problemas para el tratamiento y disposición adecuada de este desecho, esto se debe al gran volumen con el que es generado, ya que por cada kilogramo de queso producido se generan en promedio 9 kilogramos de suero (Padín y Díaz, 2009), además de que no pueden permitirse altos costos de inversión en tecnologías avanzadas de valorización (como la recuperación de proteínas, fósforo, calcio, lactosa, secado por pulverización, etc.), siendo los tratamientos biológicos una buena alternativa de tratamiento (Saddoud *et al.*, 2007).

Los procesos de bioconversión surgen como forma alternativa para el aprovechamiento del suero. Hoy en día el suero de leche es ampliamente utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos capaces de producir compuestos de gran utilidad en la vida del hombre, un ejemplo de compuesto de valor es el ácido láctico. Para su obtención se utiliza microorganismo como la levadura *Kluyveromyces marxianus* que es capaz de consumir los nutrientes presentes en el suero, principalmente la lactosa, disminuyendo así su potencial contaminante (Quintero *et al.*, 2001).

La levadura *Kluyveromyces marxianus* fermenta eficientemente azúcares como la galactosa, sacarosa, rafinosa. Crece a temperaturas entre 20-30°C y pH 4.5-5.0, con ella se pueden obtener: bioetanol (Solis-Méndez, 2013), ácido láctico, glicerol, enzimas y proteína unicelular (SCP).

El ácido láctico tiene un amplio rango de aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica, química, cosmética, entre otras. Los proyectos en la investigación del ácido láctico están enfocados a disminuir los costes de producción a través de nuevos sustratos, nuevas tecnologías de fermentación y nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico (Serna y Rodríguez, 2005; Plata *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental es un grave problema que enfrenta la humanidad, razón por la cual se ha iniciado la búsqueda de alternativas que ofrezcan soluciones viables a este problema. Un contaminante de elevado potencial, es el suero de leche el cual es el subproducto más abundante de la industria láctea y se origina en la elaboración del queso (Quintero *et al.*, 2001).

A pesar de su alto valor nutricional, por años se le ha considerado como un desecho sin valorización alguna, por lo que se le ha vertido en el medio ambiente, provocado la contaminación de mantos freáticos y suelos (Callejas *et al.*, 2012). Este impacto ambiental se debe a las características fisicoquímicas que presenta, donde el alto valor de materia orgánica es causado principalmente por la lactosa (0.18-60 g/L) (Prazeres *et al.*, 2012).

Se estima que la descarga de 2.5 L de suero por día a un cuerpo de agua tiene un poder contaminante equivalente al agua residual producida por un individuo. Esto implica, por ejemplo, que la manufactura de 1 kg de queso ocasiona una contaminación semejante a la generada por aproximadamente cuatro personas (Morán, 2009). A esto hay que sumar el volumen con el que es generado. Según Padín y Díaz, 2009 la producción mundial de suero de leche es de 110 millones de toneladas.

Por todo lo anterior, actualmente se buscan alternativas más convenientes, atractivas económicamente y eficiente para utilizar este residuo líquido de la industria láctea antes de ser desechados o vertido en el medio ambiente de forma irracional sin un tratamiento previo que minimice o elimine por completo la agresividad de tal desecho con el ecosistema. Es por ello que esta idea surge con el triple propósito de: minimizar el contenido orgánico de un subproducto como es el suero de leche, obtener un producto útil con valor agregado como es el ácido láctico y modelar el comportamiento fenomenológico durante la producción de ácido láctico, a nivel laboratorio.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento reológico durante el proceso de obtención de ácido láctico con la levadura *Kluyveromyces marxianus* en suero de leche.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar química y reológicamente el suero de leche.
- Determinar el efecto de la concentración de la lactosa en la producción del ácido láctico.
- Determinar el efecto de la concentración del oxígeno en la producción de ácido láctico.
- Determinar el efecto de la concentración de biomasa en la concentración de ácido láctico.
- Evaluar el comportamiento reológico durante la producción de ácido láctico utilizando *Kluyveromyces marxianus*.

CAPITULO I
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPITULO I FUNDAMETOS TEÓRICOS

1.1 Suero de leche

La industria láctea es uno de los sectores más importantes de la economía de países en desarrollo. Aproximadamente el 90% de la leche utilizada en la industria quesera se convierte en suero de leche (Parra-Huerta, 2009; Araujo *et al.*, 2013), reteniendo cerca del 55% del total de nutrientes de la leche, de los cuales lo más abundantes son la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Panesar *et al.*, 2007). A pesar de su alto contenido nutricional se le sigue considerado como un desecho sin valor alguno. Debido a esto el 45% del suero de leche producido a nivel mundial se desechan en ríos, lagos y otros centros de aguas residuales o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes. El porcentaje restante es tratado y transformado en varios productos alimenticios, de los cuales, cerca del 45% es usado directamente en forma líquida, 30% en forma de suero de leche en polvo, 15% como lactosa y subproductos de su remoción y el resto como concentrados de proteínas de lactosuero (Parras-Huertas, 2009; Panesar *et al.*, 2007).

Actualmente el suero de leche se define como la sustancia líquida que se obtiene de la leche que no precipitó por la acción del cuajo o por ácidos (orgánicos o minerales) durante el proceso de elaboración del queso (Panesar *et al.*, 2007; Prazares *et al.*, 2012; Ramírez-Nava, 2013).

La NOM-243-SSA1-2010 lo define como el líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario; acidificación por intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína.

El proyecto PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012 lo define como la parte líquida de la leche que se obtiene después de la separación de la cuajada durante la elaboración del queso y/o la caseína.

La producción a nivel mundial del suero de leche se estima en más de 10^8 toneladas por año (Mostafa *et al.*, 2009). Según Almecija, 2007 en el año 2005 hubo una producción de 110-115 millones de toneladas métricas, llegando a una producción de 145 millones de toneladas en el año 2011, siendo los principales productores Estados Unidos y la Unión Europea (primordialmente Alemania, Italia y Francia con aproximadamente el 70% de la producción mundial) (Poveda, 2013).

En México, la producción nacional de leche se estima en 11,117, 964 litros por año, de los cuales el estado de Veracruz produce aproximadamente 717,290 litros (SIAP,2013), de acuerdo a Monteros-Lagunés *et al.*, 2009, el 56% de la producción de leche en el estado de Veracruz se destina a la producción de queso, es decir, unos 401,682 litros se utilizan en la producción de queso y a partir de esta industria alrededor de 361,514 litros de suero de leche es eliminado como efluente al medio ambiente.

Esta gran producción de suero de leche representa una fuente importante de contaminación ambiental debido a que su disposición en la mayoría de los caso no es la adecuada (Perini *et al.*, 2013). Como consecuencias de su inadecuada disposición, en los suelos se produce saturación de los mismos y en las aguas, debido a la presencia de alto contenido de nutrientes, se genera un contenido de materia orgánica del 40 al 60 g/L de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y entre 50 y 80 g/L de Demanda Química de Oxígeno (DQO), siendo la lactosa el principal componente de los sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Cury *et al.*, 2014).

Esta práctica irracional de eliminar el suero de leche al medio ambiente sin un tratamiento previo se debe a factores como: desconocimiento sobre las propiedades nutricionales de este subproducto, dificultad para acceder a las tecnologías apropiadas para su manejo y procesamiento (Poveda, 2013) y a su difícil aceptación en el mercado como suero líquido, debido a las característica que presentan, haciéndolo no apto para su comercialización directa (Urribarí *et al.*, 2004).

La composición del suero de leche es muy variable y depende de factores como: calidad de leche utilizada (cabra, vaca, oveja y búfalo), la cual puede variar dependiendo de la alimentación, salud y estado de lactancia del animal, tipo de queso, tratamiento térmico de la cuajada (puede disminuir el porcentaje de proteína del suero resultante), tipo de coagulación (ácida o enzimática). Pero en general, contiene de 6 a 7 g/L de proteínas, divididas aproximadamente en 55-65% de α -lactoglobulina, 15-25% de β -lactoalbúmina, 10-15% de inmunoglobulinas, 5-6% de seroalbúmina, 10-20% de proteasas-peptonas, proteínas menores (<0,5%) y algunos péptidos (Ramírez-Navas, 2013). Alrededor del 93-94% de agua, minerales (0.046-10%), sólidos suspendidos totales (0.1-22 g/L), pH (3.3-9.0), Fósforo (0.006-0.5 g/L), Nitrógeno Total Kjeldahl (0.01-1.7 g/L), carga orgánica (60-102 g/L) (Prazares *et al.*, 2012).

Este gran contenido de nutrientes genera un alto valor de carga orgánica principalmente a la presencia de carbohidratos y proteínas tal como la lactosa (0.18-60 g/L) y caseína. Adicionalmente, el contenido de grasas (0.08-10.6 g/L) también contribuye al nivel de contaminación. La contaminación inorgánica del suero de leche se debe a la presencia de sales minerales que son adicionadas durante la elaboración del queso, principalmente cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) y sales de calcio (principalmente fosfatos)

El tipo del suero de leche depende principalmente de las técnicas del proceso usado para la remoción de la caseína (Panesar *et al.*, 2007). De acuerdo a lo anterior, el suero de leche puede ser clasificado como ácido o dulce. En el primer grupo se encuentran aquellos que provienen de la fabricación de los quesos frescos de pasta blanda presentando un pH menor a 4.5 y resulta del proceso de adición de ácidos orgánicos o minerales para coagular la caseína. Dicho suero se produce al alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína con anulaciones de las cargas eléctricas que las mantiene separada por las fuerzas de repulsión que generan, impidiendo así su floculación (Callejas *et al.*, 2012).

En cambio el suero dulce proviene de la fabricación de quesos de pasta cocida y presenta un pH mayor a 6.0 y está basado en la coagulación de la renina. En la

Tabla 1.1 se puede detallar la composición nutricional del suero dulce y ácido. Siendo la principal diferencia entre los dos tipos de suero el contenido de lactosa, minerales, acidez y la fracción de las proteínas (Parra-Huertas, 2009; Poveda-Espinosa, 2013).

Tabla 1.1 Composición química del suero dulce y ácido (Parra-Huertas, 2009)

Componente	Suero dulce (g/L)	Suero ácido (g/L)
Sólidos totales	63-70	63-70
Lactosa	46-52	44-46
Proteína	6-10	6-8
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfato	1-3	2-4.5
Lactatos	2	6.4
Cloruros	1.1	1.1

En México, se produce principalmente el suero dulce y medio ácido (Valencia-Denicia y Ramírez-Castillo, 2009), debido a que se producen principalmente quesos blandos no madurados y quesos tipo “pasta filata” donde la coagulación de la cuajada requiere un pH de 5.2.

Las propiedades funcionales del suero de leche vienen dada por sus principales proteínas α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina. La α -lactoalbúmina está formada por una cadena polipeptídica de 123 aminoácidos, con un peso molecular de unos 14 200 Dalton y tamaños de partículas entre 1-2 μm . Es una proteína ácida con punto isoeléctrico alrededor de un pH 4.3. La β -lactoglobulina está formada por una sola cadena de 162 aminoácidos, con un peso molecular de unos 18 400 Dalton y tamaños de partículas entre 2-4 μm . Estos dímeros se forman entre pH 7.5-5.2 (Punto isoeléctrico de β -lactoglobulina) (Callejas *et al.*, 2012).

1.2 Lactosa

También conocido como el azúcar de la leche. Es un disacárido que se forma por la unión de una molécula de galactosa y otra de glucosa mediante un enlace glucosídico $\beta(1,4)$ (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa) como se observa en la Figura 1.1 (Badui, 2006). Este disacárido se sintetiza por condensación en la glándula mamaria por un sistema enzimático en el que interviene la proteína α -lactoalbúmina para después segregarse en la leche del animal. Presenta aproximadamente el 15% del poder edulcorante de la sacarosa y contribuye junto con las sales al sabor global del alimento.

En el suero de leche es el componente mayoritario presente después del agua y su contenido de este carbohidrato depende de la leche utilizada. En la leche de vaca su contenido es entre 4.4 y 5.2 % y alrededor de 4.5 % en leches de cabra y oveja (García-Garibay *et al.*, 2004).

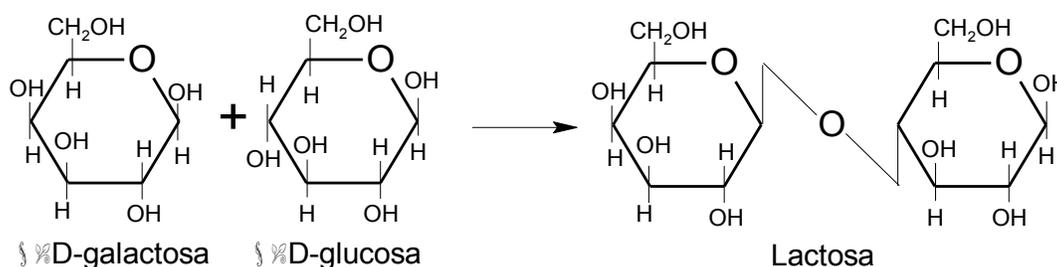


Figura 1.1 Síntesis de la lactosa

En México la producción de lactosa es de alrededor de 50 mil toneladas por año (Valencia-Denicia y Ramírez-Castillo, 2009). Según Rosa de Souza *et al.*, 2010 la recuperación y la utilización de la lactosa en procesos biotecnológicos es una opción económicamente viable, además de minimizar los problemas de contaminación. Lo anterior se debe a que la bioconversión de la lactosa del suero de leche reduce más del 75% de la demanda bioquímica de oxígeno que exhibe el suero de leche y a su vez se generan productos de interés comercial (González Sisso, 1996; Araujo *et al.*, 2007).

1.3 Levaduras

Las levaduras son un grupo de microorganismo que filogenéticamente pertenecen al reino fungí y se agrupan en Ascomicetos y Basidiomicetos. No obstante las levaduras no forman un grupo muy definido, ya que no guardan uniformidad morfológica.

Al ser hongos unicelulares no filamentosos su forma va desde esférica, ovoide o esferoides, alimonada hasta cilíndrica e incluso triangular. Sus dimensiones oscilan de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según su especie, nutrición, edad y otros factores (Carrillo y Audisio *et al.*, 2007). Su clasificación se basa principalmente en sus características morfológicas, que se determinan mediante observación microscópica, aunque en microbiología de alimentos sus propiedades fisiológicas tienen mayor importancia. Sus partes observables son la pared celular, el citoplasma, las vacuolas de agua, los glóbulos de grasas y los gránulos, los cuales pueden ser metacromáticos de albúmina o de almidón. Para poder observar el núcleo es preciso utilizar tinciones especiales.

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, formando colonias de organismos unicelulares que crecen a medida que aumenta el número de levaduras. Su reproducción suele ocurrir por gemación. En los medios de cultivo forman colonias pastosas color crema, constituidas en su mayor parte por células aisladas.

El intervalo de temperatura de crecimiento de la mayoría de las levaduras es en general parecido al de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47°C. Algunas especies son capaces de crecer a temperatura de 0°C o inferiores. Una reacción ácida del medio próxima a un pH de 4 a 4.5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos no crecen bien a no ser que se hayan adaptado al mismo.

1.3.1 *Kluyveromyces marxianus*

Se sabe que el microorganismo *Kluyveromyces marxianus* es una levadura *Ascosporógena* que pertenece al grupo de las *Eumycota*, del tipo *Hemiascomycetes* que se encuentran dentro de la clase *Ascomicotina*, del orden *Endomycetales*, familia *Saccharomicetaceae*, subfamilia *Saccharomycetaideae*, género *Kluyveromyces* y de la especie *marxianus*. Produce de 1 a 4 ascosporas y su forma va de reniforme a media luna. Fermenta glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, D-Xilosa e inulina y no asimila nitrato y crece a 37°C.

A través de los años *Kluyveromyces marxianus* ha sido reclasificada taxonómicamente. Fue descrita por primera vez en 1888 por E. C Hase. En los años 50's Lodder y Kreger-van Rij la agruparon en el género *Saccharomyces* llamándola *Saccharomyces fragilis* y *Saccharomyces marxianus*, las cuales producían ascosporas lunadas en contraste con las redondas del resto de las especie clasificadas bajo el mismo género. En 1970 Lodder considera la forma de las ascosporas como fundamental y las reclasifica bajo el género *Kluyveromyces* llamándolas *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces marxianus* respectivamente. En 1984 Kreger-Van Rij considerando la infertilidad de las especies *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces marxianus* decidió fusionarlas en *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*.

Fue Marx quien originalmente aisló esta levadura de uvas (Graciano *et al.*, 2008), sin embargo también puede aislarse de alimentos fermentados como el kéfir, pulque, queso, yogur, leche y de algunas fermentaciones espontaneas (Mendoza-Gardeazábal, 2013). Otros hábitats de los cuales la cepa *Kluyveromyces marxianus* ha sido aislada son: frutas variadas, hojas podridas de sisal, aguas residuales de industrias azucareras. Debido a lo anterior existe una alta diversidad metabólica y un grado sustancial de polimorfismo intraespecífico y como consecuencia de ello varias aplicaciones biotecnológicas ha sido investigadas con esta levadura, tales como: producción de enzimas, proteína celular, componentes aromáticos y etanol (incluyendo a altas temperaturas y procesos simultáneos de sacarificación y fermentación); reducción de lactosa contenido en productos

alimenticios, producción de bioingredientes del suero de leche, biorremediación (Zhou *et al.*, 2013). Estas investigaciones se han venido realizando a partir de la década de los setenta con la finalidad de conocer aspectos metabólicos y bioquímicos de esta levadura; dentro de algunas de sus características podemos encontrar que puede crecer en una gran variedad de sustratos, tiempos corto de regeneración, termo resistentes a temperaturas que oscilan entre 20°C hasta 39°C, pH óptimo entre 6 y 7 y altas velocidades de crecimiento (Graciano *et al.*, 2008).

En la industria ha sido utilizada ampliamente en el procesamiento del suero de leche (Aktas *et al.*, 2006) obteniéndose productos como: alcoholes (etanol y glicerol) (Quintero *et al.*, 2001), teniendo una menor tendencia a producirlo cuando se encuentra en presencia en exceso de azúcares, compuestos aromáticos como ésteres, ácidos carboxílicos y acetatos. En términos de estudios bioquímicos sobre enzimas con interés industrial la levadura *Kluyveromyces marxianus* ha sido usada como fuente de inulinasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa y endopoligalacturonasa. Además de las enzimas mencionadas otras menos potencial de aplicación en la industria tal como fosfatasas y aminopeptidasas han sido investigadas recientemente (Graciano *et al.*, 2008).

La Figura 1.2 es una vista al microscopio con el objetivo 40X de la levadura *Kluyveromyces marxianus*.

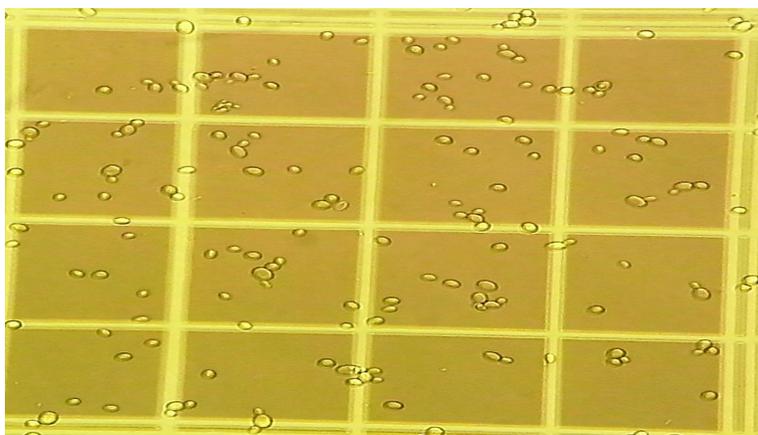


Figura 1.2 Levadura *Kluyveromyces marxianus*

1.4 Ácido láctico

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanoico tiene una larga historia de usos por fermentación y preservación de productos alimenticios. Es un compuesto muy versátil que es ampliamente utilizado en industrias como: química, farmacéutica, de alimentos y de plásticos. Fue aislado e identificado en 1780 por el químico sueco Scheele quien lo considero como un componente de la leche al aislarlo de leche agria (Mostafa *et al.*, 2009; Panesar *et al.*, 2007; Serna *et al.*, 2005). En 1847 fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur y en 1855 Pasteur publicó su célebre memoria titulada “Mémoire sur la fermentation apelée lactique” la cual se le considera la base de la teoría microbiana de la fermentación. Lister en 1877 obtiene el cultivo puro de *Streptococcus lactis*, el primero de una bacteria láctica. Pocos años después, 1881 se inicia la fermentación a escala industrial por Littlelon (Serna *et al.*, 2005; Parés y Juárez, 2012).

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico como se observa en la Figura 1.3 lo cual da a lugar a la actividad óptica, existiendo 2 isómeros, el D(-) láctico y L(+) láctico y una forma racémica que está constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-).

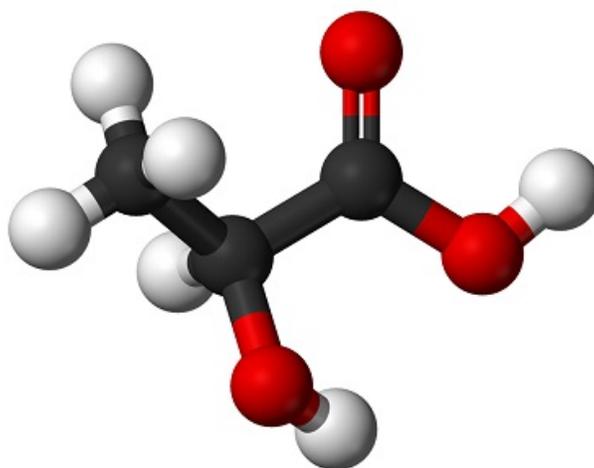


Figura 1.3 Ácido láctico

A diferencia del isómero D(-), la configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano. Tanto las dos formas ópticas activas y la forma racémica se encuentra en estado líquido, siendo incoloros y solubles en agua. En estado puro son sólidos altamente higroscópico de punto de fusión bajo, el cual es difícil de determinar debido a la extrema dificultad de producirlo anhidro; es por esta razón que se maneja en rangos de 18-33°C. El punto de ebullición del producto anhidro esta entre 125-140°C. Ambas formas isoméricas del ácido láctico puede ser polimerizada y se puede producir polímeros de diferentes propiedades dependiendo de la composición. Las propiedades fisicoquímicas del ácido láctico se muestran en la Tabla 1.2

Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico

Formula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular [g/mol]	90.08
Índice de refracción	1.4414
Punto de fusión [°C]	L(+) y D(-): 52.8 a 54 DL (según composición) :16.8 a 33
Punto de ebullición [°C]	125-144
Gravedad especifica [-]	1206
Calor de combustión [Cal/g]	3616
Viscosidad [Pa s]	40.33
Densidad [g/cm ³]	1.249
Constante dieléctrica [ε]	22

Su obtención es por dos vías: síntesis química y procesos biotecnológicos de ruta metabólica. En 1960 se desarrolló un método de síntesis química debido a la necesidad de un ácido láctico termoestable en la industria de la panificación. La síntesis puede ser llevada a cabo por la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual se hidroliza a ácido láctico, o por la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. Los procesos de obtención por síntesis química presentan una desventaja, el ácido láctico producido es una mezcla de DL ácido láctico racémico ópticamente inactivo, un ácido láctico puro: L(+) o D(-) puede ser obtenido por fermentación microbiana, es por ello que de las

40 000 toneladas de ácido láctico producido en el mundo cada año (Herryman-Munilla y Blanco-Carracedo, 2005), cerca del 90% es producido vía biotecnológica, el resto es producido por síntesis química por la hidrólisis de lactonitrilo (Serna *et al.*, 2005; Mostafa *et al.*, 2009).

La producción biotecnológica está basada en fermentaciones por bacterias y hongos, buscando siempre microorganismos termófilos que fermenten rápida y completamente sustratos baratos con la adición mínima de nutrientes, que crezcan en condiciones de valores reducidos de pH, que presente poca producción de biomasa y una despreciable cantidad de subproductos. Este tipo de producción tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) y L (+) ópticamente activos.

Acorde a los productos finales, la fermentación se divide en homoláctica y heteroláctica. En la fermentación homoláctica se produce únicamente ácido láctico y su estequiometría es la siguiente:



En este tipo de fermentación puede dar una mezcla de ácidos orgánicos cuando existe uno de los siguientes casos: concentración de glucosa limitante, incremento del pH, aumento de la temperatura o fermentación de azúcares diferentes a la glucosa. Lo anterior radica en el metabolismo del Piruvato, el cual además de producir ácido láctico produce formiato y acetil CoA por la enzima Piruvato-formiato liasa.

En la fermentación heteroláctica, a partir de hexosas se producen cantidades equimolares de otros productos como ácido acético, etanol y dióxido de carbono. La estequiometría heteroláctica a partir de glucosa es la siguiente:



Los hongos utilizados en la producción de ácido láctico son mohos y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. Sin embargo, los mohos presentan dificultad de producción de

ácido láctico debido a su forma física, ya que el gran tamaño de micelios provoca un aumento de la viscosidad en el caldo de fermentación, lo que causa un alto incremento de la demanda de oxígeno y la transferencia de masa, lo que a su vez aumenta el tiempo de fermentación y la formación de subproductos, especialmente etanol, lo que disminuye los rendimientos de conversión. Como la forma física del crecimiento del hongo está influenciado por: pH del medio, agitación, aireación, concentración de inóculo y la concentración de sustrato; estas variables son manipuladas para disminuir la viscosidad del medio de cultivo.

Los sustratos utilizados son sacarosa proveniente del azúcar de caña y remolacha azucarera, lactosa proveniente del suero de leche y dextrosa procedente de almidón hidrolizado; la sacarosa refinada y la glucosa son los más utilizados pero debido a que el azúcar puro es de alto costo, se ha venido investigando otros sustratos para disminuir los costes de producción.

Actualmente ha habido un creciente interés en la producción de ácido láctico ya que es utilizado como precursor del ácido poliláctico, un polímero biodegradable utilizado en especialidades médicas (Panesar *et al.*, 2007).

1.5 Fermentación

Una fermentación se puede definir como el proceso mediante el cual las sustancias llamadas sustratos sufren una serie de cambios químicos que producen energía (Hernández *et al.*, 2003). Desde el punto de vista microbiológico se entiende por fermentación aquel proceso en el que los microorganismos producen metabolitos o biomasa a partir de la utilización de sustancias llamadas sustratos en ausencia o presencia de oxígeno. De acuerdo a lo anterior los procesos de fermentación se denominan:

Fermentación aerobia: El aceptador final de electrones es el oxígeno, su presencia es imprescindible para el desarrollo de microorganismo y la producción de compuestos deseados. En este tipo de procesos se produce fundamentalmente biomasa, dióxido de carbono y agua.

Fermentación anaerobia: Se desarrolla en ausencia de oxígeno, los productos finales son sustancias orgánicas, por ejemplo, ácidos (acético, láctico, propiónico), butanol, etanol y acetona. Sin embargo en la mayoría de las fermentaciones anaerobias se requiere un poco de oxígeno al inicio del proceso para favorecer el crecimiento y la producción del microorganismo.

1.6 Fermentadores

Un fermentador o bioreactor, es un recipiente donde se lleva a cabo el proceso de fermentación. Su función principal es mantener el medio y el microorganismo en las condiciones adecuadas para lograr la mayor producción de los compuestos de interés. Este recipiente debe cumplir ciertos requisitos, tales como: consumo bajo de energía, mezclado uniforme del medio de cultivo manteniendo a los microorganismos separados entre ellos para evitar daños mecánicos de las células, mínima variación durante su operación, adaptación fácil a diferentes procesos, buena transferencia de calor, diseño mecánico simple, control de pH, oxígeno disuelto y temperatura, facilidad de toma de muestra y diseño que permita mantener condiciones de asepsia durante el proceso.

1.6.1 Fermentadores escala laboratorio

En la historia de los procesos de fermentación el reactor más utilizado a escala laboratorio ha sido el matraz Erlenmeyer. En la actualidad es la herramienta más empleada para la selección de la cepa, la preparación del inóculo, el estudio inicial de las condiciones adecuadas para el desarrollo del microorganismo y la preparación del cultivo antes de aumentar el tamaño del proceso. La principal desventaja del Erlenmeyer es la dificultad de mantener y controlar condiciones de pH, oxígeno disuelto, asepsia que se requiere para el crecimiento óptimo del microorganismo.

1.7 Crecimiento microbiano

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para fabricar nuevos microorganismos. Este proceso continua hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse por acumulación de algunas sustancias inhibidora formada por los mismos microorganismos.

1.7.1 Estequiometria del crecimiento microbiano

La aplicación de la estequiometria requiere conocer los rendimientos. Estos se definen como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido (Usualmente la fuente de carbono y energía). Por ejemplo el rendimiento celular se define como:

$$Y_{\frac{X}{S}} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (1.3)$$

Donde X y S representan la concentración de biomasa y sustrato respectivamente. Si lo microorganismos forman algún producto en particular, el rendimiento en producto estará dado por:

$$Y_{\frac{P}{S}} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (1.4)$$

1.7.2 Cinética de crecimiento

Debido a la naturaleza autocatalítica del crecimiento microbiano, es lógico suponer que la concentración de microorganismo influye en la velocidad con que aumenta la población así:

$$r_X = \mu X \quad (1.5)$$

Donde r_X es la velocidad específica de crecimiento, la cual para un tipo de microorganismo dado depende principalmente de la composición y concentración

del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Existen diversas expresiones para r_x la más difundida es la ecuación de Monod (Ec. 1.4), la cual relaciona el valor de μ con la concentración de un componente del medio de cultivo que está en defecto respecto de los requerimientos del microorganismo: sustrato limitante.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S} \quad (1.6)$$

Donde la S es la concentración de sustrato limitante, $\mu_{m\acute{a}x}$ es la velocidad de crecimiento específica máxima y K_s se le conoce como constante de saturación. El valor de K_s está inversamente relacionado con la afinidad del microorganismo por el sustrato.

Cuando $S \gg K_s$, μ toma el valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ y r_x solo depende de X

En general K_s tiene valores muy bajos de orden de mg/L por lo tanto concentraciones relativamente bajas de S son suficientes para hacer de $\mu = \mu_{m\acute{a}x}$. Las levaduras poseen en promedio una velocidad específica de $\mu = 0.45h^{-1}$ (Ertola, año)

1.7.3 Consumo de sustrato

La velocidad con la que el microorganismo consume el sustrato se puede expresar de la siguiente forma:

$$r_s = q_s X \quad (1.7)$$

Donde q_s es la velocidad específica de consumo de sustrato y se expresa de la siguiente forma:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (1.8)$$

1.8 Curva de crecimiento

La Figura 1.4 representa el comportamiento de crecimiento del microorganismo a través del tiempo. Con ella se determina cuando se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos.

- a) Fase de latencia: También conocida como fase lag, es el periodo de adaptación de microorganismo a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. Se presenta inmediatamente después de la inoculación y su duración depende del estado fisiológico de la célula inoculada y de las condiciones ambientales. Si el microorganismo se encuentra en su fase logarítmica antes de la inoculación la fase lag es muy pequeña o puede no presentarse. Durante este periodo, no existe aumento en el número de células pues el microorganismo utiliza la energía disponible con el fin de sintetizar enzimas que requiere para su desarrollo en el nuevo.
- b) Fase logarítmica o exponencial. En esta fase las células se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo (levaduras y bacterias) o por el aumento en la biomasa por unidad de tiempo (hongos filamentosos). La velocidad de crecimiento durante este periodo permanece constante y es independiente de la concentración del sustrato siempre y cuando esta sustancia se encuentre en exceso. La fase logarítmica termina cuando se produce alguna de estas tres situaciones: los nutrientes se agotan, las condiciones ambientales indispensables para el microorganismo se modifican o cual el microorganismo produce metabolitos tóxicos que inhiben su reproducción.

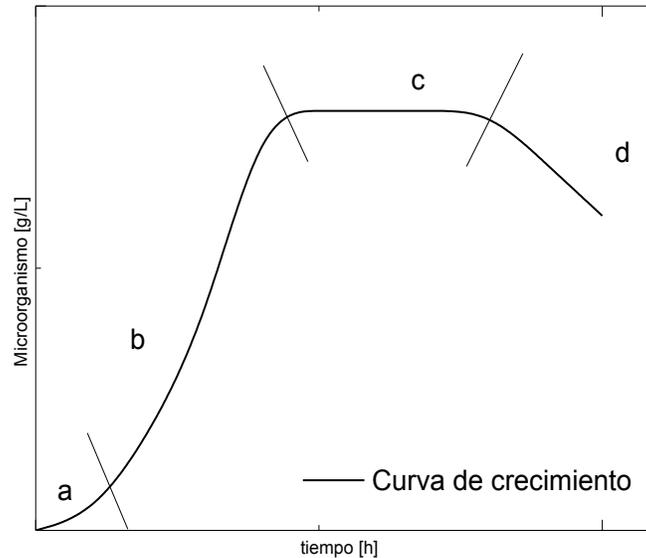


Figura 1.4. Curva de crecimiento de un microorganismo

- c) Fase estacionaria: Aquí la velocidad de crecimiento del microorganismo es igual a la velocidad de muerte y se llega a un equilibrio celular.
- d) Fase de muerte: esta fase inicia cuando los nutrientes que están en el medio del cultivo no son suficiente para que el microorganismo pueda reproducirse. Otro motivo por el cual se inicia esta etapa es la producción de sustancias tóxicas que impiden la multiplicación celular.

1.9 Ecuación de Monod

El modelo de crecimiento celular, describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento μ y la concentración de nutrientes limitantes en el cultivo microbiano y se representa por la ecuación 1.6. Con base a la ecuación de Monod y la Figura 1.5 se puede observar que:

- Si la concentración del sustrato limitante es cero, la velocidad específica de crecimiento también lo es. Si $[S]$ es muy grande, la velocidad específica de crecimiento tiende a la velocidad máxima. El microorganismo se encuentra en la fase logarítmica que corresponde a la sección entre los puntos II y III.

- Si por el contrario, es muy pequeño, la velocidad específica de crecimiento depende de $[S]$, como se muestra en la sección entre los puntos I y II de la Figura 1.5.

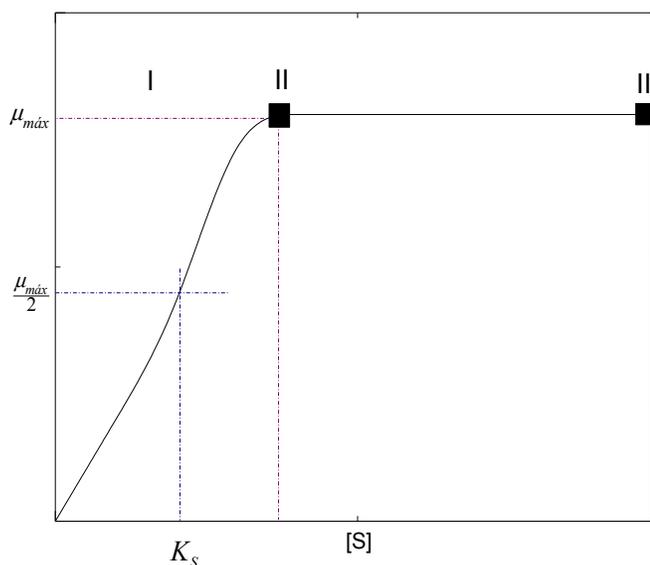


Figura 1.5 Efecto de la concentración de sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento de un microorganismo

1.10 Reología: Fundamentos teóricos

La reología es la ciencia que estudia y analiza los fenómenos de flujo y deformación y las propiedades mecánicas de los gases, líquidos, plásticos y comprende el estudio de las sustancias que fluyen pero que su comportamiento no está regido por la ley de Newton. Su campo de estudio se extiende desde la mecánica de los fluidos newtonianos hasta la elasticidad de Hooke. La región comprendida entre ellas corresponde a todos los materiales pastosos y suspensiones (Bird *et al.*, 1992).

El primer uso de la palabra reología es acreditado a Eugene C. Bingham cerca del año 1928 quien también describe el lema de $\pi\alpha\nu\tau\alpha \rho\epsilon\iota$ (panta rhei) que significa “todo fluye”. Autores como Bird *et al.*, 1992; Steffe, 1996; Barnes, 2000; Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2003 definen a la reología como la ciencia del flujo de materia y

sus deformaciones, es decir, estudia la manera en como los materiales responden cuando se le aplica un esfuerzo.

1.11 Caldos de fermentación como fluidos complejos

Normalmente los caldos de fermentación presentan un comportamiento reológico complejo esto porque está conformado por varias fases, donde al menos una de ellas es un fluido simple. Si a este fluido simple se le añade partículas grandes o pequeña, su comportamiento reológico se desviara del comportamiento más simple “el newtoniano”, ya que la fase formada por partículas se moverá con mucha dificultad.

Los caldos de fermentación contienen una elevada cantidad considerable de sólidos en suspensión (células), razón por la cual se les conoce como suspensiones. Las suspensiones se definen como la mezcla de un fluido y partículas sólidas y exhiben un comportamiento reológico complejo, esto se debe a diferentes formas, tamaños y distribución de las partículas, haciéndose aún más complejo con las interacciones entre fluido-partículas y partículas-partículas.

1.12 Comportamiento reológico en caldos de fermentación

- **Newtonianos:** En el caso de fermentaciones con baja concentración celular presentan este tipo de comportamiento. Este tipo de comportamiento el coeficiente de viscosidad es constante para una temperatura y una presión dada, es decir, cuando el fluido es sometido a esfuerzos de corte se desarrollan relaciones de deformación directamente proporcional a la velocidad de deformación. Por definición, su reograma es una línea recta que relaciona τ y $\dot{\gamma}$ con intercepto cero y pendiente igual a μ que es la constante de proporcionalidad para la relación y se conoce como viscosidad dinámica (Sharman *et al.*, 2003).

- **No-Newtonianos:** Este tipo de comportamiento es característico en los fluidos complejos, ya que no presentan proporcionalidad entre la relación de deformación y es esfuerzo de corte, la viscosidad recibe el nombre de viscosidad aparente y está en función de la velocidad de corte (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2003). La curva de flujo es no lineal o no pasa por el origen, donde el esfuerzo de corte dividido por la velocidad de corte, no es constante a una temperatura y a una presión dada, pero si depende de las condiciones de flujo, tales como: geometría de flujo, velocidad de corte y a veces incluso en la historia cinemática del elemento líquido en cuestión (Chhabra and Richardson, 2008).
- **Fluidos independientes del tiempo de aplicación**
Los fluidos no-newtonianos independientes del tiempo, se caracterizan porque las tensiones tangenciales dependen únicamente de la velocidad de deformación, y se representan funcionalmente como:

$$\tau = f(\dot{\gamma}) \quad (1.9)$$

- **Fluido pseudoplástico:** Se define como la disminución de la viscosidad con el aumento de la velocidad de corte y el índice de comportamiento reológico n es menor que la unidad. Este comportamiento se encuentra con suspensiones concentradas en fluidos newtonianos cuando los sólidos tienen interacciones partícula-partícula. A medida que el caudal aumenta, los enlaces entre partículas se rompen, la movilidad de las partículas se incrementa, y la viscosidad de la suspensión disminuye (Carreau *et al.*, 2002).
- **Fluido dilatante:** Este tipo de fluido se caracteriza por un aumento de la viscosidad al aumentar el gradiente velocidad, es decir, la viscosidad aparente del fluido aumenta a medida que aumenta la velocidad de corte. El índice de comportamiento reológico n es mayor que la unidad. Las suspensiones concentradas exhiben este comportamiento de engrosamiento o espesamiento a altas velocidades de corte, pero la

1.13 Constantes reológicas fundamentales de los caldos de fermentación

Las propiedades reológicas se definen a partir de la relación existente entre fuerzas externas y su respuesta, ya sea como deformación o flujo. Los caldos de fermentación con una baja concentración celular ($\Phi < 0.05$), es decir, suspensiones diluidas, presentan un comportamiento newtoniano, a una temperatura y a una presión dada, con un sólo un parámetro de viscosidad constante, mientras que los caldos de fermentación con alta concentración celular ($\Phi > 0.20$) presenta un comportamiento reológico complejo con un mínimo de 2 parámetros: Coeficiente de consistencia $K[Pa \cdot s^n]$ e índice de comportamiento reológico $n[-]$. Algunas suspensiones concentradas presentan un esfuerzo de corte inicial o umbral de fluencia $\tau_0[Pa]$ que debe alcanzarse antes de que comience el flujo (Sharman *et al.*, 2003). Estas propiedades reológicas están determinadas por el volumen o el tamaño, forma, cantidad, interacción de partículas, propiedades hidrodinámicas y su efecto global a nivel molecular o microscópico.

El coeficiente de consistencia K , es una constante de proporcionalidad entre la relación de deformación y el esfuerzo de corte aplicado, es decir, es un indicador del grado de viscosidad en fluidos no-Newtonianos.

El índice de comportamiento reológico n , es un número adimensional que indica la cercanía al flujo Newtoniano. Para un líquido Newtoniano $n = 1$, para un fluido dilatante $n > 1$ y para un fluido pseudoplástico $n < 1$.

El esfuerzo de corte inicial τ_0 puede ser definido como el mínimo esfuerzo de corte requerido para iniciar el flujo (Steffe, 1996). Este parámetro es el resultado de enredos físicos de moléculas o partículas causado por grandes tamaños y alto grado de ramificaciones o formas irregulares. En el caso de suspensiones concentradas con interacciones partícula-partícula, el esfuerzo de corte inicial es el esfuerzo mínimo necesario para romper parcialmente la microestructura de las partículas para permitir que la suspensión fluya (Carreau *et al.*, 2002).

Teóricamente estas propiedades reológicas fundamentales son independientes del instrumento en el cual se midieron, de manera que diferentes instrumentos producirán los mismos resultados; sin embargo esto es un concepto ideal y diferentes instrumentos rara vez producen resultados idénticos, no obstante el objetivo es distinguir las propiedades reológicas verdaderas del material de las características subjetivas (Steffe 1996).

1.14 Reología de suspensiones de levaduras

La viscosidad relativa de una suspensión se define como la viscosidad reducida de una suspensión.

$$\eta_r = \frac{\eta_s}{\eta_f} \quad (1.10)$$

donde η_s y η_f son las viscosidades aparentes de la suspensión y del fluido que forman parte de la suspensión a una determinada tasa de corte. La viscosidad aparente reducida, es un número adimensional que indica el número de veces que se incrementa la viscosidad aparente de una suspensión respecto a la viscosidad del fluido que forma parte de la suspensión (Moreno, 2005).

Viscosidad de suspensiones η_s [Pa s]. La viscosidad de suspensiones depende de la concentración de partículas dispersas en el medio continuo, modificando el esfuerzo de corte con una contribución adicional a la predicha por la ecuación de Newton. El primer modelo utilizado para describir la variación de la viscosidad con la fracción en volumen de partículas fue desarrollada por Einstein (1906) según el cual (Moreno, 2005; Cantú- Lozano 1987):

$$\eta = \eta_s (1 + 2.5\phi) \quad (1.11)$$

Donde η es la viscosidad de la suspensión y η_s la viscosidad del medio líquido. Esta ecuación es válida solo para suspensiones diluidas $0.05 < \phi < 25$, ya que asume lo siguiente:

- El medio no es compresible y se puede tratar como un continuo
- Se desprecia fuerzas, torques e inercias
- La densidad se mantiene constante, es decir, no hay sedimentación
- No hay efectos de deslizamiento entre partículas y el fluido
- Las partículas son esferas
- La suspensión es diluida, de forma que las partículas no interaccionan
- No hay efecto de pared
- No hay migración de partículas
- La velocidad media en el fluido no cambia al introducir las partículas

La ecuación 1.11 muestra que la viscosidad de la suspensión no depende del tamaño de la partícula ni de la velocidad de corte, ya que la ecuación constitutiva es Newtoniana. Einstein mostró que partículas individuales incrementan la viscosidad de un líquido como una función simple de su fracción volumétrica. Nos damos cuenta inmediatamente que en la ecuación 1.11 no hay efecto del tamaño de partícula, posición de partícula debido a que la teoría deja a un lado los efectos de otras partículas (Barnes *et al.*, 1989).

En una suspensión más concentrada no se puede menos preciar el efecto de la interacción entre partículas. En tal caso el esfuerzo viene dado por dos contribuciones, una a las interacciones hidrodinámicas y otra a las partículas que tienen en cuenta el efecto del movimiento browniano y de los potenciales de interacción. Batchelor (1977) extendió el modelo de Einstein considerando las interacciones ente dos partículas, para lo cual calculó la contribución hidrodinámica en ausencia de movimiento browniano. Así, la viscosidad se expresa como la suma de estas contribuciones y la resultante del efecto browniano, expresada en serie pero introduciendo solo el término lineal de la forma (Moreno, 2005; Barnes *et al.*, 1989):

$$\eta = \eta_s (1 + 2.5\phi + 6.2\phi^2) \quad (1.12)$$

En concentraciones mayores de 25% de la fracción volumétrica, ϕ , Vand (1948) (citado por Cantú-Lozano, 1987) derivó la ecuación de *Einstein* para:

$$\eta = \eta_s (1 + 2.5\phi + 7.25\phi^2) \quad (1.13)$$

La ecuación lineal de *Einstein* es útil para determinar la viscosidad de la suspensión de levaduras, con morfología esféricas y concentración volumétrica hasta el 20%, la ecuación de *Batchelor* y la ecuación de *Vand* son recomendables para fracciones volumétricas de $\phi > 25\%$. Para suspensiones concentradas de esferas, es decir $\phi > 50\%$, donde la interacción de las partículas se vuelven apreciables se hace uso de la ecuación de *Mooney* (1951) (Bird *et al.*, 2006).

$$\eta = \frac{\eta_s}{\eta_L} = e^{\left(\frac{2.5\phi}{1 - \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right)} \right)} \quad (1.14)$$

donde $\phi \left(\frac{v}{v} \right)$ es la fracción volumétrica y ϕ_0 es una constante empírica cuyo valor varía aproximadamente entre $0.52 \leq \phi \leq 0.74$

1.15 Número de *Péclet*

El número de *Péclet*, permite calcular la energía mecánica necesaria que se le tiene que aplicar a un fluido para que ocurra una deformación que no sea provocada por la energía térmica del fluido. Debido a que esta última puede producir cambios en la configuración microscópica del fluido, en ausencia de la

energía mecánica. Este parámetro es un balance entre movimiento browniano y el flujo. Este parámetro se define como una velocidad de corte multiplicada por un tiempo de difusión característico (Moreno, 2005) y se calcula como el cociente de la energía mecánica y la energía térmica de la siguiente forma:

$$Pe = \frac{\eta_s \dot{\gamma} a^3}{kT} \quad (1.15)$$

donde a : radio de la partícula, η_s : viscosidad del medio, $\dot{\gamma}$: velocidad de corte, k : Constante de Boltzman y T : Temperatura

En la ecuación 1.15 $\eta_s \dot{\gamma} a^3$ es la energía mecánica y kT es la energía térmica. El comportamiento reológico de los fluidos depende de la magnitud del número de *Péclet*. Cuando $Pe < 1$ el fluido no puede ser deformado por el esfuerzo mecánico aplicado. $Pe \approx 1$, el esfuerzo mecánico comienza a producir la deformación del fluido y este comienza a ceder, esto implica que la viscosidad del fluido tiende a disminuir y a medida que $Pe > 1$, la viscosidad del fluido va disminuyendo hasta que el fluido alcanza alguna configuración de equilibrio. En el punto que $Pe = 1$, el comportamiento del fluido se torna dependiente exclusivamente del esfuerzo aplicado.

1.16 Reynolds de partículas esféricas

En muchas situaciones los efectos inerciales son insignificantes y el número de Reynolds en partículas esféricas es un parámetro determinante en la modelación reológica de suspensiones, ya que el tamaño de las partículas suspendidas toma un papel importante en el comportamiento del fluido. Para una tasa de corte, el número de Reynolds de partículas esféricas se define por:

$$Re_p = \frac{\rho \dot{\gamma} a^2}{\eta_s} \quad (1.16)$$

Donde a es el radio de la partícula, ρ densidad del fluido, $\dot{\gamma}$ velocidad de corte y η_s la viscosidad del fluido.

1.17 Modelos reológicos

La reología toma puntos de referencia para definir el comportamiento de la infinidad de variaciones existentes en los materiales tomando como base dos tipos de sustancias, líquido ideal o Newtoniano, que carece de las propiedades de los sólidos y por otro lado el sólido ideal o Hookiano, que carece de las propiedades de los líquidos. Combinando estos dos modelos se obtienen otros modelos intermedios.

Estos modelos son una relación matemática que nos permite caracterizar la naturaleza fenomenológica de un fluido, estudiando la deformación dada a una tasa de corte específica y son ampliamente usados para representar de manera más fácil y comprensible, el comportamiento mecánico de los materiales.

- Modelo *Ostwald-de Waele*

También conocida como ley de potencia. Para $n=1$ se transforma en la ley de viscosidad de Newton. Cuando $n < 1$ el comportamiento es pseudoplástico, mientras que $n > 1$ el comportamiento es dilatante.

$$\tau [Pa] = K \dot{\gamma}^n \quad (1.17)$$

- Modelo de *Herschel-Bulkley*

Este modelo es una relación general para describir el comportamiento de fluidos no-Newtonianos. En este modelo se añadió el término de esfuerzo de cedencia τ_0 para describir el comportamiento tipo plástico y el plástico tipo Casson. Los casos especiales de esta ecuación son el comportamiento Newtoniano, ley de potencia (pseudoplástico o dilatante) y plástico de *Bingham*.

$$\tau[Pa] = \tau_0 + K \dot{\gamma} \quad (1.18)$$

- Modelo de Bingham

Conocidos también como cuerpo de *Bingham*. Estos cuerpos no se derraman bajo el efecto de su peso; necesitan que la presión sobrepase un umbral para que comiencen el flujo. Una vez que se ha sobrepasado este valor crítico, el fluido se comportara como newtoniano. Esto se expresa por:

$$\tau[Pa] = \tau_0 + K \dot{\gamma} \quad (1.19)$$

donde τ_0 es el esfuerzo de corte limite, por encima del cual se produce el derramamiento newtoniano.

- Modelo de Casson

En este modelo, la curva de esfuerzo cortante contra velocidad de corte puede transformarse en una línea recta elaborando una gráfica de la raíz cuadrada de esfuerzo contra la raíz cuadrada de la velocidad de corte.

$$\tau^{\frac{1}{2}}[Pa] = \tau_0^{\frac{1}{2}} + K \dot{\gamma}^{\frac{1}{2}} \quad (1.20)$$

1.18 Modelos reológicos en función de la temperatura y concentración

Entre los factores que influyen en el comportamiento reológico de los fluidos encontramos la temperatura y la concentración, siendo los factores más importantes y los más estudiados, ya que el conocimiento de estos dos factores es de gran importancia para entender operaciones unitarias como evaporación y concentración donde simultáneamente la transferencia de calor y masa tienen lugar (Barbana y El-Omri, 2009).

La viscosidad de los fluidos disminuye con la temperatura, esto se debe al hecho de que conforme aumenta la temperatura las fuerzas de viscosidad son superadas por la energía cinética dando a lugar a una disminución de la viscosidad. La energía de activación es una medida del umbral de energía que se debe vencer para que el ordenamiento de moléculas en el fluido se modifique para fluir. Autores como: Zainal *et al.*, 2000; Arslan *et al.*, 2005; Dak *et al.*, 2007; Vandresen *et al.*, 2009; Cayetano *et al.*, 2013; han descrito el efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente y lo han expresado mediante el modelo tipo exponencial de *Arrhenius*, el cual involucra la temperatura absoluta, la constante universal de los gases y la energía de activación de flujo.

$$\eta_a = \eta_0 e^{\left(\frac{Ea}{RT}\right)} \quad (1.21)$$

Kosmerl *et al.*, 2000 propone una ecuación modificada de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente a una velocidad específica de corte.

$$\ln \eta_a = a + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} \quad (1.22)$$

Autores como: Juszczak y Fortuna, 2004; Da Silva *et al.*, 2005; Rao, 2007; Manayay e Ibarz, 2010 han descrito el efecto de la concentración sobre el comportamiento reológico mediante las siguientes ecuaciones:

$$\eta_a = \eta_0 C^{a_1} \quad (1.23)$$

$$\eta_a = \eta_0 e^{a_2 C} \quad (1.24)$$

Finalmente el contar con un solo modelo reológico que calcule la viscosidad aparente en función de la temperatura y concentración resulta de gran utilidad, ya que esta expresión permitirá evaluar la viscosidad aparente a diferente

temperatura y concentración. Magerramov *et al.*, 2007; Belibagli y Dalgic, 2007; Juszczac *et al.*, 2010 puntualizan el siguiente modelo matemático como el más idóneo para explicar el efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre la viscosidad aparente.

$$\eta_a = \eta_0 e^{\frac{Ea}{RT} + \beta_1 C} \quad (1.25)$$

El modelo de Harper and El Sahrigi 1965 (Citado por Steffe, 1996) relaciona el efecto de estos dos factores sobre la viscosidad aparente a una velocidad fija de corte en una sola expresión.

$$\eta_a = \eta_0 e^{\frac{Ea}{RT}} C^{\beta_2} \quad (1.26)$$

1.19 Antecedentes

Solis-Mendez (2013) encontró que el suero de leche con la levadura *Kluyveromyces marxianus* tiene un comportamiento no-Newtoniano con características dilatantes, con un ajuste del modelo *Ostwald-de Waele* del 0.97%.

Callejas *et al.*, (2012) removieron un 84% de la DQO total del suero de leche por medio del proceso de electrocoagulación y recuperaron el 87% del fosforo total de la fase líquida contenido en el suero de leche.

Murari *et al.*, (2012) concluyeron que la levadura *Kluyveromyces marxianus* 229 tuvo una mejor producción de etanol en fase anaerobia a las 12 horas de fermentación, el equivalente de etanol producido en fase aerobia con 48 horas de fermentación.

Vaz *et al.*, (2012) realizaron cultivos de *Kluyveromyces marxianus* en suero de leche dulce de bovino en diferentes diluciones y determinaron que el porcentaje del consumo total de lactosa es el mismo al final del proceso.

Escobar *et al.*, (2010) obtuvieron una producción de ácido láctico de 70.93 g/L a las 93 h de fermentación utilizando *Lactobacillus casei*.

Plessas *et al.*, (2007) encontraron que un cultivo mixto de *Kluyveromyces marxianus* y *Lactobacillus bulgaricus* o *Lactobacillus hevelticus* puede utilizarse con éxito para mejorar la producción de ácido láctico en suero de leche.

Jakymec *et al.*, (2001) obtuvieron un rendimiento máximo del 10.3% de ácido láctico en suero de leche desproteinizado sin suplementar lactosa utilizando la bacteria *Lactobacillus bulgaris*. Observando también que la producción de ácido láctico origina una disminución de pH en el medio, este bajo pH afecta el crecimiento, el consumo y la misma producción, lo que explica el comportamiento del *Lactobacillus bulgaris* durante la fermentación.

Cantú-Lozano (1982) realizó fermentaciones con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol, determinando la viscosidad relativa con los modelos de Einstein y de Vand en función de la fracción volumétrica, correlacionándola la viscosidad relativa con el tiempo de fermentación.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODO

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de la muestra

El suero de leche utilizado en el desarrollo del proyecto fue proporcionado por la cremería Plauchú S.A de C.V, ubicada en la ciudad de Mendoza, Veracruz.

2.2 Caracterización química del suero de leche

Se caracterizó fisicoquímicamente el suero de leche con el objetivo de definir su composición, para ello se evaluaron los siguientes parámetros en base húmeda:

- pH: El pH de las muestras fue determinado inmediatamente después a su obtención con un pH-metro Jenway modelo 3310.
- Densidad: La densidad de las muestras de suero de leche fue determinada con un densímetro digital Anton Para modelo DMA-4500.
- DQO_T: La demanda química de oxígeno total se determinó bajo la norma mexicana NMX-AA-030-SCFI-2001.
- DQO_S: Para determinar la demanda química de oxígeno soluble se centrifugo la muestra de suero de leche a 3500 rpm por 10 minutos. Posteriormente se trabajó con sobrenadante determinándole la demanda química de oxígeno bajo la norma mexicana NMX-AA-030-SCFI-2001.
- Sólidos Totales: Los sólidos totales presente en la muestra del suero de leche fueron determinado bajo la norma NMX-AA-034-SCFI-2001
- Sólidos volátiles: Los sólidos volátiles presente en el suero de leche fueron determinado bajo la norma NMX-AA-034-SCFI-2001.
- Nitrógeno Total: El nitrógeno total se determinó bajo el método Kjeldahl.
- Proteínas: La cantidad de proteínas se determinó mediante el factor de conversión 6.38
- Lactosa: El contenido de lactosa se determinó con el método del fenol-sulfúrico de Dubois y colaboradores 1956.

- Grasas: El contenido de grasas se determinó bajo la norma NMX-AA-005-SCFI-2000.
- Color: El color de las muestras de suero de leche se determinó por el método de colorimetría y se utilizó la Figura 2.1 para determinar el color de la muestra.

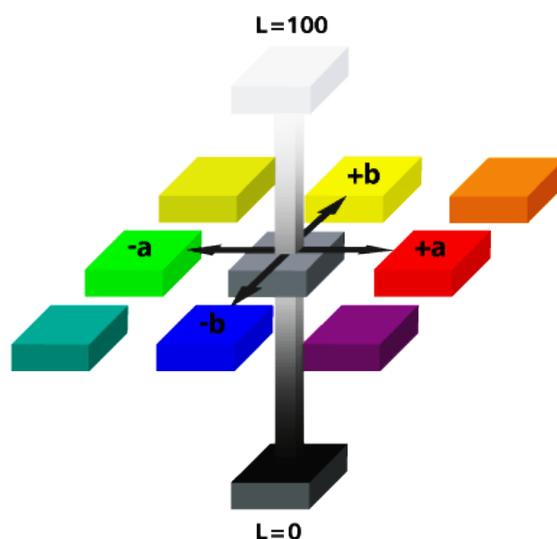


Figura 2.1 Diagrama para determinar el color de la muestra.

2.3 Caracterización reológica del suero de leche

El comportamiento reológico del suero de leche se evaluó mediante el uso de un reómetro Anton Paar modelo MCR 301, con una geometría de paletas (ST22-4V-40). Donde se determinaron los reogramas en un amplio rango de velocidad de corte de $0-1000 \text{ s}^{-1}$. Inicialmente se realizó un barrido de viscosidad en un intervalo de temperatura de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90°C . La temperatura fue ajustada a deseo mediante recirculación de agua con un baño maría Julabo modelo F25. El control de temperatura fina se realizó a través del plato Peltier.

2.4 Modelación de proteínas precipitadas

La precipitación de las proteínas en función de la temperatura se modeló siguiendo la ecuación tipo *Arrhenius* (Ec. 2.1)

$$p = p_0 e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad (2.1)$$

Donde $p[g/L]$ es la concentración de proteínas precipitadas, $p_0[g/L]$ es una constante característica, $E_a[J/gmol]$ es la energía de activación, $R[J/gmolK]$ es la constante de los gases y $T[K]$ es la temperatura absoluta.

2.5 Modelación matemática

La modelación matemática se realizó utilizando el software *Rheoplus* donde se estableció la relación esfuerzo de corte y velocidad de corte, definiendo su comportamiento fenomenológico con respecto al modelo reológico de *Herschel-Bulkley* (Ec. 2.2).

$$\tau = \tau_0 + k \dot{\gamma}^n \quad (2.2)$$

Donde $\tau[Pa]$ es el esfuerzo de corte, $\tau_0[Pa]$ es el esfuerzo de corte inicial, $k[Pa s^n]$ es el coeficiente de consistencia, $\dot{\gamma}[s^{-1}]$ es la velocidad de corte y $n[-]$ es el índice de comportamiento reológico.

2.6 Efecto de la temperatura sobre la viscosidad del suero de leche

La dependencia de la viscosidad aparente con respecto a la temperatura se llevó a cabo graficando el logaritmo natural de la viscosidad aparente a una velocidad fija de corte de $500 s^{-1}$ contra el inverso de la temperatura absoluta y se expresó mediante modelo tipo exponencial de *Arrhenius* (Ec. 2.3) y por medio de la ecuación propuesta por Kosmerl *et al.*, 2000 (Ec. 2.4), las cuales considera el flujo de fluidos como un proceso térmico donde las moléculas del fluido deben de ganar energía para desplazarse a un sitio adyacente.

La energía de activación de flujo de la ecuación 2.3 fue calculada como la pendiente de la gráfica multiplicada por la constante de los gases.

$$\eta_a = \eta_0 e^{\left(\frac{Ea}{RT}\right)} \quad (2.3)$$

$$\ln \eta_a = \ln \eta_0 + \frac{b}{T} + \frac{c}{T^2} \quad (2.4)$$

Donde η_0 [Pas] es la viscosidad en reposo, Ea [J / gmol] es la energía de activación, R [J / gmolK] es la constante de los gases, b y c son coeficientes característicos y T [K] es temperatura absoluta.

2.7 Efecto de la concentración sobre la viscosidad del suero de leche

El efecto de la concentración sobre la viscosidad aparente del suero de leche se describió por medio de dos ecuaciones, una tipo potencia (Ec. 2.5) y otra de tipo exponencial (2.6). La correlación entre la viscosidad aparente y la concentración se determinó representando los valores de viscosidad aparente a una velocidad de corte específica de 500 s^{-1} . Las muestras del suero de leche fueron preparadas con una concentración de sólidos totales de 17, 34, 50 y 65 g/L.

$$\eta_a = \eta_0 C^{a_1} \quad (2.5)$$

$$\eta_a = \eta_0 e^{a_2 C} \quad (2.6)$$

2.8 Efecto combinado de la temperatura y velocidad de corte sobre la viscosidad del suero de leche

El efecto combinado de la velocidad de corte y la temperatura se modeló bajo la ecuación propuesta por Harper and El Sahringi, 1965 (Ec. 2.7) (Citado por Vitali y Rao, 1984). Este modelo es útil en aplicaciones tal como la pasteurización. Los factores fueron evaluados en tres niveles: Temperatura (25, 50 y 90°C), velocidad de corte (300, 500 y 1000 s^{-1}).

$$\eta_a = \eta_0 e^{\left(\frac{Ea}{RT}\right)} \bar{n}^{-1} \quad (2.7)$$

donde: \bar{n} índice de comportamiento reológico promedio basados en todas las temperaturas dentro del intervalo estudiado (20 a 90°C)

2.9 Efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre la viscosidad del suero de leche

Se desarrolló un diseño de experimentos 3^k para evaluar el efecto combinado de la temperatura y la concentración de sólidos, con la finalidad de determinar que factor influye significativamente en la viscosidad aparente del suero de leche. Los factores se evaluaron en 3 niveles (bajo, medio y alto) donde la variable dependiente es la viscosidad aparente. Se realizaron 9 experimentos con su réplica dando un total de 18 experimentos. Los datos obtenidos experimentalmente fueron analizados estadísticamente en el software NCSS 2007. La matriz del diseño de experimento se presenta en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Matriz del diseño de experimento 3^k

Factores codificados			Niveles del factor			
Corrida	A	B		Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
1	-1	-1	A: Temperatura	20	45	90
2	0	-1	[°C]			
3	1	-1	B: Concentración	15.17	30.14	60.44
4	-1	0	[g/L]			
5	0	0				
6	1	0				
7	-1	1				
8	0	1				
9	1	1				

El efecto combinado de la temperatura y la concentración se expresó mediante el modelo reológico (Ec. 2.8) ampliamente utilizado por autores como: Magerramov *et al.*, 2007; Belibagli y Dalgic, 2007; Juszczack *et al.*, 2010. Por medio de este

modelo se encontró los parámetros reológicos propios del suero de leche como: viscosidad aparente en reposo y energía de activación de flujo, en función de la temperatura y la concentración.

$$\eta_a = \eta_0 e^{\frac{Ea}{RT} + \beta_1 C} \quad (2.8)$$

2.10 Efecto de la concentración sobre la energía de activación

La variación de la energía de activación con respecto a la concentración se modeló usando dos funciones una tipo exponencial (Ec. 2.9) y otra del tipo potencia (Ec. 2.10) (Kaya y Sözer, 2005; Brousse *et al.*, 2010).

$$Ea = A_1 e^{b_1 C} \quad (2.9)$$

$$Ea = A_2 C^{b_2} \quad (2.10)$$

donde A_1 , A_2 , b_1 y b_2 son constantes de proporcionalidad.

2.11 Medio sintético de conservación de *Kluyveromyces marxianus*

Se preparó el medio de cultivo YPDA con las siguientes componentes:

- Extracto de levadura 1%
- Peptona de caseína 2%
- Dextrosa 2%
- Agar 2%

El medio se realizó con agua destilada. Se esterilizó a 105°C en autoclave (Yamato SM 300) por 15 minutos se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se vertió en cajas Petri, realizando un sembrado por estriado. Para el crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus* se utilizó una estufa a

una temperatura 30°C por cuatros días hasta que se observó un crecimiento considerable como se muestra en la Figura 2.2.



Figura 2.2 Crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

2.12 Desproteinización del suero de leche

La desproteinización del suero de leche se llevó a cabo mediante un tratamiento termoquímico, el cual consistió en ajustar el pH a 4.5 con HCl 10N y posteriormente esterilizarlo en un autoclave (Yamato SM 300) a 115 °C durante 15 minutos. Luego se enfrió durante 24 horas, posteriormente se decantó para remover las proteínas precipitadas y se filtró en papel filtro Whatman N° 40. Posteriormente se ajustó el pH a un valor de 6.5 con NaOH 10N y esterilizó nuevamente en un autoclave a 115°C durante 15 minutos.

2.13 Preparación del inóculo

Se tomaron tres asadas de la caja Petri en las que se encuentra la levadura y se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contiene 100 mL del medio sintético YPD, se dejó incubar por 12 horas con agitación constante a una temperatura de 30°C. Transcurridas las 12 horas se realizó un pase al preinóculo

tomando 10 mL de la suspensión de levaduras y sembrándolo en un matraz Erlenmeyer que contiene 90 mL de suero de leche previamente termodesnaturalizado, filtrado y con un pH de 6.5. Posteriormente el preinóculo se incubó a 30°C durante 16 horas, para garantizar la fase logarítmica de crecimiento.

2.14 Conteo de células en la cámara de Neubauer

Para la inoculación se realizó el conteo celular, el cual se llevó a cabo mediante el empleo de la cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer cuenta con una cuadrilla que tiene un volumen total de 1 mm³. Esta sección se encuentra dividida en 25 cuadrados de 0.4 mm² cada uno, como se observa en la Figura 2.3.

El conteo con la cámara se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Limpiar la cámara de Neubauer con un paño y alcohol. Colocar un cubreobjetos sobre la cuadrícula de conteo.
- Con una pipeta Pasteur tomar la solución a evaluar dejando que esta suba por capilaridad en la pipeta Pasteur. Colocar la punta de la pipeta Pasteur en el borde del cubreobjetos para que la solución ingrese a la cámara por capilaridad.
- Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y enfocar con el objetivo de 10X. Localizar el cuadro a contar, hacer un cambio de lente al objetivo de 40X y contar las células.

Se contó las células contenidas en cinco cuadros (cuadros números 3 de la imagen 2.3) de acuerdo con el siguiente criterio:

- Contar todas levaduras que están dentro de cada cuadro mediano y aquellas que están tocando el límite superior y el límite izquierdo de dicho cuadro, aunque estén parcialmente fuera. No se contabilizan aquellas células que tocan el límite inferior o el límite derecho.

Para determinar el número de células contadas se hace uso de la ecuación 2.11.

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{TotalCel. contadas})(\text{Dilución})}{\text{Cuadroscontados}} \times 250000 \quad (2.11)$$

2.15 Cálculo del volumen para el tamaño de inóculo

Para calcular el volumen de la suspensión de levaduras que se debe inocular para tener una concentración específica de levaduras/mL se utilizó la ecuación 2.12. El conteo de solución de levaduras se obtiene mediante la cámara de Neubauer.

$$\text{vol. del inóculo} = \frac{(C_2)(V_2)}{(C_1)} \quad (2.12)$$

donde $V_2[mL]$ es volumen del medio a propagar, $C_2[Cél / mL]$ es el tamaño de inóculo que se desea y $C_1[Cél / mL]$: es la concentración de la solución de la que se obtiene mediante el conteo por la cámara de Neubauer.

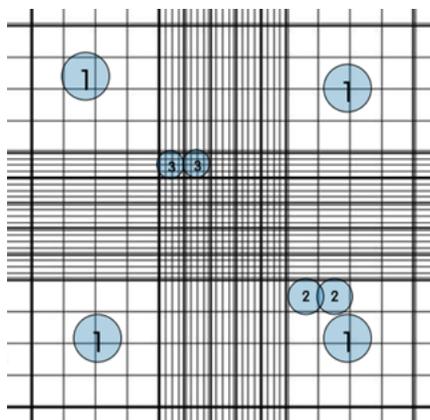


Figura 2.3 Cámara de Neubauer

2.16 Viabilidad celular

La viabilidad de las levaduras se llevó a cabo mediante tinción y el conteo al microscopio. La solución a contar se preparó en una relación 1:1 con azul de metileno y la suspensión de levaduras, después de la tinción se dejó 10 minutos en reposo. Posteriormente se realizó la metodología explicada en el punto 2.7.

El azul de metileno permite teñir el interior celular. Tiñe microorganismo procarióticos (vivos o muertos). Los microorganismos eucarióticos sólo se tiñen si están muertos. Por lo anterior, se determinó como células vivas a todas aquellas que no presentaron coloración, mientras que las células muertas mostraron una coloración azul. Esta coloración en las células de levaduras se puede atribuir a dos razones: que la membrana de las células muertas se debilite, permitiendo que el azul de metileno penetre a la célula, a diferencia de las células vivas, las cuales conservan la permeabilidad de su membrana; o a que siendo el azul de metileno un colorante de óxido-reducción, sea reducido por una enzima hidrogenasa y este se vuelva incoloro en su forma reducido.

El porcentaje de viabilidad permite fijar con precisión la tasa de inoculación y el estado fisiológico en que se encuentran las levaduras. La fórmula para calcular el % de viabilidad está dada por la ecuación 2.13

$$\%V = \frac{N_{Cv}}{N_T} \times 100 \quad (2.13)$$

donde N_{Cv} es el número de células que no presentaron coloración (Vivas), N_T : Es el total de células contadas (vivas y muertas). Se recomienda inocular células con una viabilidad mayor o igual al 90%

2.17 Densidad Óptica

La densidad óptica se midió a cada una de las muestras tomadas del caldo de fermentación a una longitud de onda de 610 nm, utilizando como blanco suero de leche desproteinizado.

2.18 Determinación de Lactosa

El contenido y consumo de lactosa se determinó utilizando el método espectrofotométrico de Dubois y colaboradores 1956.

2.19 Determinación de ácido láctico

La cuantificación de la producción del ácido láctico se realizó mediante el método 16.023 de la A.O.A.C (1984), basado en la titulación con NaOH 0.1 N. y se confirmó mediante el método del cloruro férrico. La fundamentación del método se basa en el complejo formado por la reacción entre los iones férricos y la α -hidroxiácido de color amarillo, donde la intensidad del color es proporcional a la concentración del ácido láctico presente en la muestra. Se tomaron 10 mL de muestra a la que se le adicionó 5 mL de la solución de FeCl_3 y se completó a 50 mL con agua destilada. Se prepara un blanco con agua para calibrar el equipo y se lee la absorbancia de la muestra a 440 nm.

2.20 Determinación de biomasa

La concentración de biomasa se determinó por el método de peso seco, para lo cual se centrifugó 10 mL de muestra a 10000 rpm por 10 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con agua destilada estéril para retirar todo residuo del medio, se resuspendió la biomasa con 10 mL de agua destilada y se centrifugó nuevamente. El precipitado de biomasa lavado se secó en estufa a 95°C durante 4 horas, tiempo en que se obtuvo peso constante.

2.21 Diseño de experimentos 2^k

Se desarrolló un diseño de experimentos 2^k para evaluar las concentraciones iniciales de: sustrato, inóculo y oxígeno como factores principales y su efecto combinado entre ellos, con la finalidad de determinar que factor influye significativamente en la producción de ácido láctico. Los factores se evaluaron en 2 niveles (bajo y alto) donde la variable de respuesta es la máxima producción de ácido láctico. Se realizaron 8 experimentos con su réplica dando un total de 16 experimentos. Los datos obtenidos experimentalmente fueron analizados estadísticamente en el software NCSS 2007. La matriz del diseño de experimento se presenta en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Matriz del diseño de experimento 2^k

Corridas	Factores codificados				Niveles del factor	
	A	B	C		Bajo (-1)	Alto (1)
1	-1	-1	-1	A: Lactosa	35	50
2	1	-1	-1	[g/L]		
3	-1	1	-1	B: Inoculo	3	10
4	1	1	-1	[x10 ⁶ Cel/L]		
5	-1	-1	1	C: Oxigeno	200	500
6	1	-1	1	[mL]		
7	-1	1	1			
8	1	1	1			

2.22 Fermentación

Se realizaron ochos fermentaciones con sus réplicas correspondientes a un diseño experimental (detallado en la sección 2.23), las fermentaciones se realizaron completamente al azar. Se inoculó 0.6 y 0.9 L de suero de leche con una concentración de células iniciales de 3 y 10x⁶, con una concentración inicial de lactosa de 35 y 50 g a una temperatura de 36°C. Posteriormente se dejó fermentar por 72 horas con tomas de muestra cada 8 horas.

2.23 Determinación reológica de caldos de fermentación

La determinación reológica se llevó a cabo mediante el uso del Reómetro Anton Paar modelo MCR 301 con una geometría de paletas en un amplio rango de velocidad corte de 0-1000 s⁻¹ a una temperatura de 36°C. Se ajustó el modelo reológico de *Herschel-Bulkley* expuesto en la ecuación 2.2 a los datos experimentales.

2.24 Calculo de la producción de ácido láctico

Se determinó la producción de ácido láctico y los coeficientes de rendimiento de biomasa en el sustrato, rendimiento de ácido láctico en el sustrato, el rendimiento de ácido láctico en biomasa y la productividad (Padín y Días; 2006).

El rendimiento de biomasa en sustrato $Y_{X/S}$, se calculó dividiendo la biomasa presente al final del proceso entre el consumo de sustrato.

$$Y_{X/S} = \frac{\text{g de células de } K. \text{marxianus}}{\text{g lactosa}} \quad (2.14)$$

El coeficiente de rendimiento de ácido láctico en el sustrato $Y_{P/S}$, se calculó mediante la ecuación 2.15, donde se relaciona los gramos ácido láctico producido con los gramos de lactosa consumida.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{g de ácido láctico}}{\text{g lactosa}} \quad (2.15)$$

Para determinar el coeficiente de rendimiento de ácido láctico en biomasa $Y_{P/X}$ se utilizó la ecuación 2.16

$$Y_{P/X} = \frac{\text{g de ácido láctico}}{\text{g de células de } K. \text{marxianus}} \quad (2.16)$$

donde:

$$X = \frac{\text{g células de } K. \text{marxianus (biomasa)}}{L}, P = \frac{\text{g ácido láctico (producto)}}{L}$$

$$S = \frac{\text{g Lactosa (sustrato)}}{L}$$

La productividad \mathcal{P} de las fermentaciones se define como la relación entre la concentración de ácido láctico por unidad de tiempo por volumen de fermentación (Padín y Días; 2006).

$$\mathcal{P} = \frac{\text{Concentración de ácido láctico}}{\text{Tiempo de fermentación}} = \frac{\text{g ácido láctico}}{hL} \quad (2.17)$$

El rendimiento teórico de lactosa en ácido láctico en una fermentación láctica es de 1.04 g/L de ácido láctico de un 1g de lactosa en un proceso homofermentativo, donde se produce ácido láctico principalmente, el rendimiento teórico será el siguiente:



Peso molecular de la lactosa = 342 g/mol

Peso molecular del ácido láctico = 90g/mol

$$dS/dt = \text{Velocidad del consumo del sustrato (Lactosa)}$$

$$dP/dt = \text{Velocidad de formación de producto (ácido láctico)}$$

Factor de rendimiento

$$Y = \frac{dP/dt}{dS/dt} \quad (2.19)$$

Sabiendo que una molécula de lactosa produce 4 moléculas de ácido láctico, se calcula el rendimiento teórico:

$$Y = \frac{90 \cdot 4}{342} = 1.04 \frac{\text{g ácido láctico}}{\text{g lactosa}} \quad (2.20)$$

Para determinar la eficiencia de transformación (E), se utilizó la ecuación xxx la cual relaciona el ácido láctico obtenido y el rendimiento teórico o esperado durante la fermentación.

$$E = \frac{\text{ácido láctico obtenido}}{\text{Rendimiento teórico}} \times 100 \quad (2.21)$$

2.25 Velocidad específica de crecimiento

El crecimiento celular se expresa con frecuencia como proporcional a la cantidad de células presentes en ese instante. La constante (que solo lo es durante la fase

exponencial) es lo que se denomina velocidad específica de crecimiento (Padín y Días; 2006):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.22)$$

Donde X es la concentración celular expresado en peso seco, t es el tiempo y μ es la velocidad específica de crecimiento. Para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento se representaron los datos en escala logarítmica; la zona recta corresponde a la fase exponencial y la pendiente es el valor buscado. Durante la fase exponencial la concentración celular viene dada por:

$$X = X_0 e^{(\mu t)} \quad (2.23)$$

donde X_0 es la cantidad de células en el tiempo cero y t es el tiempo de duplicación del crecimiento celular

El tiempo de duplicación celular es el tiempo requerido para que se dupliquen las células en el cultivo:

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (2.24)$$

Este valor de tiempo de duplicación t_d [h] se aproxima al tiempo medio de vida celular, en el periodo promedio para un ciclo celular completo (Padín y Días; 2006).

Para determinar los parámetros cinéticos tales como: velocidad específica μ , velocidad específica máxima $\mu_{m\acute{a}x}$ y la constante de saturación de sustrato K_s , se utilizó la ecuación de Monod, ec. 2.25.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{K_s + S} \quad 2.25$$

donde: μ : es la velocidad específica [h^{-1}], $\mu_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ es la velocidad específica máxima [h^{-1}], S es la concentración de sustrato [gS/L], K_s es la constante de saturación de sustrato [gS/L]

Para determinar los parámetros cinéticos de Monod, se utilizó el método de Lineweaver-Burk, aplicado a la ecuación de Monod (Quintero-Ramírez, 1987).

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}} + \frac{K_s}{\mu_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}} \frac{1}{S} \quad 2.26$$

Donde la representación gráfica de Lineweaver-Burk permite identificar la constante de saturación K_s , y el crecimiento máximo $\mu_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$; el punto de intercepción con el eje de las ordenadas es el equivalente a la inversa de $\mu_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$, y con el de las abscisas es el valor de $-1/K_s$ como se observa en la Figura 2.4.

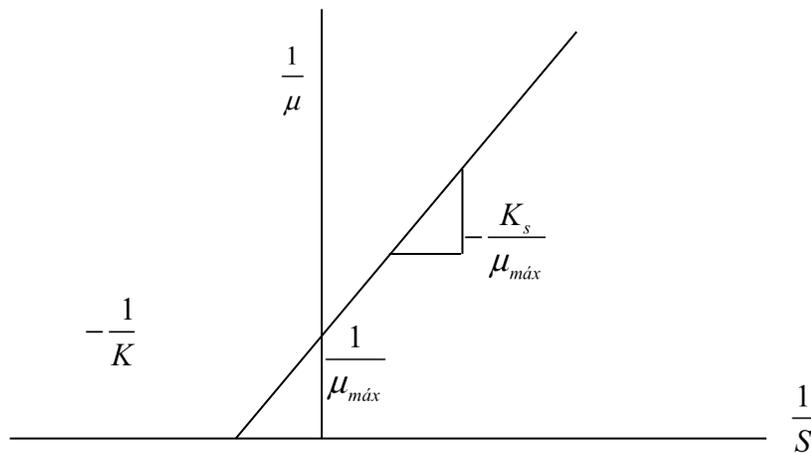


Figura 2.4 Representación gráfica del método numérico de Lineweaver-Burk

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización química del suero de leche

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados promedio obtenidos de la caracterización química, se observa que el suero de leche estudiado proviene de la coagulación de la caseína por vía enzimática a un pH mayor de 6, es decir, es un suero del tipo dulce, el cual presenta un color verde amarillento y una elevada carga orgánica de 87.66 gDQO_T/L, lo que señala el efecto negativo en el ambiente cuando este subproducto de la industria quesera es descargado en el suelo o en cuerpos receptores de agua. El 55% de los sólidos totales presente en el suero de leche es representado por la lactosa, es decir, la lactosa es el principal compuesto presente en el suero de leche, seguido por las grasas y las proteínas remanentes.

Tabla 3.1. Caracterización fisicoquímica del suero de leche

Parámetros	Promedio	Desviación estándar
pH[-]	6.55	0.1193
Densidad [g/cm ³]	1.028	2.65x10 ⁻⁵
Viscosidad [Pa s] a 500 s ⁻¹	0.01775	2.29x10 ⁻⁴
Sólidos Totales [g/L]	64.48	0.1193
Sólidos Volátiles [g/L]	62.74	0.0850
Nitrógeno Total Kjeldahl [%]	0.16	1.648x10 ⁻²
Proteínas [%]	1.016	10.51x10 ⁻²
Lactosa [g/L]	35.46	0.2861
DQO _T [g/L]	87.66	1.8027
DQO _s [g/L]	75.52	1.1369
Grasas [g/L]	3.97	0.0415
Color		
L	54.56	-
a	-0.42	-
b	9.42	-

3.2 Caracterización reológica del suero de leche

En la Figura 3.1 se observa el comportamiento no-Newtoniano del suero de leche con características dilatantes ($n > 1$). Esto significa que el esfuerzo de corte aumenta al incrementar la velocidad de corte. El aumento de la viscosidad aparente con el aumento de la velocidad de corte sugiere que la velocidad de corte enreda progresivamente las partículas de cadena larga, lo que impide eventualmente superar las resistencias intermoleculares al flujo. Según Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2003 el comportamiento dilatante se debe a la presencia de partículas de distintos tamaños y de diferentes formas que se encuentran estrechamente empaquetadas haciendo el flujo más difícil a medida que aumenta la presión, esto porque al aumentar la velocidad de corte, las partículas largas y flexibles se estiran. Por lo anterior, el comportamiento no-Newtoniano en el suero de leche se le atribuye a material con alto peso molecular (proteínas séricas) que se encuentran suspendidas en la fase acuosa formando así una solución compleja, estas partículas dispersas en la suspensión se deforman a medida que aumenta la tasa de corte, presentando así engrosamiento con incremento del esfuerzo de corte.

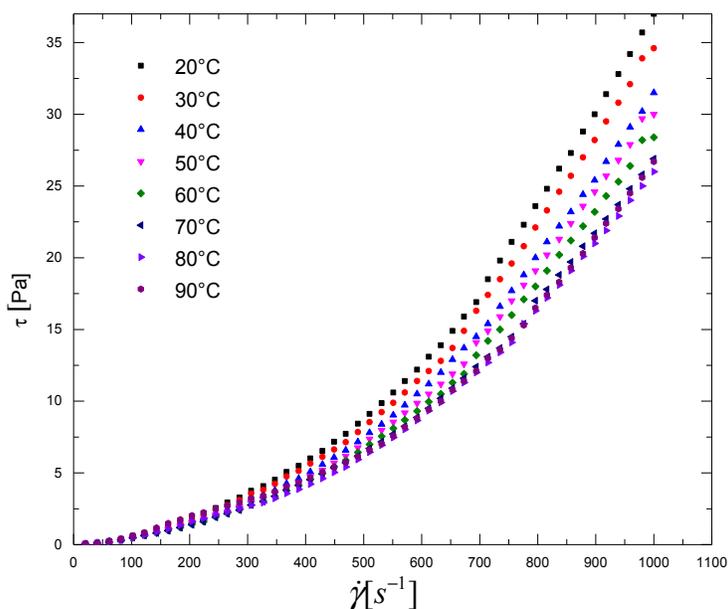


Figura 3.1 Reogramas del suero de leche

En la Figura 3.2 se observa la dependencia de la viscosidad con respecto a la temperatura. Según Bird *et al.*, 2006, la viscosidad de un líquido disminuye con el incremento de la temperatura. Lo anterior se le atribuye a que las moléculas ganan energía lo que eventualmente debilita las fuerzas de cohesión que existe entre ellas, provocando un incremento en el espacio intermolecular y como consecuencia aumenta el movimiento dentro del fluido (Arslan *et al.*, 2005; Baroutian *et al.*, 2013). Normalmente, cuanto mayor es la viscosidad, mayor es la tasa de disminución (Barnes, 2000).

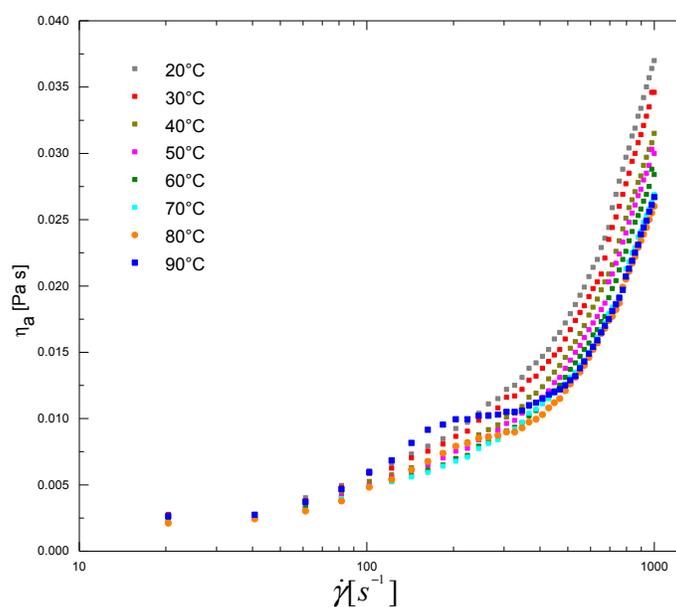


Figura 3.2 Curvas de fluidez del suero de leche

En la isoterma de 80°C de la Figura 3.2 se observa que existe un punto de inflexión haciéndose más notable en la isoterma de 90°C, donde la viscosidad incrementa repentinamente por el efecto térmico. Sağlam *et al.*, 2013 trabajando con proteínas de suero de leche aisladas, encontró que a baja velocidad de corte, a alta temperatura (70° a 90°C) la viscosidad de las proteínas tiende a aumentar. Parra-Huertas, 2009 menciona que las proteínas del suero de leche se vuelven soluciones muy viscosas al ser termodesnaturalizadas y según Alaís, 1985 a

estas temperaturas se lleva a cabo la termodesnaturalización de las proteínas remanentes presentes en el suero de leche, por todo lo anterior inferimos que las partículas que incrementan la viscosidad aparente con el aumento de la temperatura son las proteínas remanentes en el suero de leche.

El proceso de precipitación de las proteínas en función de la temperatura se modela con la ecuación tipo *Arrhenius* (Ec. 2.1). En la Figura 3.3 se observa que la precipitación de las proteínas es fuertemente dependiente de la temperatura, es decir, a mayor temperatura mayor será la cantidad de proteína precipitada. Los parámetros de la ecuación 2.1 se presentan en la Tabla 3.2 donde se observa que el modelo describe adecuadamente el proceso de precipitación de proteínas al presentar un ajuste adecuado de $R^2 = 0.85308$.

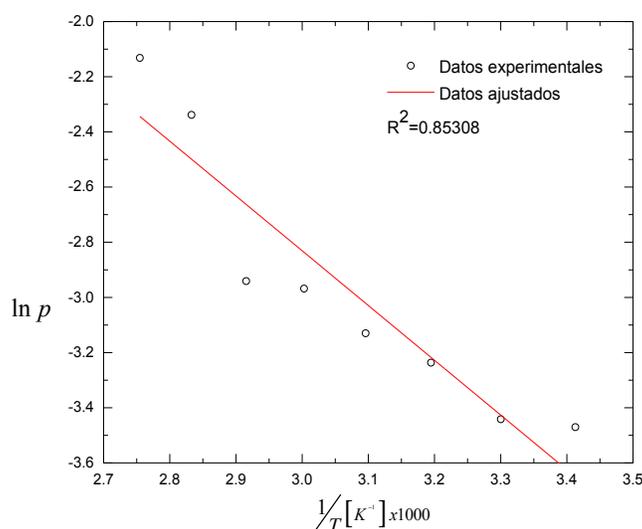


Figura 3.3 Precipitación de las proteínas del suero de leche en función de la temperatura

Tabla 3.2 Parámetros de la ecuación tipo Arrhenius

Parámetros	Valores
$p_0 [g / L]$	22.7715
$E_a [J / \text{gmol}]$	-16507.88
<i>Modelo Experimental</i>	$p = 22.7715e^{(-16507.88/RT)}$

3.3 Modelación Matemática

El modelo que mejor describió el comportamiento fenomenológico del suero de leche fue el modelo reológico de *Herschel-Bulkley* al presentar un ajuste adecuado de $R^2 > 0.98$. El valor de r calculado fue $r > 0.99$, con un valor de significancia de 0.001 el valor de crítico de r es de 0.4525 (Yamane, 1979). Como $r_{cal} > r_{critica}$ se rechaza la hipótesis estadística nula, es decir se rechaza la suposición de que no había relación estadística significativa entre la velocidad de corte y el esfuerzo de corte y se concluye que existe una relación directa significativa entre estos dos parámetros reológicos.

El parámetro de τ_0 del modelo de *Herschel-Bulkley* el cual hace evidente la presencia de sólidos solubles disueltos como: lactosa, proteínas y sales minerales. En la Tabla 3.3 se muestran los modelos obtenidos experimentalmente para cada temperatura, se observa que los valores de esfuerzo de corte inicial τ_0 , coeficiente de consistencia K y el índice de comportamiento reológico n aumentaron gradualmente hasta una temperatura de 80°C debido al efecto termodesnaturalización de las proteínas.

Tabla 3.3 Parámetros del modelo de *Herschel-Bulkley*

T [°C]	Modelo de <i>Herschel-Bulkley</i>	R^2
20	$\tau = 0.030746 + 9.9217 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.843}$	0.9884
30	$\tau = 0.036655 + 9.3253 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.843}$	0.9864
40	$\tau = 0.04637 + 7.5929 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.859}$	0.9899
50	$\tau = 0.041737 + 7.1 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.862}$	0.9859
60	$\tau = 0.048416 + 6.3756 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.870}$	0.9867
70	$\tau = 0.045944 + 7.5479 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.836}$	0.9891
80	$\tau = 0.051014 + 9.9227 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.789}$	0.9843
90	$\tau = 35.091 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.599}$	0.9651

*Valor no susceptible a medición.

A una temperatura de 90°C el parámetro de esfuerzo de corte inicial τ_0 ya no es evidente en la medición. En la Figura 3.4 se presenta el ajuste del modelo de

Herschel-Bulkley a los datos experimentales. Los datos obtenidos experimentalmente con el reómetro Anton Para MCR 301 para cada temperatura se presenta como puntos y el ajuste del modelo de *Herschel-Bulkley* como líneas continuas.

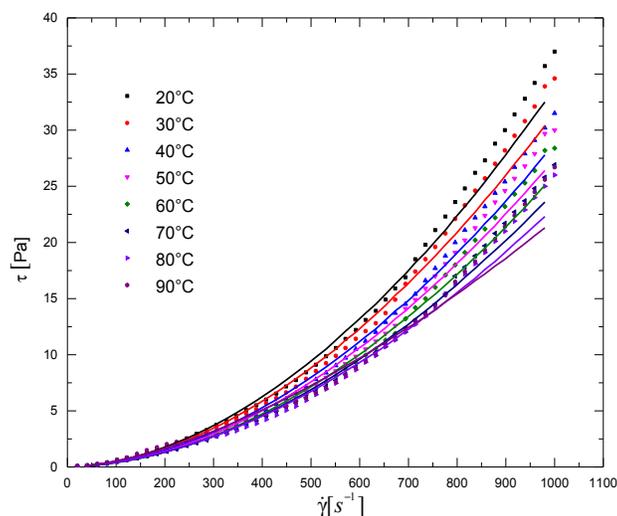


Figura 3.4 Reogramas del suero de leche, ajuste del modelo

3.4 Efecto de la temperatura sobre la viscosidad

En la Figura 3.5 se aprecia que la temperatura ejerce un efecto significativo sobre la viscosidad aparente del suero de leche, es decir, la viscosidad disminuye al aumentar la temperatura, siendo la ecuación propuesta por Kosmerl *et al.*, 2000 la que mejor describe este efecto. Los parámetros obtenidos del modelo de *Arrhenius* y de la ecuación propuesta por Kosmerl *et al.*, 2000 como viscosidad en reposo η_0 , energía de activación de flujo E_a , coeficientes de Kosmerl, 2000 (b, c), modelos experimentales y los coeficientes de correlación R^2 se presentan en la Tabla 3.4.

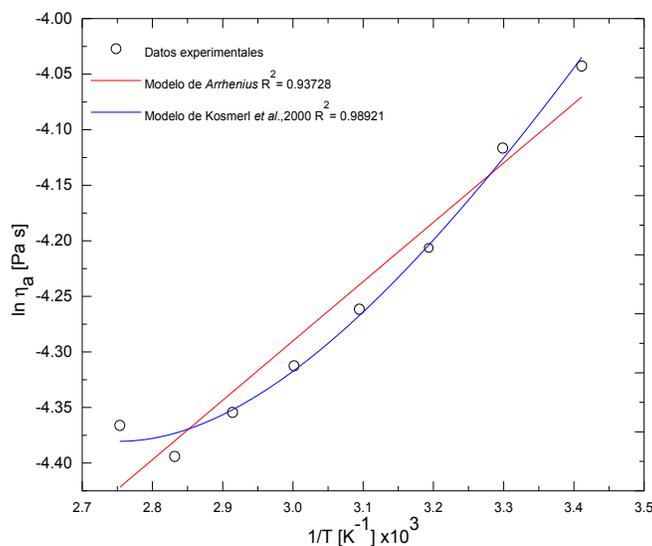


Figura 3.5 Dependencia de la viscosidad aparente respecto a la temperatura

Tabla 3.4 Parámetros de Arrhenius y la ecuación propuesta por Kosmerl, 2000

Parámetros	Modelo de Arrhenius	Ecuación propuesta por Kosmerl ,2000
$\eta_0 [Pas]$	2.7605×10^{-3}	4.89061
b	-	-51.0096
c	-	70.2470
$E_a [J / gmolK]$	4440.42	-
R^2	0.93728	0.98921
Modelo experimental	$\eta_a = 2.76059^{-3} e^{\left(\frac{4440.42}{RT}\right)}$	$\ln \eta_a = 4.89061 - 51.0096/T + 70.2470/T^2$

El bajo valor de energía de activación muestra que el suero leche tiene poca variación de viscosidad con el aumento de la temperatura, ya que los altos valores de energía de activación de flujo indican un cambio rápido de la viscosidad del fluido con la temperatura (Steffe, 1996; Guan *et al.*, 2008).

3.5 Efecto de la concentración sobre la viscosidad

La Figura 3.6 muestra la influencia de la concentración de sólidos solubles sobre la viscosidad aparente del suero de leche, esta propiedad del fluido aumenta a

medida que incrementa la concentración en el rango estudiado, según Vitali y Rao, 1984, el efecto de la concentración sobre la viscosidad aparente se debe a que al aumentar la concentración de los sólidos hay mayor interacción entre la fase dispersa y el medio continuo provocando una restricción en el movimiento de partículas. La Tabla 3.5 presenta los valores de η_0 , a_1 y a_2 observándose que el modelo que mejor representa el comportamiento reológico del suero en función de la concentración es el modelo exponencial al presentar el coeficiente de correlación más alto.

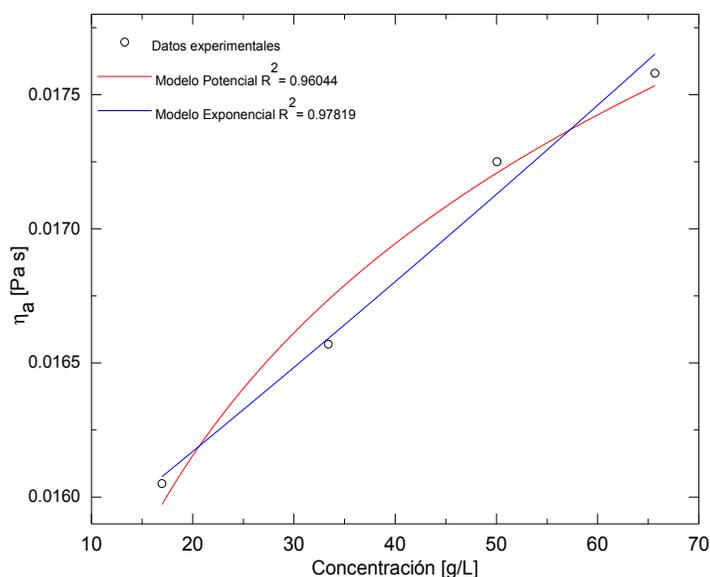


Figura 3.6 Variación de la viscosidad respecto a la concentración

El modelo potencial ha dado resultados satisfactorios en purés de frutas y hortalizas altamente viscosas, sin embargo para zumos de fruta concentrados, jugo concentrado de manzana y en nuestro caso de estudio el modelo exponencial proporciona mejores ajustes. Esto porque según Hassan y Hobani, 1998 el modelo exponencial se encontró para producir un mejor ajuste que la relación de tipo de potencia.

Tabla 3.5 Parámetros del modelo potencial y exponencial

Parámetros	Modelo potencial	Modelo exponencial
$\eta_0 [Pas]$	0.0131	0.01556
a	0.0689	0.00192
R^2	0.96044	0.97819
Modelo experimental	$\eta_a = 0.0131C^{0.0689}$	$\eta_a = 0.01556e^{0.00192C}$

3.6 Efecto combinado de la velocidad de corte y temperatura sobre la viscosidad del suero de leche

El efecto combinado de la velocidad de corte y la temperatura se expresó mediante la ecuación propuesta por Harper y Sahringi, 1965 (Citado por Steffe, 1996). La ecuación 3.1 muestra el modelo encontrado experimentalmente el cual predice adecuadamente el efecto combinado de la temperatura y la velocidad de corte al presentar un coeficiente de correlación de 0.9856 .

$$\eta_a = 6.0926^{-5} e^{\left(\frac{3223.84228}{RT}\right)^{0.7}} \quad (3.1)$$

En la ecuación 3.1 se puede observar que el suero de leche bajo todas las combinaciones de velocidad de corte y temperatura tiene un comportamiento no-Newtoniano con características dilatantes al presentar el parámetro $\bar{n} - 1 = 0.7$. En Figura 3.7 se puede observar que la viscosidad aparente del suero de leche incrementa con el aumento de la velocidad de corte y disminuye con el aumento de la temperatura, siendo la velocidad de corte el factor más significativo sobre esta propiedad del fluido.

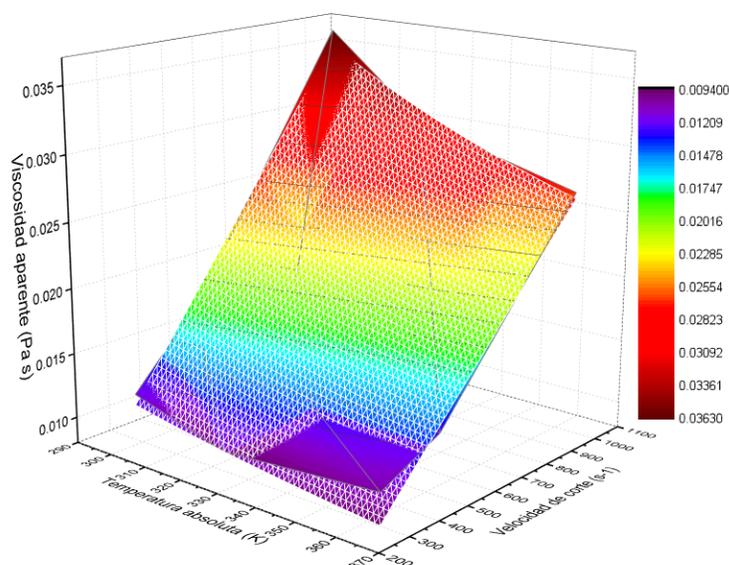


Figura 3.7 Superficie de respuesta. Efecto combinado de la temperatura-velocidad de corte

3.7 Efecto combinado de la temperatura y concentración sobre la viscosidad del suero de leche

La Tabla 3.6 presenta la matriz del diseño factorial 3^k que se siguió para evaluar el efecto combinado de la temperatura y la concentración sobre la viscosidad del suero de leche. Los resultados obtenidos experimentales de la viscosidad aparente a una velocidad de corte de 500 s^{-1} para cada tratamiento del diseño fueron tratados estadísticamente en el software NCSS 2007, obteniéndose el análisis de varianza el cual se presenta en la Tabla 3.7

Tabla 3.6 Factores y niveles utilizados en el diseño de experimentos 3^k

Corrida	Factores codificados		$\eta_a [Pa s]$ a 500 s^{-1}			Niveles del factor		
	A	B	Replica I	Replica II		Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
1	-1	-1	0.0176	0.017	A: Temperatura [°C]	20	45	90
2	0	-1	0.01445	0.0144				
3	1	-1	0.01225	0.012	B: Concentración [g/L]	15.17	30.14	60.44
4	-1	0	0.01715	0.01745				
5	0	0	0.0146	0.01465				

6	1	0	0.01235	0.0126
7	-1	1	0.01865	0.0186
8	0	1	0.0156	0.01575
9	1	1	0.0136	0.01345

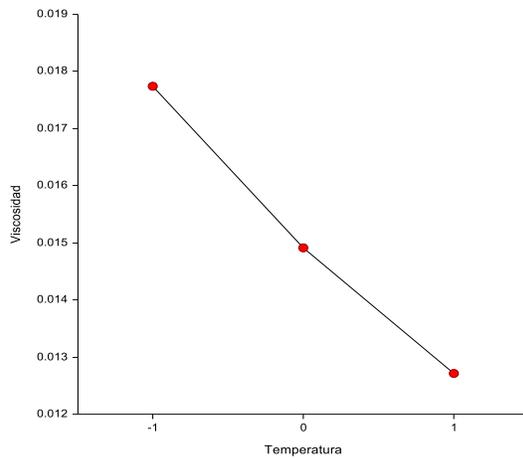
El análisis de varianza (Tabla 3.7) muestra que el factor A(Temperatura) y B(Concentración) tienen efectos significativos sobre la viscosidad, ya que muestra un valor menor de 0.05, valor fijado para el nivel de significancia ($\alpha=0.05$), siendo el factor A(Temperatura) el que tiene mayor efecto sobre la viscosidad del suero de leche, es decir, la viscosidad aparente es más sensible a la temperatura que a la concentración. De acuerdo al ANOVA la interacción entre los factores no resulta significativo dado que sus valores de significancia se encuentra por encima del nivel de significancia establecido.

Tabla 3.7 Análisis de varianza del diseño de experimento 3^k

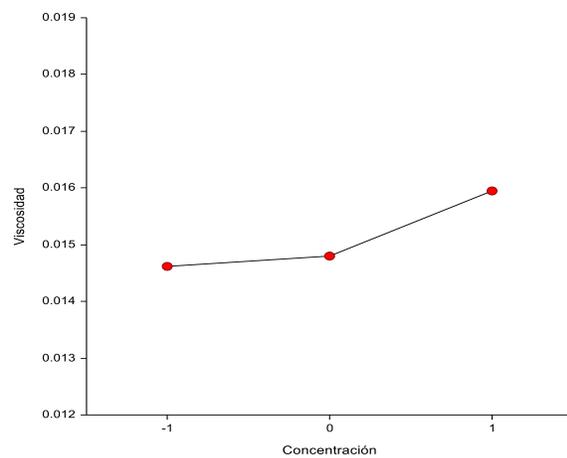
Análisis de varianza						
Factores	DF	Suma de cuadrados	Media de Cuadrados	F-Ratio	Nivel de Probabilidad	Power Alpha=0.05
A: Temperatura	2	7.640445E-05	3.820222E-05	1095.84	0.000000*	1.000000
B: Concentración	2	6.185278E-06	3.092639E-06	88.71	0.000001*	1.000000
AB	4	8.222222E-08	2.055556E-08	0.59	0.678709	0.136144
S	9	3.1375E-07	3.486111E-08			
Total (Ajustado)	17	8.298569E-05				
Total	18					

* Terminó de significancia a $\alpha = 0.05$

En la Figura 3.8 se graficaron los dos efectos principales para analizar de manera más detallada la forma en que influyen los factores evaluados.



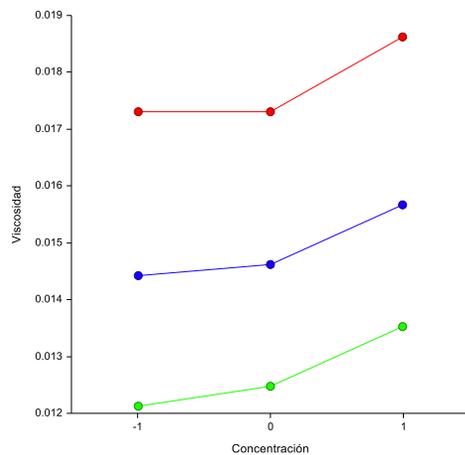
(a)



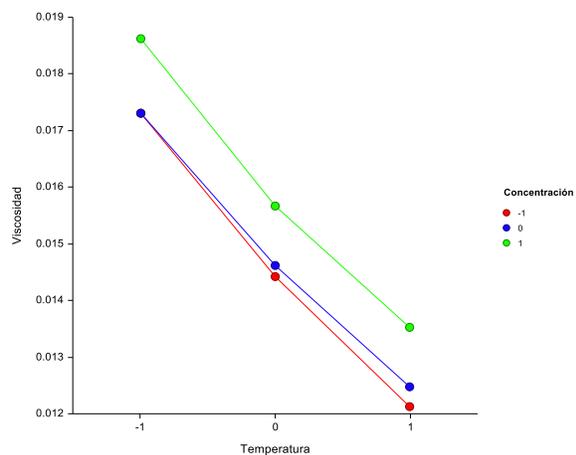
(b)

Figura 3.8 Efectos principales: a) Temperatura, b) Concentración

En la Figura 3.8a se aprecia que el efecto positivo de la temperatura disminuye la viscosidad del suero de leche mientras que el efecto positivo de la concentración (Figura 3.8b) provoca un aumento en la misma. En la Figura 3.9 se presentan las gráficas de la interacción AB donde las rectas son paralelas indicando que las interacciones no presentan efectos fuertes por lo que no influyen de manera significativa sobre la viscosidad del suero de leche.



(a)



(b)

Figura 3.9 Interacciones de los factores

El modelo estadístico para ajustar los datos se presenta en la ecuación 3.2 el cual presenta un ajuste del 0.9793 lo que indica que el modelo predice adecuadamente los datos, es decir, existe una baja variabilidad total de la variable dependiente (viscosidad aparente) respecto a su media explicada por el modelo de regresión.

$$\eta_a [Pas] = 0.015119 - 0.002517T + 0.000662C \quad (3.2)$$

La Figura 3.10 muestra la gráfica de probabilidad normal, se observa que la distribución de la variable cae dentro de la normalidad.

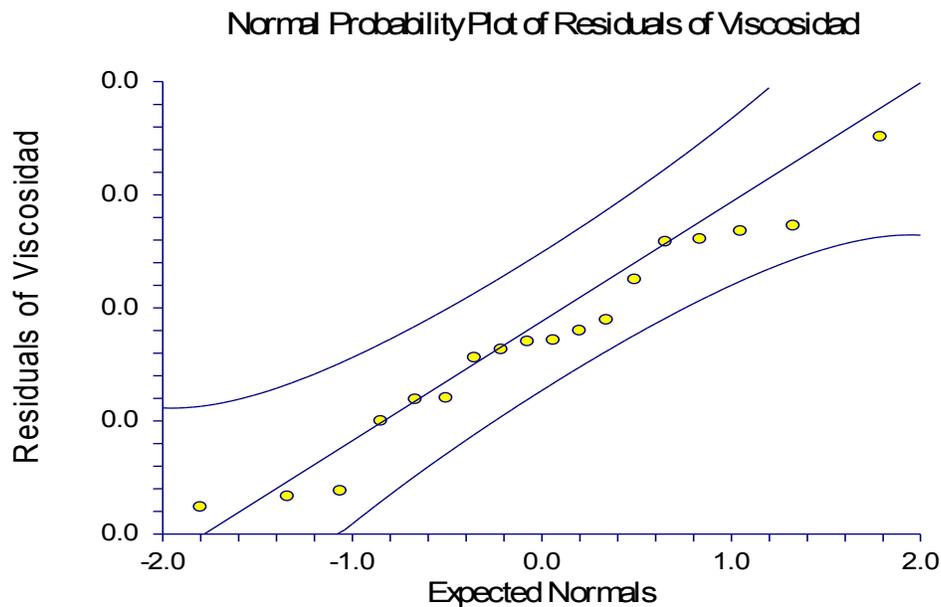


Figura 3.10 Grafica de normalidad del diseño 3^k

El efecto combinado de la temperatura y la concentración se expresó mediante el modelo reológico (Ec. 2.8) ampliamente utilizados por autores como: Garza e Ibarz, 1998; Magerramov *et al.*, 2007; Belibagli y Dalgic, 2007; Juszczack *et al.*, 2010, quienes puntualizan el modelo como el más idóneo para explicar el efecto combinado de estos dos factores. La ecuación 3.3 es el modelo que se encontró experimentalmente el cual permitirá evaluar adecuadamente la viscosidad

aparente a diferente temperatura y concentración ya que presenta un coeficiente de correlación de 0.97196 .

$$\eta_a = 0.00285e^{\left(\frac{4262.108}{RT}\right)+0.00197C} \quad (3.3)$$

La Figura 3.11 presenta la superficie de respuesta con la ecuación 2.8 donde se puede observar que el incremento de la concentración y la disminución de la temperatura incrementan la viscosidad, mismo efecto que encontró Cepeda y Villarán, 1999 trabajando con jugo de Malus Floribunda.

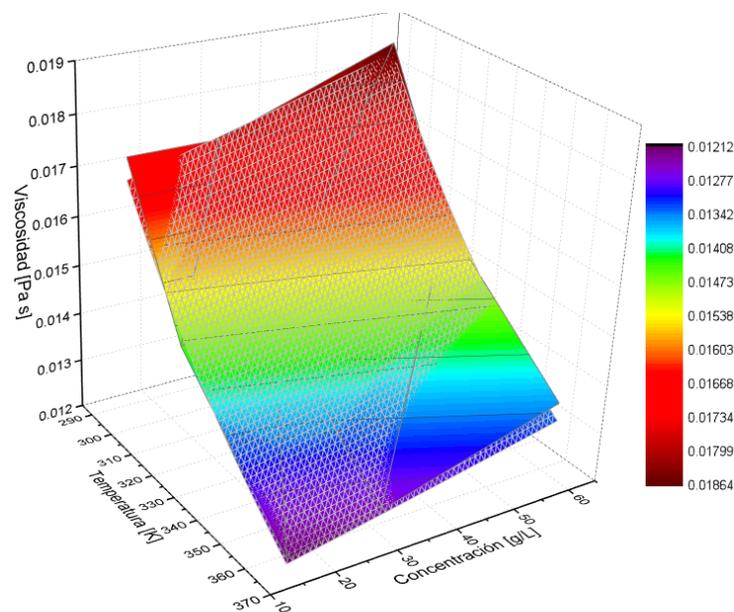


Figura 3.11 Superficie de respuesta. Efecto combinado de la temperatura y concentración

3.8 Efecto de la concentración sobre la energía de activación

La Figura 3.12 muestra la relación directa que existe entre la concentración y la energía de activación, se puede observar que a medida que aumenta la concentración disminuye la energía de activación, esto confirma que a mayor

concentración la temperatura ejerce menor influencia sobre la viscosidad aparente del suero de leche, esto se debe a que al aumentar la concentración se incrementa el número de colisiones de las partículas dentro del fluido, lo que eleva el movimiento en el fluido. Los valores de E_a fueron encontrados entre 4505.94 y 3867.74 J/g mol. El valor calculado de E_a a baja concentración fue el más alto lo que indica que la viscosidad aparente es más afectada por la temperatura a baja concentración, es decir, la energía de activación disminuyó con el aumento de la de concentración, esto se debe a que existe poca variabilidad de la viscosidad a niveles altos de concentración.

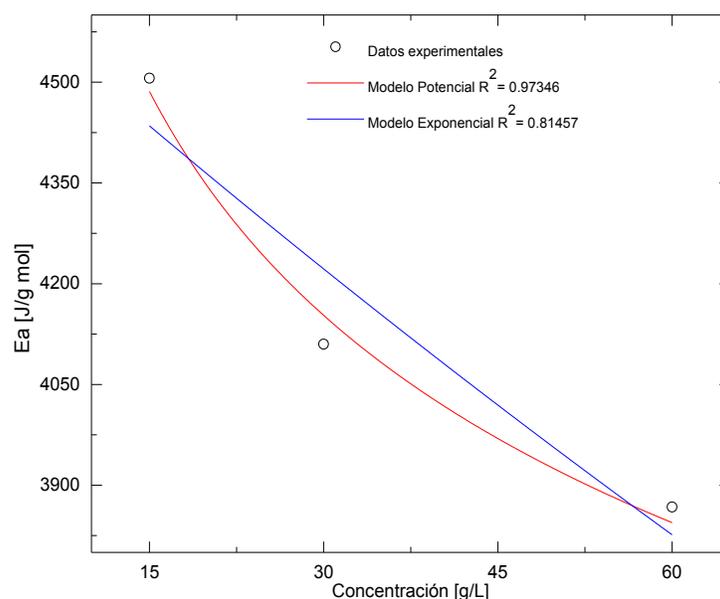


Figura 3.12 Efecto de la concentración sobre la energía de activación

En la Tabla 3.8 se presentan los parámetros encontrados de la ecuación 2.9 y 2.10, siendo el modelo potencial el que mejor describe la relación que existe entre la concentración y la energía de activación de flujo.

Tabla 3.8 Efecto de la concentración sobre la energía de activación

Parámetros	Modelo potencial	Modelo exponencial
A_1	6065.20	-
A_2	-	4658.57
b_1	-0.11136	-
b_2	-	-0.00328
R^2	0.97346	0.81457

Finalmente, el obtener un modelo reológico que calcule la viscosidad aparente en función de la velocidad de corte, temperatura y concentración es una herramienta de gran utilidad para aplicaciones de ingeniería posteriores. El efecto combinado de estos tres factores se expresó mediante la ecuación 3.4.

$$\eta_a = \eta_0 e^{\left(\frac{Ea}{RT}\right)} C^d \dot{\gamma}^{\bar{n}-1} \quad (3.4)$$

Donde $\eta_a [Pas]$ es la viscosidad aparente, $\eta_0 [Pas]$ es la viscosidad en reposo, $Ea [J / gmol]$ es la energía de activación, $R [J / gmolK]$ es la constante de los gases, $T [K]$ es la temperatura absoluta, $C [g / L]$ es la concentración, d es una constante, $\dot{\gamma} [s^{-1}]$ es la velocidad de corte, $\bar{n} [-]$ es el índice de comportamiento promedio basado en todas las temperaturas.

El efecto de la temperatura, concentración y velocidad de corte sobre la viscosidad aparente se describe adecuadamente con la ecuación 3.4 al presentar un coeficiente de correlación de 0.99415 . Este modelo puede ser una herramienta útil en el diseño de procesos y control, así como el control de calidad y evaluación sensorial.

$$\eta_a = 0.0051e^{\left(\frac{31.0601}{RT}\right)} C^{0.0432} \rho^{0.7055} \quad (3.5)$$

3.9 Diseño factorial 2³ para la evaluación de factores en las fermentaciones lácticas

Se siguió un diseño de experimentos tipo factorial 2^k con el que se observó las interacciones entre los factores involucrados que más afectan en la producción de ácido láctico con la levadura *Kluyveromyces marxianus* en suero de leche. Los factores evaluados fueron las concentraciones iniciales de sustrato (lactosa), inóculo y oxígeno. En el desarrollo del diseño de experimento se efectuaron 8 fermentaciones con una réplica, haciendo un total de 16 fermentaciones realizadas en forma aleatoria. En la Tabla 3.9 se presenta la matriz de diseño y se muestran los resultados de cada fermentación.

Tabla 3.9 Factores y niveles utilizados en el diseño de experimentos 2^k

Corridas	Factores codificados			Ácido láctico [g/L]			Niveles del factor	
	A	B	C	Replica I	Replica II		Bajo (-1)	Alto (1)
1	-1	-1	-1	3.7	4.65	A: Lactosa [g/L]	35	50
2	1	-1	-1	7.53	6.84			
3	-1	1	-1	3.08	3.12	B: Inóculo [x10 ⁶ Cel/L]	3	10
4	1	1	-1	3.49	3.52			
5	-1	-1	1	5.07	5.28	C: Oxígeno [mL]	200	500
6	1	-1	1	8.18	8.52			
7	-1	1	1	2.44	2.65			
8	1	1	1	3.07	2.96			

Como variable de respuesta se midió la concentración de ácido láctico observándose con una concentración inicial de 50g/L de lactosa una respuesta máxima de producción de 8.52 g/L de ácido láctico. Plessas *et al.*, 2008 trabajando con suero de leche con una concentración inicial de 50-52 g/L de

lactosa encontraron como respuesta máxima 8.8 g/L de ácido láctico utilizando la *Kluyveromyces marxianus*.

Los resultados de la Tabla 3.9 fueron analizados estadísticamente mediante el software NCSS 2007 obteniéndose el análisis de varianza que se muestra en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Análisis de varianza del diseño factorial 2^k

Análisis de varianza						
Factores	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F-Ratio	Nivel de probabilidad	Power Alpha=0.05
A: Lactosa	1	12.28502	12.28502	112.64	0.000005*	1.000000
B: Inóculo	1	40.13223	40.13223	367.97	0.000000*	1.000000
AB	1	6.9169	6.9169	63.42	0.000045*	0.999999
C: Oxígeno	1	0.342225	0.342225	3.24	0.114441	0.345166
AC	1	0.0196	0.0196	0.18	0.682788	0.066310
BC	1	2.6569	2.6569	24.36	0.001141*	0.0989983
ABC	1	0.005625	0.005625	0.05	0.826039	0.054653
S	8	0.08725	0.01090625			
Total (Adjusted)	15	63.231				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

En el análisis de varianza que se presenta en la Tabla 3.10 se observa que solo dos factores principales influyen en la producción de ácido láctico siendo la concentración inicial de lactosa y del inóculo junto con sus interacciones los más significativos.

La Figura 3.13 se graficaron los factores principales para analizar de forma más detallada la manera en que influyen estos factores en la producción de ácido láctico. Se puede apreciar que la concentración de lactosa (Figura 3.13a) presenta un efecto principal positivo, es decir, un aumento en la concentración de lactosa desplaza hacia arriba la producción de ácido láctico; mientras que el tamaño de inóculo de *Kluyveromyces marxianus* (Figura 3.13 b) presenta un efecto principal negativo, donde una disminución en esta variable provoca un aumento en la producción de ácido láctico. Por otro lado al ver la Figura 3.12c se observa que

para los valores propuesto en la concentración de oxígeno no es muy significativo ya que presenta muy poca variabilidad en la producción de ácido láctico.

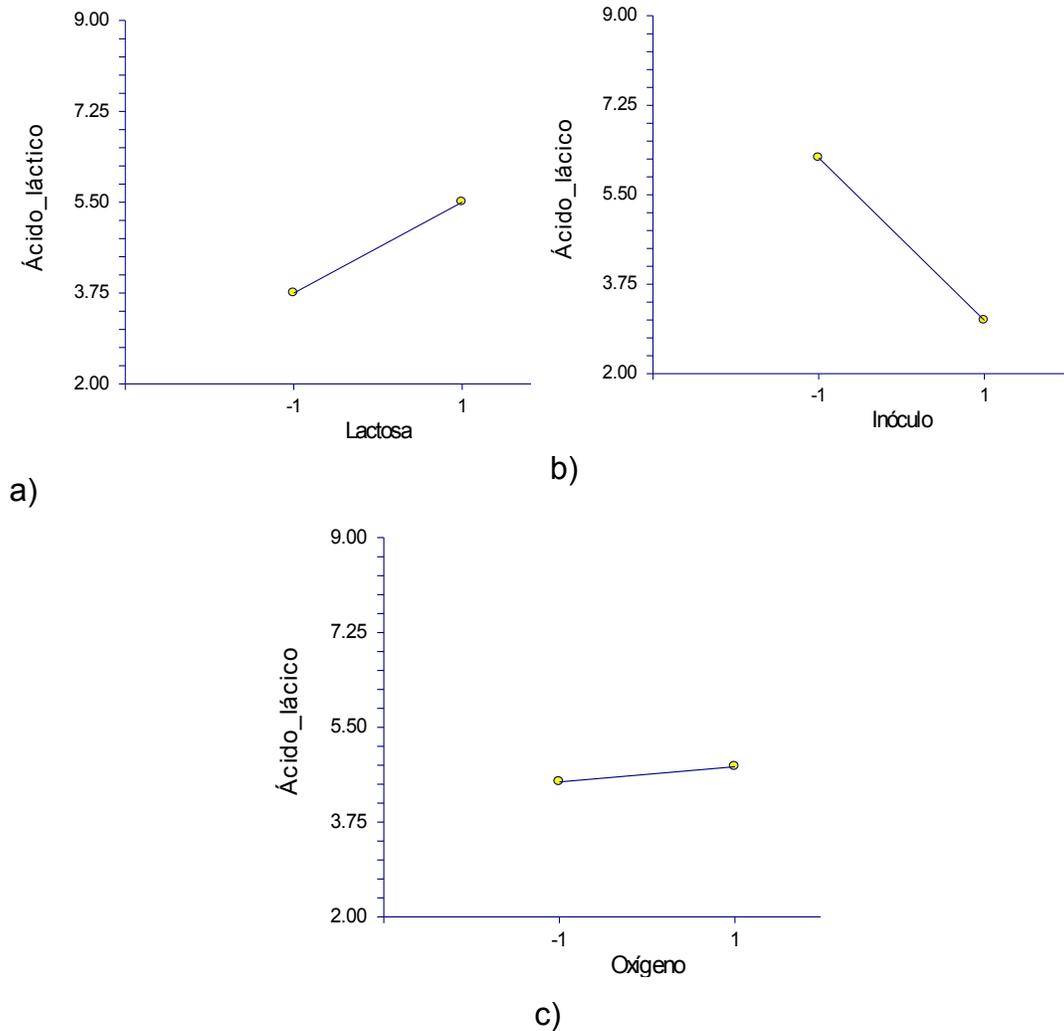
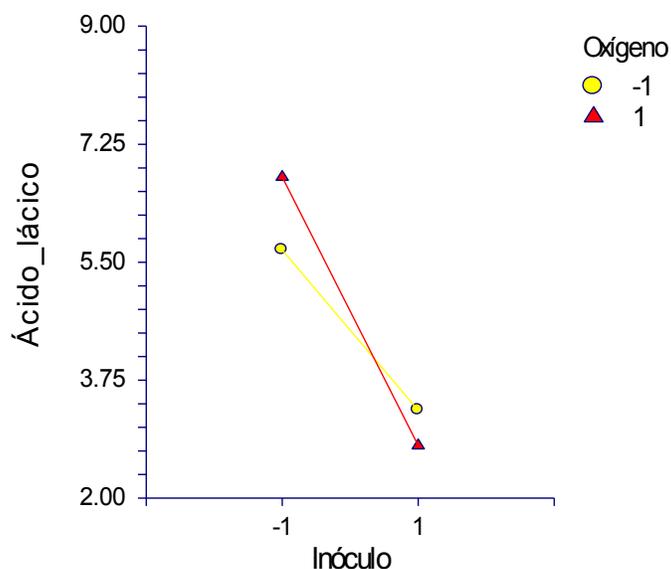


Figura 3.13 Efectos principales del diseño 2^k . a) Lactosa, b) Inóculo y c) Oxígeno

En la Figura 3.14 se presenta la gráfica de la interacción BC donde las líneas rectas no son paralelas, lo que indica una interacción fuerte entre la concentración inicial del inóculo y el oxígeno. El mejor resultado se obtiene al combinar B (concentración inicial de inóculo) en el nivel más bajo y C (concentración inicial de oxígeno) en el nivel alto, el resto de las interacciones no presentan efectos fuertes por lo que no influyen de manera significativa en la producción de ácido láctico.

3.14 Interacción significativa del diseño 2^k

Esta fuerte interacción existe debido a que se necesita una concentración inicial considerable de oxígeno para que la biomasa comience a crecer. Padín y Díaz, 2006 menciona que si las condiciones anaerobias comienzan pronto (nivel bajo) la densidad de la población de levaduras no será lo suficientemente alta para obtener un mayor rendimiento.

3.10 Análisis de regresión en función de la concentración inicial de lactosa, inóculo y oxígeno

Empleando el software estadístico NCSS 2007, se realizó un análisis de regresión, con el fin de obtener el polinomio que mejor representa la producción de ácido láctico en función de los factores evaluados. La Figura 3.15 muestra la gráfica de probabilidad normal, la cual es utilizada para contrastar la normalidad de un conjunto de datos ya que permite comparar la distribución empírica de una muestra de datos, con la distribución normal. Como se observa la distribución de la variable cae dentro de la normalidad, es decir, los puntos se encuentran cerca de la línea recta.

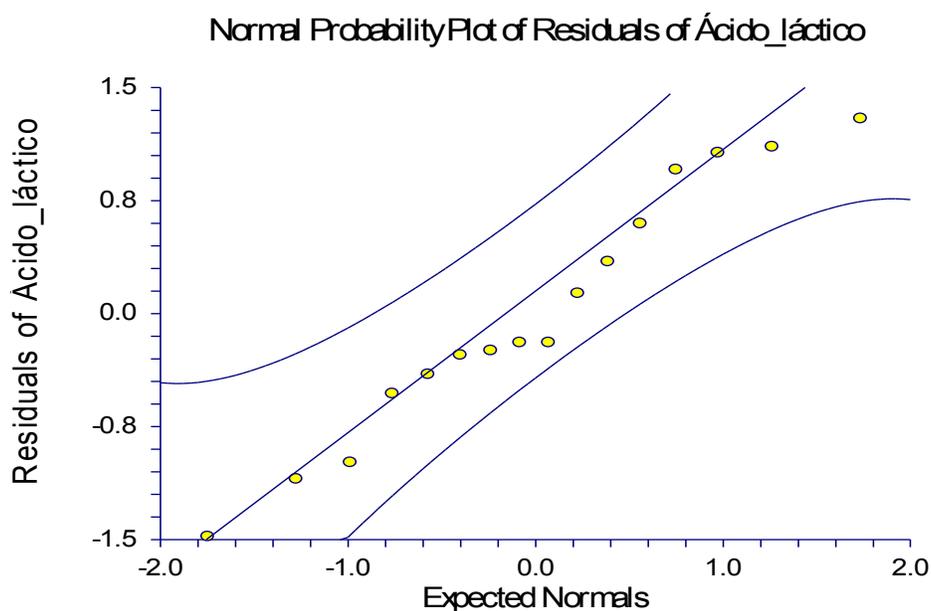


Figura 3.15 Grafica de normalidad del diseño factorial 2^k

El modelo de regresión obtenido se presenta en la ecuación 3.5 el cual tiene un ajuste del 0.8344 .

$$\text{ÁcidoLáctico} = 4.625 - 1.58375 * \text{Inóculo} + 0.87625 * \text{Lactosa} + 0.14625 * \text{Oxígeno} \quad (3.5)$$

El modelo presenta una variabilidad del 0.1656 de la variable dependiente (ácido láctico) respecto a la media explicada por el modelo de regresión. Los signos positivo de los coeficientes (lactosa y oxígeno) de la ecuación 3.5 indica que se obtiene una mayor concentración de ácido láctico a nivel alto de lactosa y el signo negativo del coeficiente (inóculo) indica que niveles bajo aumenta la producción de ácido láctico.

3.11 Cinéticas de crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

En la Figura 3.16 se presenta el consumo de lactosa y la producción de ácido láctico para todos los tratamientos en nivel bajo de sustrato. Se puede observar que en todos los tratamientos el consumo de lactosa a través del tiempo tuvo la misma tendencia, variando entre el 68, 56, 51 y el 62% el consumo de sustrato para una concentración inicial de lactosa de 35g/L. La mayor producción de ácido láctico se llevo a cabo en los experimentos con el nivel bajo de inóculo (3×10^6 cél/mL).

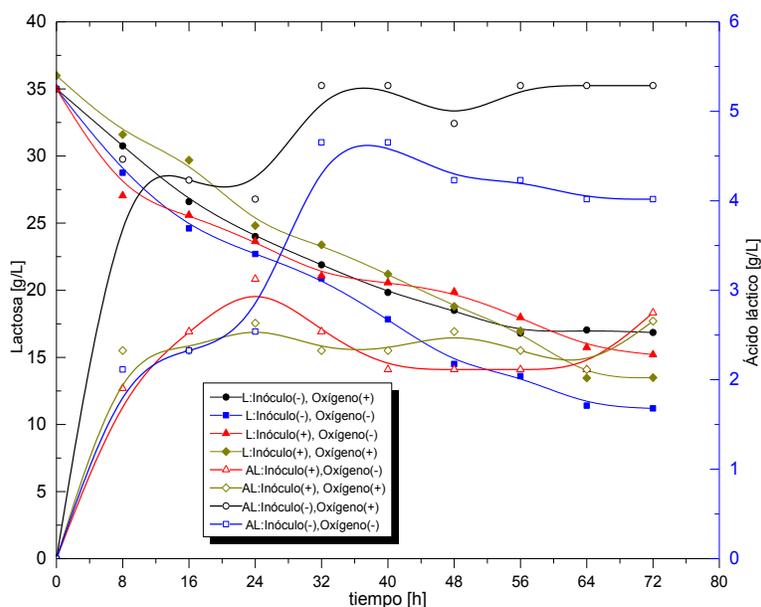


Figura 3.16 Consumo de lactosa y producción de ácido láctico en los niveles bajo de sustrato

En la Figura 3.17 se presenta el consumo de lactosa y la producción de ácido láctico para todos los tratamientos en nivel alto de sustrato. Se puede observar que en todos los tratamientos el consumo de lactosa a través del tiempo tuvo la misma tendencia, variando entre el 67, 64, 66% el consumo de sustrato para una concentración inicial de lactosa de 50g/L. Nuevamente se observó que la mayor producción de ácido láctico se llevo a cabo en los experimentos con el nivel bajo de inóculo (3×10^6 Cél/mL).

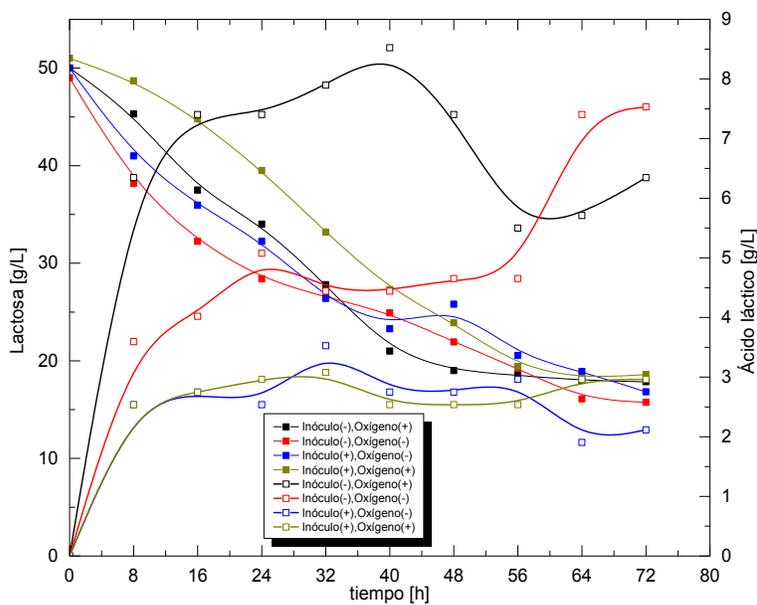


Figura 3.17 Consumo de lactosa y producción de ácido láctico en los niveles alto de sustrato

En las Figuras 3.16 y 3.17 se puede observar que la mayor producción de ácido láctico se llevó a cabo en los experimentos a nivel bajo de inóculo y en nivel alto de oxígeno por lo que se confirma la fuerte relación que existe entre microorganismo y la concentración inicial de oxígeno.

En la Figura 3.18 muestra el crecimiento a travez del tiempo de la levadura *Kluyveromices marxianus* en los diferentes tratamientos. Se observa que el crecimiento fue más lento cuando se utilizó el tamaño de inóculo en nivel alto en comparación cuando se utilizó el tamaño de inóculo en nivel bajo, es decir, el tamaño del inóculo afecta significativamente en el crecimiento de la levadura.

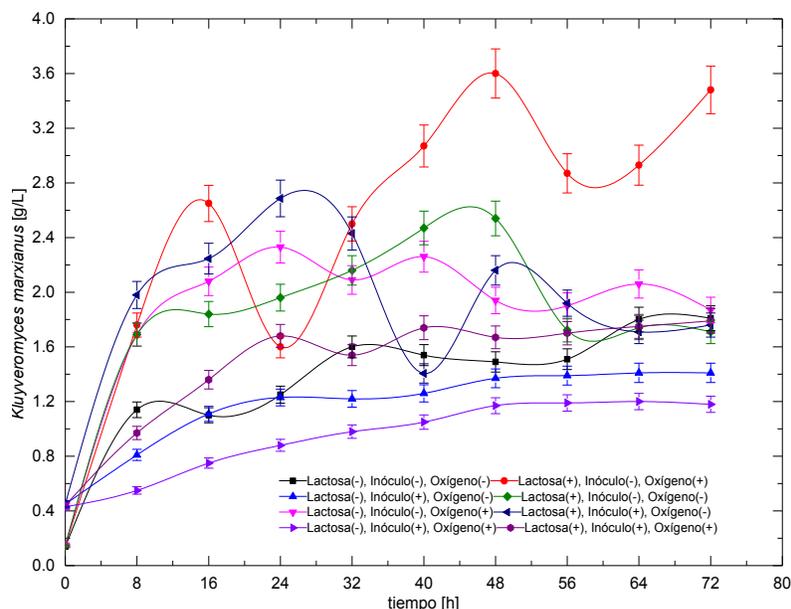


Figura 3.18 Crecimiento de la levadura en los diferentes tratamientos

En la Tabla 3.11 se muestran los valores obtenidos para los rendimientos de biomasa sobre sustrato, producto en biomasa, producto en sustrato, velocidad de crecimiento, constante de saturación, eficiencia de conversión y el tiempo donde se alcanzó la máxima producción.

Tabla 3.11 Parámetros cinéticos de las fermentaciones lácticas realizadas

Corrida	$\frac{Y_x}{s}$ $\left[\frac{gCél}{gS} \right]$	$\frac{Y_p}{x}$ $\left[\frac{gAL}{gCél} \right]$	$\frac{Y_p}{s}$ $\left[\frac{gAL}{gS} \right]$	$\mu_{máx}$ $\left[\frac{1}{h} \right]$	K_s $\left[\frac{g}{L} \right]$	β $\left[\frac{gAL}{hL} \right]$	$E(\%)$	Tiempo [h]
1	0.103	3.18	0.329	0.0134	24.74	0.145	31.69	32
2	0.047	4.80	0.226	0.0205	32.36	0.104	21.77	72
3	0.068	4	0.274	0.0133	26.70	0.13	26.4	24
4	0.083	1.77	0.149	0.073	38.90	0.11	15.61	32
5	0.148	2.72	0.402	0.18	38.39	0.165	23.19	32
6	0.100	2.91	0.293	0.08	39.75	0.213	39.01	40
7	0.033	3.55	0.117	0.0133	28.05	0.036	11.31	72
8	0.061	2.79	0.172	0.064	48.56	0.095	16.58	32

En la Tabla 3.11 se puede observar que el porcentaje más alto en la eficiencia de conversión de lactosa en ácido láctico se presentó en el tratamiento 6, alcanzando una productividad por día de 4.26 g/L de ácido láctico. Plessas *et al.*, 2008 reportan una productividad de 4.3 g/L de ácido láctico por día, con la levadura *Kluyveromyces marxianus* lo que indica que el proceso se puede optimizar.

Los rendimientos de la biomasa sobre el sustrato fueron menores a niveles altos de sustrato, según Özilgen *et al.*, 1988; Araujo *et al.*, 2007 el rendimiento del microorganismo puede disminuir con el incremento de la concentración de sustrato, debido a subproductos del metabolismo o intermediarios en la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa, el cual, sería mayor si hay una conversión completa de sustrato.

Solis-Méndez, 2013 encontró valores del 98.4, 20.33, 8.31 y 6.09 % como eficiencias de conversión de lactosa en fermentaciones alcohólicas utilizando la levadura *Kluyveromyces marxianus*, y concentraciones de bioetanol de 3.31, 3.65, 5.6 y 8.1 g/L por lo que podemos concluir que la fermentación con la levadura *Kluyveromyces marxianus* es una fermentación heteroláctica, es decir, se producen cantidades equimolares de bioetanol, ácido láctico y dióxido de carbono.

3.12 Cálculo de las constantes de Monod

Las constantes de la ecuación de Monod se calcularon a partir del método numérico de linealización de Lineweaver-Burk y se obtuvieron las ecuaciones que se muestran en la Tabla 3.12 a partir de la línea recta.

Tabla 3.12 Modelo de Monod para cada tratamiento

Corrida	Modelo	[R ²]
1	$\mu = 0.0134[S]/24.74 + S$	0.9368
2	$\mu = 0.0205[S]/32.36 + S$	0.8206
3	$\mu = 0.0133[S]/26.70 + S$	0.8145
4	$\mu = 0.073[S]/38.90 + S$	0.8302
5	$\mu = 0.18[S]/38.39 + S$	0.9095
6	$\mu = 0.08[S]/39.75 + S$	0.8632
7	$\mu = 0.0133[S]/28.05 + S$	0.7884
8	$\mu = 0.064[S]/48.56 + S$	0.8009

3.13 Modelación reológica de los caldos de fermentación

El comportamiento reológico de la suspensión de levaduras *Kluyveromyces marxianus* en suero de leche se expresó mediante el modelo de *Herschel-Bulkley*. En todos los caldos de fermentación se observó el fenómeno de shear thickening, es decir, como la velocidad de corte aumenta, aumenta la viscosidad. Los modelos obtenidos experimentalmente para cada tratamiento se presentan en las Tablas 3.13 a la 3.20.

Tabla 3.13 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 1

Tiempo[h]	Modelos experimentales. Tratamiento 1	R ²
8	$\tau = 0.042418 + 7.1392 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8727}$	0.9902
16	$\tau = 0.045604 + 6.2191 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8928}$	0.9925
24	$\tau = 0.037221 + 7.9211 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.858}$	0.9879
32	$\tau = 0.040602 + 7.3168 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8692}$	0.9899
40	$\tau = 0.041119 + 7.1474 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8718}$	0.9905
48	$\tau = 0.042249 + 7.302 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8701}$	0.9899
56	$\tau = 0.038421 + 7.4985 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8656}$	0.9297
64	$\tau = 0.030391 + 8.575 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8481}$	0.9871
72	$\tau = 0.028874 + 8.8354 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8458}$	0.9870

Tabla 3.14 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 2

Tiempo[h]	Modelos experimentales Tratamiento 2	R^2
8	$\tau = 0.034791 + 9.2226 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8388}$	0.98601
16	$\tau = 0.015102 + 1.2088 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.81}$	0.98539
24	$\tau = 0.038804 + 7.4947 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8662}$	0.98756
32	$\tau = 0.016783 + 1.1779 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8042}$	0.9844
40	$\tau = 0.098346 + 7.5483 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8732}$	0.99088
48	$\tau = 0.095753 + 6.8971 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8856}$	0.99061
56	$\tau = 0.092484 + 7.7672 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8704}$	0.99106
64	$\tau = 0.089967 + 7.9524 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8662}$	0.99134
72	$\tau = 0.0092434 + 1.3053 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7915}$	0.98691

Tabla 3.15 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 3

Tiempo[h]	Modelos experimentales. Tratamiento 3	R^2
8	$\tau = 0.015543 + 1.2246 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8004}$	0.98666
16	$\tau = 0.013952 + 1.2325 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7997}$	0.98657
24	$\tau = 0.017531 + 1.2456 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7986}$	0.98735
32	$\tau = 0.014645 + 1.2397 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7992}$	0.98669
40	$\tau = 0.088092 + 8.0391 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8645}$	0.99114
48	$\tau = 0.085434 + 8.3806 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8856}$	0.99239
56	$\tau = 0.00966 + 1.3484 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7867}$	0.98752
64	$\tau = 0.022212 + 1.4293 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7766}$	0.98488
72	$\tau = 0.023153 + 1.2729 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7946}$	0.98633

Tabla 3.16 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 4

Tiempo[h]	Modelos experimentales Tratamiento 4	R^2
8	$\tau = 0.09129 + 8.3523 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8591}$	0.99168
16	$\tau = 0.01727 + 1.1759 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8056}$	0.98629
24	$\tau = 0.023414 + 1.1444 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8093}$	0.98573
32	$\tau = 0.014645 + 1.2397 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7992}$	0.99193
40	$\tau = 0.022296 + 1.3337 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7862}$	0.98459
48	$\tau = 0.024771 + 1.1436 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.81}$	0.98663
56	$\tau = 0.080449 + 8.821 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8509}$	0.99041
64	$\tau = 0.089167 + 7.9507 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8664}$	0.99602
72	$\tau = 0.0069565 + 1.3994 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7825}$	0.98987

Tabla 3.17 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 5

Tiempo[h]	Modelos experimentales Tratamiento 5	R^2
8	$\tau = 0.0092531 + 1.4542 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7757}$	0.98789
16	$\tau = 0.013581 + 1.5954 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7588}$	0.9823
24	$\tau = 0.019345 + 1.5204 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7661}$	0.98284
40	$\tau = 0.026029 + 1.4027 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7785}$	0.98399
48	$\tau = 0.022072 + 1.4443 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7754}$	0.98564
56	$\tau = 0.032289 + 1.095 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8175}$	0.98872
64	$\tau = 0.02362 + 1.4907 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7707}$	0.98574
72	$\tau = 0.017254 + 1.4556 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7729}$	0.98425

Tabla 3.18 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 6

Tiempo[h]	Modelos experimentales. Tratamiento 6	R^2
8	$\tau = 0.011353 + 1.5952 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7593}$	0.98498
16	$\tau = 0.023942 + 1.2437 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7964}$	0.98599
24	$\tau = 0.082881 + 7.7588 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8696}$	0.99216
32	$\tau = 0.079301 + 8.8135 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8503}$	0.99092
40	$\tau = 0.026029 + 1.4027 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7785}$	0.98659
48	$\tau = 0.01516 + 1.5441 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7635}$	0.98298
56	$\tau = 0.011471 + 1.6778 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7525}$	0.98481
64	$\tau = 0.023632 + 1.3206 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7876}$	0.98539
72	$\tau = 0.019989 + 1.5201 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7663}$	0.98396

Tabla 3.19 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 7

Tiempo[h]	Modelos experimentales. Tratamiento 7	R^2
8	$\tau = 0.05794 + 1.1073 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.817}$	0.9905
16	$\tau = 0.081126 + 8.4413 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8565}$	0.99097
24	$\tau = 0.0098137 + 1.3036 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7906}$	0.98728
32	$\tau = 0.065213 + 1.028 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8277}$	0.99047
40	$\tau = 0.023669 + 1.3234 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7869}$	0.98501
48	$\tau = 0.06955 + 9.1203 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8453}$	0.99145
54	$\tau = 0.015654 + 1.3697 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7803}$	0.99149
64	$\tau = 0.037885 + 8.2325 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.8594}$	0.9871
72	$\tau = 0.056648 + 1.0077 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.821}$	0.98538

Tabla 3.20 Parámetros reológicos del modelo de *Herschel-Bulkley*. Tratamiento 8

Tiempo[h]	Modelos experimentales. Tratamiento 8	R^2
8	$\tau = 0.032401 + 1.243 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7887}$	0.98762
16	$\tau = 0.052499 + 1.3879 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7731}$	0.98324
24	$\tau = 0.055997 + 1.3125 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7803}$	0.98369
32	$\tau = 0.050977 + 1.3338 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.777}$	0.98387
40	$\tau = 0.051692 + 1.2976 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.781}$	0.98385
48	$\tau = 0.05954 + 1.078 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8082}$	0.98598
56	$\tau = 0.058335 + 1.0695 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.8102}$	0.98722
64	$\tau = 0.048785 + 1.1684 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7981}$	0.98535
72	$\tau = 0.03295 + 1.3706 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.7745}$	0.98205

De las Figuras 3.19 a la 3.26 se presentan los reogramas de los caldos de fermentación los cuales mostraron un comportamiento no-Newtoniano con características dilatantes.

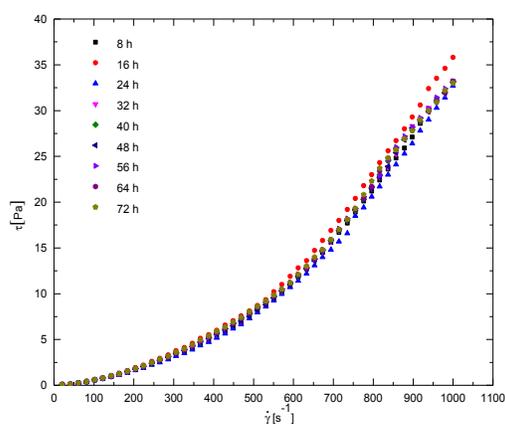


Figura 3.19 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 1

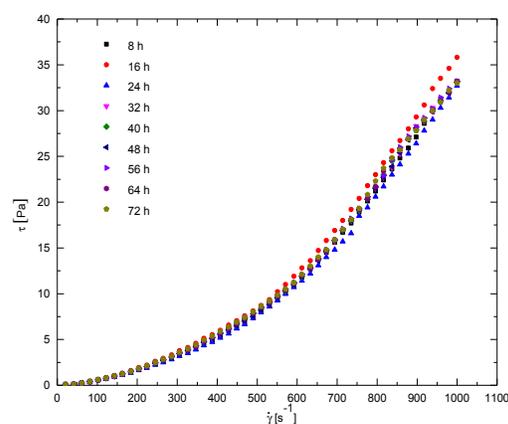


Figura 3.20 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 2

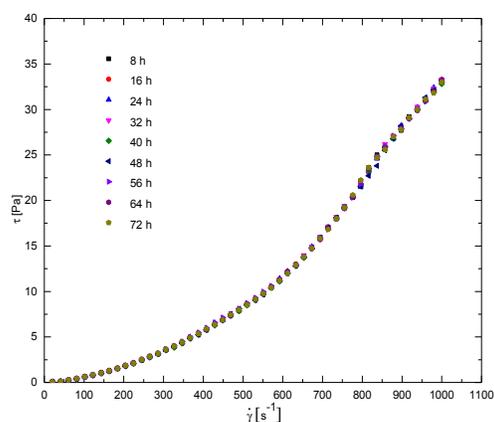


Figura 3.21 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 3

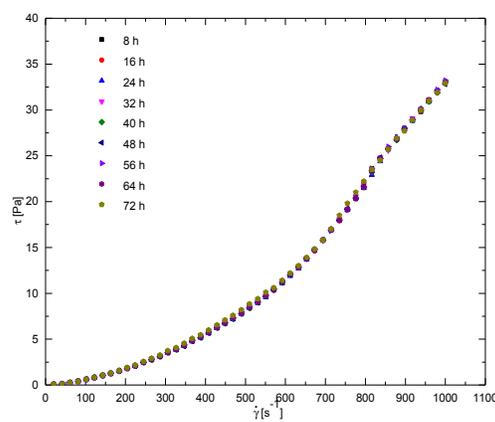


Figura 3.22 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 4

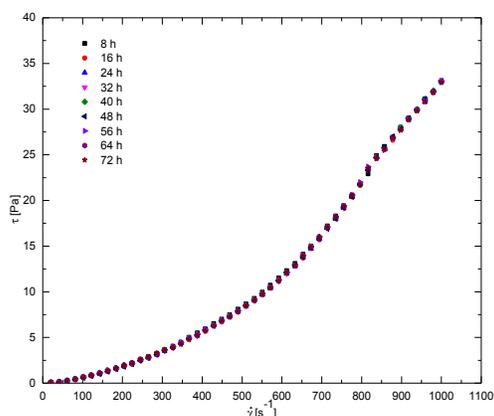


Figura 3.23 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 5

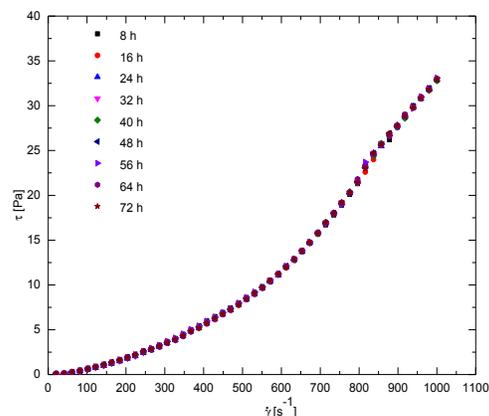


Figura 3.24 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 6

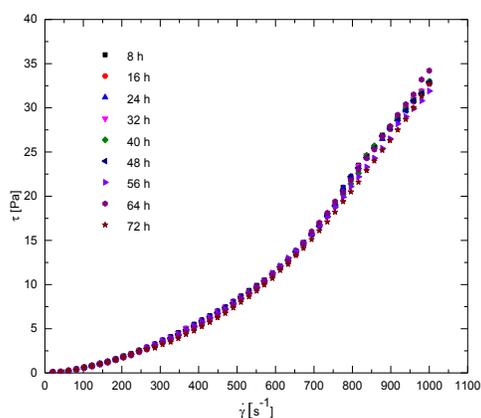


Figura 3.25 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 7

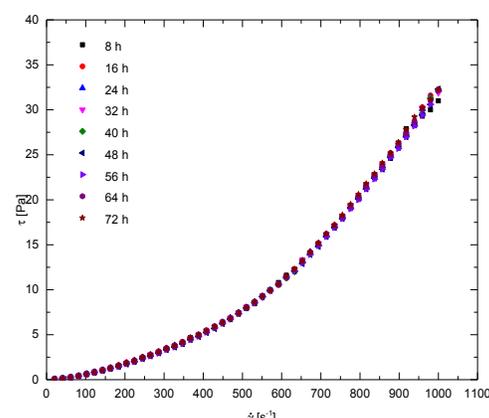


Figura 3.26 Reograma del caldo de fermentación. Tratamiento 8

De las Figuras 3.19 a 3.26 se observa que la viscosidad aparente de la suspensión de levaduras se mantuvo constante a través del tiempo de fermentación en cada uno de los tratamientos.

Solis-Médez, 2013 encontró el mismo comportamiento para los caldos de fermentación con la levadura *Kluyveromyces marxianus* en suero de leche ajustándose el modelo de *Herschel-Bulkley* adecuadamente a los datos experimentales con un coeficiente de correlación $R^2 > 0.98$.

Lo anterior se debe a que la concentración de biomasa producida fue baja, esto se explica de la siguiente manera: en una fermentación anaerobia la mayor parte de sustrato consumido es destinada a la formación de producto y como

consecuencia también a que los caldos de fermentación fueron preparados con suero de leche concentrados sin suplementar nutrientes.

La reocinética de los caldos de fermentación se siguió evaluando el parámetro de esfuerzo de corte inicial τ_0 bajo la influencia del crecimiento de la levadura. La Tabla 3.21 muestra los modelos reocinéticos encontrados experimentales.

Tabla 3 Modelos reocinéticos experimentales

Modelos reocinéticos experimentales	R^2
$\tau_0 = 0.0631 - 0.0167[\text{kg} / \text{m}^3 \text{ cél}]$	0.6025
$\tau_0 = -0.0023 + 0.0305[\text{kg} / \text{m}^3 \text{ cél}]$	0.6959
$\tau_0 = 0.2874 - 0.1208[\text{kg} / \text{m}^3 \text{ cél}]$	0.6355
$\tau_0 = -0.0118 + 0.0144[\text{kg} / \text{m}^3 \text{ cél}]$	0.7917
$\tau_0 = -0.0869 + 0.0593[\text{kg} / \text{m}^3 \text{ cél}]$	0.6685
$\tau_0 = 0.0132 + 0.0243[\text{kg} / \text{m}^3 \text{ cél}]$	0.6406

Nuevamente se realizó el test de hipótesis. La hipótesis nula nos dice que no existe relación entre el esfuerzo de corte inicial y la concentración de la levadura *Kluyveromyces marxianus*. El valor de r calculado fue $r > 0.77$, con un valor de significancia de 0.1 el valor de crítico de r es de 0.5822 (Yamane, 1979). Como $r_{cal} > r_{critica}$ se rechaza la hipótesis estadística nula, es decir se rechaza la suposición de que no existe relación estadística significativa entre el esfuerzo corte y el crecimiento de la levadura, por lo tanto se concluye que existe una relación directa significativa entre estos dos parámetros.

En la Figura 3.27 se observa que el índice de consistencia disminuye progresivamente durante 48 horas de la fermentación aumentando en las últimas horas, para el caso de índice de comportamiento reológico ocurre el comportamiento contrario. Este mismo comportamiento antagónico entre el

coeficiente de consistencia y el índice de comportamiento reológico fue observado por Cantú-Lozano, 1987 durante en fermentaciones fúngicas.

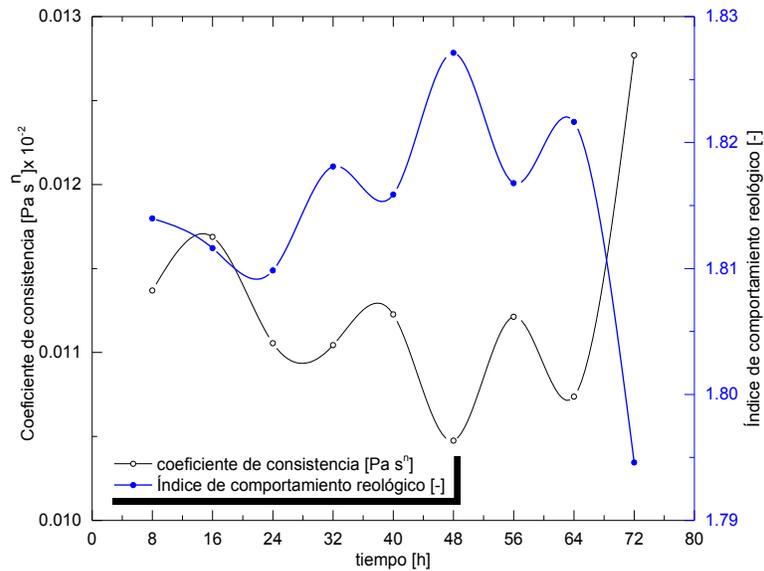


Figura 3.27 Coeficiente de consistencia vs índice de comportamiento reológico en fermentaciones lácticas

3.14 Análisis de varianza de los modelos experimentales de *Herschel-Bulkley*

Para encontrar los valores de esfuerzo de corte inicial τ_0 [Pa], coeficiente de consistencia k [Pa s^n] e índice de comportamiento reológico n [-] se aplicó el modelo linealizado de *Herschel-Bulkley*. Luego se logaritma la ecuación 3.7, se gráfica.

$$\tau - \tau_0 = k(\dot{\gamma})^n \quad (3.6)$$

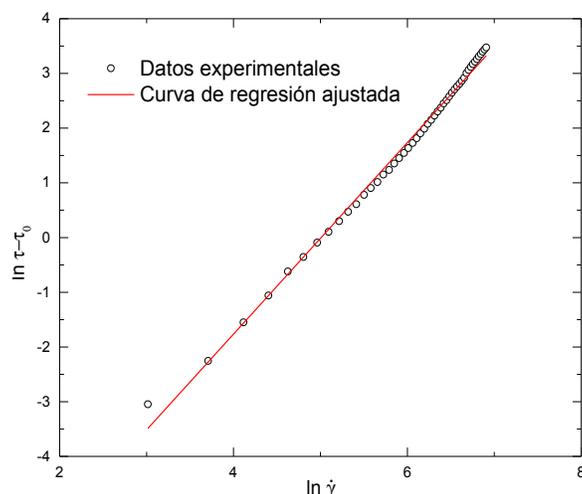


Figura 3.28 Determinación del coeficiente de consistencia e índice de comportamiento reológico

A partir de la Figura 3.28 se encontraron los valores de k y n , se puede observar que existe una relación directa entre la velocidad de corte y el esfuerzo de corte. El modelo se ajustó adecuadamente a los datos experimentales presentando un coeficiente de correlación del 0.9902. Posteriormente se realizó el análisis de varianza del modelo de regresión con un intervalo de confianza del 99.5%. En la Tabla 3.21 se muestra el ANOVA de regresión donde se observa que ambas variables están linealmente relacionadas. El estadístico F permitió contrastar la hipótesis nula de que el valor poblacional de R es cero. Como el valor de F es mayor que el valor de $F_{\text{Crítico}}$, podemos concluir que ambas variables están linealmente relacionadas.

Tabla 4.21 Análisis de varianza del modelo de *Herschel-Bulkley*

Análisis de varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	115.981513	115.981513	9592.43457	5.41611E-56
Residuos	47	0.568274	0.01209094		
Total	48	116.549787			

En los Anexos 1 y 2 se presentan el análisis de varianza para cada modelo encontrado experimentalmente de *Herschel-Bulkley*.

**CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONE**

CONCLUSIONES

El aprovechamiento biotecnológico del suero de leche a partir de la levadura *Kluyveromyces marxianus* es una alternativa viable ya que ofrece ventajas como: bajo costo de materia prima, producto de interés económico como el ácido láctico y se contribuye al tratamiento de residuos con alta carga orgánica, como es el suero de leche.

El suero de leche mostró un comportamiento no-Newtoniano con características dilatantes donde el esfuerzo de corte aumentó a medida que la velocidad de corte aumentaba. El modelo reológico que se ajustó a los datos experimentales fue el modelo de *Herschel-Bulkley*.

El diseño factorial 3^2 mostró que el efecto positivo de la temperatura disminuye la viscosidad y el efecto positivo de la concentración la aumenta y el factor que más significativo sobre la viscosidad aparente es la temperatura.

El diseño factorial 2^3 que se siguió para evaluar los efectos de concentración inicial de sustrato, inóculo y oxígeno permitió concluir que los factores que más influyen en la producción de ácido láctico es la concentración inicial de sustrato y de inóculo, donde el nivel alto de sustrato y el nivel bajo de inóculo elevan la producción de ácido láctico.

El modelamiento reocinético de la suspensión de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en suero de leche mostró un comportamiento no-Newtoniano con características dilatantes, ajustándose el modelo de *Herschel-Bulkley* a los datos experimentales.

La viscosidad aparente de la suspensión de levaduras en suero de leche no varió con el tiempo ya que no se produjo la biomasa necesaria para modificar esta propiedad del fluido.

RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto del pH inicial de fermentación con el fin de encontrar el pH óptimo de crecimiento y producción de la levadura *Kluyveromyces marxianus*.

Evaluar el efecto de la temperatura de incubación, crecimiento y producción de la levadura *Kluyveromyces marxianus* con el fin de encontrar las temperaturas óptimas.

Evaluar el rango de agitación para encontrar la velocidad óptima de producción de ácido láctico.

Cuantificar las concentraciones de producción de ácido láctico y de bioetanol para obtener el rendimiento y evaluar que producto es más rentable.

Aumentar la concentración de sustrato para evaluar hasta que concentración existe inhibición por concentración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aktas, N., Hakki, B.I., Mutlu, M., Tanyolac, A. (2006). Optimization of lactose in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology*. **97**, 2252-2259
2. Alais, Ch. (1985). *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. Editorial Reverté, España.
3. Almécija, M. C. (2007). *Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero*. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España.
4. Análisis de agua. Determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba. Norma Mexicana NMX-AA-005-SCFI-2000.
5. Análisis de agua. Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-Método de prueba. Norma Mexicana NMX-AA-030-2001.
6. Análisis de agua. Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba. Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2001.
7. Araujo, G. A. V., Monsalve, C. L.M., Quintero, T. A.L. (2013). Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. **4(2)**, 55-65.
8. Araujo, K., Páez, G., Mármol, Z., Ferrer, J., Ramones, E., Aiello, C., Rincón, M. (2007). Efecto de la concentración de lactosa sobre la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* y la producción de β -D-galactosidasa (E.C. 3.2.1.23). *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. **30(1)**, 64-73.
9. Arslan, E., Yener, M.E., Esin, A. (2005). Rheological characterization of tahib/pekmez (sesame paste/concéntrate grape juice) blends. *Journal of Food Engineering*. **69**, 167-172.

-
10. Badui, D. S. (2006). *Química de los Alimentos*. Editorial Pearson Educación, México.
 11. Barbana, C. y El-Omri, A. (2009). Viscometri behavior of reconstituted tomato concéntrate. *Food Bioprocess Technol.*
 12. Barnes, H. A. (2000). *A Handbook of Elementary Rheology*. Published by University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics.
 13. Barnes, H.A., Hutton, J. F., Walters, K. F.R. S. (1989). *An Introduction to rheology*. Editorial Elsevier, Inglaterra.
 14. Baroutian, S., Eshtiaghi, N., Gapes, J.D. (2013). Rheology of primary and secondary sewage sludge mixture: Dependency o temperatura and solid concentration. *Bioresource Tecnology*. **140**, 227-233.
 15. Bird, R.B., Stewart, E. W., Lightfoot, N. E. (1992). *Fenómenos de transporte*. Editorial Reverté, México.
 16. Bird, R.B., Stewart, E. W., Lightfoot, N. E. (2006). *Fenómenos de transporte*. Editorial Limusa Wiley, México.
 17. Brousse, M.M., Martos, A.M., Cruz, N. (2010). Viscosidad y densidad de jugo de uva (Isabella) para aplicaciones de procesos. *Rev. Cienc. Tecnol.* 13
 18. Callejas, H. J., Prieto, G. F, Reyes, C. V.E., Marmolejo. S.Y., Méndez, M.M.A. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta universitaria*. **22**, 11-18.
 19. Cantú-Lozano, D. (1982). *Estudo da caracterização das propriedades reológicas de caldos de fermentação*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
 20. Cantú-Lozano, D. (1987). Caracterización de propiedades reológicas en caldo de fermentación. En: *La agroindustria de México Vol. II*, (Universidad Autónoma de Chapingo), Pp. 749-761. Chapingo, México
 21. Cantú-Lozano, D., (1987) Caracterización de propiedades reológicas en caldos de fermentación, *La agroindustria en México*, Programa de integración agricultura-industria, Universidad Autónoma de Chapingo, Vol. 2, pp. 749-761, México.

-
22. Carreau, P. J., Cotton, F., Citerne, G.P., Moan, M. (2002). Rheological Properties of Concentrated Suspensions: Applications to Foodstuffs. En: Engineering and Food for the 21st Century. Pp. 327-345. CRC Press, Nueva York.
 23. Carrillo, L., Audisio, M.C., Bejarano, V. N., Gómez, M. S. E., Ancansi, E. G., Benítez, A. M. R. (2007). Manual de microbiología de los alimentos. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencia Agrarias. San Salvador de Jujuy, Argentina.
 24. Cayetano, A. M.C., Andreina, S., Ferreyra, M.M., Schvab, M.del C. (2013). Comportamiento reológico del vino de naranja: Influencia de la temperatura y la composición. Revista ReCiTelA. **13**,7-18.
 25. Cepeda, E., Villarán, M.C. (1999). Density and viscosity of *Malus floribunda* juice as a function of concentration and temperatura. Journal Food Engineering. **41**, 103-107.
 26. Chhabra, R. P., Richardson, J.F. (2008). Non-Newtonian Flow and Applied Rheology. Butterworth-Heinemann-ICHEME, USA.
 27. Cury, R. K., Arteaga, M.M., Martínez, F. G., Luján, R. D., Durango, V. A. (2014). Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando *Lactobacillus casei*. Rev. Colomb. Biotecnol. **16(1)**, 137-145.
 28. Da Silva, F.C., Guimarães, P. D.H., Gasparetto, A.C. (2005). Reologia do suco de acerola efeitos da concentração e temperatura. Ciencia Tecnologia Alimentaria., Campinas. **25**, 121-126.
 29. Dak, M., Verma, R. C., Jaaffrey, S.N.A. (2007). Effect of temperatura and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. Journal of Food . **80**, 101-1015.
 30. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. **28(3)**,350-356.

-
31. elibagli, B. K., Dalgic, c. A. (2007) Rheological properties of sour-cherry juice and concéntrate. *International Journal of Food Science and Technolog.* **42**, 773-776.
 32. Escobar, L. F., rojas, C.A., Giraldo, G. G. A., Padilla, S. L. (2010). *Rev. Invest. Univ. Quíndío* **20**, 42- 49.
 33. García-Garibay, Quintero-Ramírez, López-Munguía. (2004). *Biotecnología alimentaria*. Editorial LIMUSA, México.
 34. Gonzales-Siso, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology.* **57**,1-11.
 35. Graciano, F.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 339-354.
 36. Guan, C. T., Lin, L. H., Ling, C. N., Choong, S. Y. T., Razi, A. F. (2008). Effect of temperatura on rheological behavior of dragon fruit (*Hylocereus sp.*) Juic. *International Journal of Food Engineering.* **4(7)**, 1-28.
 37. Hassan, B.H., Hobani, A.I. (1998). Flow properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Extract. *Journal of Engineering.* **35**, 459-470.
 38. Hernández, P. A., Alfaro, I., Arrieta, R. (2003). *Microbiología industrial*. Editorial Universidad Estatal a Distancia, Costa rica.
 39. Herryman-Munilla, M., Blanco-Carracedo, G. (2005). Ácido láctico y pololáctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA.* **XXXIX(1)**, 49-59.
 40. Ibarz, A., Barbosa-Canovas, G.V. (2003). *Unit Operations in Food Engineering*. Editorial CRC Press LLC.
 41. Jakymec, M., Morán, H., Páez. G., Ferrer,J., Mármol, Z., Ramones, E. (2001) Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *FCV-LUZ.* **11**, 53-59.
 42. Juszczack, L., Witczak, M., Fortuna, T., Solarz, B., (2010). Efect of temperatura and soluble solids contenet on the viscosity of beetroot (*Beta vulgaris*) juice concéntrate. *International Journal of Food Properties.* **13**, 1364-1372.

-
43. Juszczak, L., y Fortuna, T. (2004) Effect of temperatura and soluble solid contenido on viscosity of cherry juice concéntrate. *International Agrophysics*. **18**, 17-21.
44. Kaya, A., Sözer, N. (2005). Rheological behavior of sour pomegranate juice concentrates (*Punica granatum L.*). *International Journal of Food Science and Technology*. **40**, 223 -227.
45. Kosmerl, T., Abramovic, H., Klofutar, C. (2000). The rheological properties of Slovenian wines. *Journal of Food Engineering*. **46**, 165-17
46. Magerramov, M.A., Abdulagatov, A.I., Azizov, N.D., Abdulagatov, I.M. (2007) Effect of temperatura, concentration and pressure on the viscosity of pomegranate and pear juice concentrates. *Journal of Food Eginerring*. **80**, 476-489.
47. Manayay, D., Ibarz, A. (2010). Modelamiento de la cinética de reacciones del pardeamiento no enzimático y el comportamiento reológico, en el proceso térmico de jugos y pulpas de frutas. *Scientia Agropecuaria*. **1**, 155-168.
48. Mendoza-Gardeazábal, A.S. (2013). Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como probiótico. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
49. Monteros-Lagunes, M., Juárez-Lagunes, F. I., García-Galindo, H. S. (2009). Suero de leche fermentado con lactobacilos para alimentación de becerros en el trópico. *Agrociencia*. **43**, 585-593.
50. Morán, C. F. A. (2009). Elaboración de un producto alimenticio en el salvador a partir del suero dulce lácteo utilizando el sistema de ultrafiltración. Tesis de licenciatura de ingeniería industrial. Universidad Don Bosco, El salvador.
51. Moreno, B. R. (2005). Reología de suspensiones cerámicas. Editorial Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España.
52. Mostafa, G., Ghasem, N., Mostafa, R., Pouyan, A. B., Mehdi, S., Babak, H. (2009). Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology* **8**, 81-85.

-
53. Murari, C. S., Moraes, D. C., Aquino, M. P. L., Bueno, F. G., Del Vianchi, V. L. (2012). Evaluación de la producción de etanol a partir del lactosuero por la levadura *Kluyveromyces marxianus* 229 en condiciones aerobias e anaerobias. 28-30 de marzo. Ixtapa- Zihuatanejo Guerrero, México. Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica.
54. Özilgen, M., Ollis D. F., Ogyrdziak, D. (1988). Kinetics of batch fermentations with *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 165-172.
55. Padín, G. C., Díaz, F.M. (2009). Fermentación alcohólica del lactosuero por *Kluyveromyces marxianus* y solventes orgánicos como extractantes. *RSVM* 29, 110-116.
56. Padín-González, C., Díaz-Fernández, M. (2006). Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. **26**, 317-327.
57. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105,1-14.
58. Parés, I. F. R., Juárez, G. A. (2012). *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté, México.
59. Parra-Huertas, R.A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de los alimentos. *Facultad nacional de agronomía-Medellín*. **62(1)**, 4967-4982.
60. Perini, B. B. L., Souza, M. H. C., Kelbert, M., Apati, P. G., Pezzin, T. A. P., Schneider, S. A. L. (2013). Production of β -Galactosidase from Chesse Whey Using *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Chemical Engineering Transactions*. **32**, 991-996.
61. Plata, A., Ramírez, S., Riaño, L. C. E. (2013). Valor agregado para el lactosuero de caprino proveniente de agroindustrias lácteas: ácido láctico como alternativa de descontaminación. *NOVA*. **11(19)**,33-39
62. Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Marchant, R., Banat, I. M. (2007). Lactic Acid Production by Mixed Cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus hevelticus*. *Bioresource Technolgy*. **99**, 5951- 5955.

-
63. Poveda, E. E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Rev. Chil. Nutr.* **40 (4)**,397-403.
64. Prazares, R. A., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management.* **110**, 48-68.
65. Productos y Servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Método de prueba. Norma Oficial Mexicana NOM-243-243-ssa1-2010. Diario Oficial de la Federación. 27 de Septiembre de 2010.
66. Quintero Ramírez. R., (1987). Ingeniería bioquímica. Teoría y aplicaciones. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. de C.V., México
67. Quintero, H., Rodríguez, M.M., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z., Rincón, M. (2001). Producción Continua de Proteína Microbiana (*K. fragilis*) a partir de suero de leche. *Revista científica, FCV-LUZ.* **11**, 87-94.
68. Ramírez-Nava, J. S. (2013). Uso de la fermentación para el aprovechamiento del lactosuero. *Tecnología Láctea Latinoamericana.* **77**, 52-61.
69. Rao, M.A. (2007). *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications.* Second Edition, Springer.
70. Rosa de Souza, R., Bergamasco, R., Da Costa, S. C., Feng, X., Bernarndo, F. S. H., Gimenes, M. L. (2010). Recovery and purification of lactose from whey. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification.* **49**, 1137-1143.
71. Saddoud, A., Hassaïri, I. Sayadi, S. (2007). Anaerobic membrane reactor whit phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresource Technology.* 2102-2108.
72. Sagarpa-Siap.(2013). Resumen anual pecuario. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/>. Accesado: 25 Noviembre 2014.
73. Sağlam, D., Venema, P., de Vries, R., Shi, J., Van der Linden, E. (2013). Concentrated whey protein particle dispersions: Heat stability and rheological properties. *Food Hydrocolloids.* **30**, 100-109.

-
74. Serna, C. L., Rodríguez, S.A (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. **5**, 54-65.
 75. Sharman, K. S., Mulvaney, J. S. Rizui, H. S.S. (2003). *Ingeniería de los alimentos: Operaciones Unitarias y prácticas de laboratorio*. Limusa Wiley, México.
 76. Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Suero de leche (líquido o en polvo)- Especificaciones y Método de prueba. Proyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012.
 77. Solis-Méndez, A. (2013). Modelación reológica durante el proceso de producción de bioetanol a partir de suero de leche con la levadura *Kluyveromyces marxianus*. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.
 78. Steffe, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*, Second Edition. Freeman Press, EUA.
 79. Urribarrí, L., Vielma, A., Páez, G., Ferrer, J. Mármol, Z., Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche utilizando *Lactobacillus hevelticus* en cultivo continuo. *Revista Científica FCV*. **14(4)**
 80. Valencia-Denicia, E., Ramírez-Castillo, M.L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos: Ciencia y Cultura*. **16(73)**, 27-31.
 81. Vandresen, S., Quadri, N. M.G., De Souza, R. J.A., Hotza, D. (2009). Temperature effect on the rheological behavior of carrot juices. *Journal of Food Engineering*. **92**, 269 -274.
 82. Vaz, T. J. C., Braga, I. K., Dorta, C. (2012). Reaproveitamento do soro de leite bovino para produção de biomassa por *Kluyveromyces marxianus* 229. *Revista alimentus*, 36-57.
 83. Vitali, A. A., Rao, M. A. (1984). Flow properties of low-pulp concentrated orange juice: Effect of temperatura and concentration. *Journal of Food Science*. **49**, 882-888.
 84. Yamane, T. (1979). *Statistics: An introductory analysis*. Third edition. Harper & row, Publishers, Inc. New York.

85. Zainal, B.S., Abdul-Rahman, R., Ariff, A.B., Saari, B.N., Asbi, B.A. (2000). Effects of temperature on the physical properties of pink guava juice at two different concentrations. *Journal of Food Engineering*. **43**, 55-59.
86. Zhou, Hai-Xiang., Xu, Jin-Li., Chi, Z., Liu, Guang-Lei., Chi, M. (2013). B-Galactosidase over-production by a *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. *Biochemical Engineering Journal*. **17**, 17-24.

ANEXOS

ANEXOS

Análisis de varianza de los modelos experimentales de *Herschel-Bulkley* en suero de leche.

Corrida		Análisis de varianza				
		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
20°C	Regresión	1	1.40582591	1.40582591	3161.76851	9.1622E-45
	Residuos	47	0.02089774	0.00044463		
	Total	48	1.42672365			
30°C	Regresión	1	114.066118	114.066118	8401.41047	1.2018E-54
	Residuos	47	0.63811994	0.01357702		
	Total	48	114.704238			
40°C	Regresión	1	114.055845	114.055845	9152.78908	1.6224E-55
	Residuos	47	0.5856821	0.01246132		
	Total	48	114.641527			
50°C	Regresión	1	114.363927	114.363927	7858.22953	5.7297E-54
	Residuos	47	0.68400961	0.0145534		
	Total	48	115.047936			
60°C	Regresión	1	113.327499	113.327499	7442.13577	2.042E-53
	Residuos	47	0.71570751	0.01522782		
	Total	48	114.043206			
70°C	Regresión	1	110.419008	110.419008	9567.58756	5.7548E-56
	Residuos	47	0.54242445	0.01154095		
	Total	48	110.961432			
80°C	Regresión	1	107.926772	107.926772	9555.96241	5.9208E-56
	Residuos	47	0.53082652	0.01129418		
	Total	48	108.457599			
90°C	Regresión	1	97.3551173	97.3551173	7137.69518	5.4157E-53
	Residuos	47	0.64105995	0.01363957		
	Total	48	97.9961773			

Análisis de varianza de los modelos experimentales de *Herschel-Bulkley* en caldos de fermentación.

Análisis de varianza del tratamiento 1						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	115.981513	115.981513	9592.43457	5.41611E-56
	Residuos	47	0.568274	0.01209094		
	Total	48	116.549787			
16 h	Regresión	1	117.59671	117.59671	9320.32296	1.0616E-55
	Residuos	47	0.59301007	0.01261724		
	Total	48	118.18972			
24 h	Regresión	1	115.872211	115.872211	9427.03189	8.1348E-56
	Residuos	47	0.57769974	0.01229148		
	Total	48	116.449911			
32 h	Regresión	1	116.409222	116.409222	9719.2705	3.9835E-56
	Residuos	47	0.56292635	0.01197716		
	Total	48	116.972149			
40 h	Regresión	1	116.494384	116.494384	9756.85231	3.6396E-56
	Residuos	47	0.56116828	0.01193975		
	Total	48	117.055552			
48 h	Regresión	1	116.400445	116.400445	9692.71453	4.2467E-56
	Residuos	47	0.56442608	0.01200907		
	Total	48	116.964871			
56 h	Regresión	1	116.609547	116.609547	10183.5253	1.3373E-56
	Residuos	47	0.53818776	0.0114508		
	Total	48	117.147735			
64 h	Regresión	1	115.861803	115.861803	9166.09926	1.5682E-55
	Residuos	47	0.59409184	0.01264025		
	Total	48	116.455895			
72 h	Regresión	1	114.838282	114.838282	8117.74345	2.6818E-54
	Residuos	47	0.66488912	0.01414658		
	Total	48	115.503171			

Análisis de varianza del tratamiento 2						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	113.246624	113.246624	7663.91642	1.0284E-53
	Residuos	47	0.69450018	0.0147766		
	Total	48	113.941124			
16 h	Regresión	1	113.330945	113.330945	7725.98459	8.5179E-54
	Residuos	47	0.68943374	0.0146688		
	Total	48	114.020379			
24 h	Regresión	1	116.129003	116.129003	9211.82063	1.396E-55
	Residuos	47	0.59250645	0.01260652		
	Total	48	116.721509			
32 h	Regresión	1	111.978952	111.978952	7357.35408	2.6684E-53
	Residuos	47	0.71534015	0.01522		
	Total	48	112.694293			
40 h	Regresión	1	112.261218	112.261218	7029.46042	7.7373E-53
	Residuos	47	0.75059491	0.0159701		
	Total	48	113.011812			
48 h	Regresión	1	113.48033	113.48033	6779.72824	1.8002E-52
	Residuos	47	0.78669459	0.01673818		
	Total	48	114.267025			
56 h	Regresión	1	112.523961	112.523961	7247.13066	3.7962E-53
	Residuos	47	0.72975449	0.01552669		
	Total	48	113.253716			
64 h	Regresión	1	112.402431	112.402431	7295.21014	3.253E-53
	Residuos	47	0.72416204	0.0154077		
	Total	48	113.126593			
72 h	Regresión	1	111.421088	111.421088	7392.36076	2.3884E-53
	Residuos	47	0.70840579	0.01507246		
	Total	48	112.129494			

Análisis de varianza del tratamiento 3						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	111.353118	111.353118	7355.86782	2.6811E-53
	Residuos	47	0.71148594	0.015138		
	Total	48	112.064604			
16 h	Regresión	1	111.585868	111.585868	7323.82264	2.9688E-53
	Residuos	47	0.71609268	0.01523601		
	Total	48	112.30196			
24 h	Regresión	1	110.91299	110.91299	7559.77742	1.4156E-53
	Residuos	47	0.68955873	0.01467146		
	Total	48	111.602549			
32 h	Regresión	1	111.664196	111.664196	7659.21775	1.0432E-53
	Residuos	47	0.68521582	0.01457906		
	Total	48	112.349411			
40 h	Regresión	1	112.114735	112.114735	7267.58518	3.5544E-53
	Residuos	47	0.72505412	0.01542668		
	Total	48	112.839789			
48 h	Regresión	1	112.066968	112.066968	7484.87015	1.7864E-53
	Residuos	47	0.70370593	0.01497247		
	Total	48	112.770674			
56 h	Regresión	1	111.054612	111.054612	8033.64652	3.4207E-54
	Residuos	47	0.64971327	0.01382369		
	Total	48	111.704326			
64 h	Regresión	1	108.485887	108.485887	8058.7906	3.1798E-54
	Residuos	47	0.63270495	0.01346181		
	Total	48	109.118592			
72 h	Regresión	1	109.948666	109.948666	7903.99989	5.0027E-54
	Residuos	47	0.65379395	0.01391051		
	Total	48	110.602459			

Análisis de varianza del tratamiento 4						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	111.752338	111.752338	7112.23334	5.8869E-53
	Residuos	47	0.73849656	0.01571269		
	Total	48	112.490834			
16 h	Regresión	1	111.710635	111.710635	7249.11135	3.7721E-53
	Residuos	47	0.72428186	0.01541025		
	Total	48	112.434917			
24 h	Regresión	1	110.746074	110.746074	7004.02087	8.4208E-53
	Residuos	47	0.74315391	0.01581179		
	Total	48	111.489228			
32 h	Regresión	1	112.147697	112.147697	7205.25943	4.3462E-53
	Residuos	47	0.73154087	0.0155647		
	Total	48	112.879238			
40 h	Regresión	1	108.790945	108.790945	7118.1434	5.7739E-53
	Residuos	47	0.71832978	0.01528361		
	Total	48	109.509275			
48 h	Regresión	1	110.603794	110.603794	6988.86222	8.8577E-53
	Residuos	47	0.74380895	0.01582572		
	Total	48	111.347603			
56 h	Regresión	1	111.690937	111.690937	7313.58266	3.0675E-53
	Residuos	47	0.71777052	0.01527171		
	Total	48	112.408708			
64 h	Regresión	1	112.130725	112.130725	7230.51607	4.0052E-53
	Residuos	47	0.72887523	0.01550798		
	Total	48	112.859601			
72 h	Regresión	1	110.765749	110.765749	8097.44269	2.8434E-54
	Residuos	47	0.64291782	0.0136791		
	Total	48	111.408667			

Análisis de varianza del tratamiento 5						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	109.921666	109.921666	8044.061	3.3187E-54
	Residuos	47	0.6422525	0.01366495		
	Total	48	110.563918			
16 h	Regresión	1	107.73876	107.73876	7524.01613	1.5814E-53
	Residuos	47	0.67300783	0.01431932		
	Total	48	108.411768			
24 h	Regresión	1	107.287266	107.287266	7023.11135	7.9023E-53
	Residuos	47	0.71798684	0.01527632		
	Total	48	108.005253			
40 h	Regresión	1	107.528269	107.528269	6949.30356	1.0113E-52
	Residuos	47	0.72724246	0.01547324		
	Total	48	108.255511			
48 h	Regresión	1	107.533191	107.533191	7350.85515	2.7241E-53
	Residuos	47	0.68754722	0.01462866		
	Total	48	108.220739			
56 h	Regresión	1	110.325419	110.325419	7185.24398	4.6379E-53
	Residuos	47	0.72165882	0.01535444		
	Total	48	111.047078			
64 h	Regresión	1	106.886701	106.886701	7386.3594	2.4342E-53
	Residuos	47	0.68012869	0.01447082		
	Total	48	107.566829			
72 h	Regresión	1	108.354573	108.354573	7098.39894	6.1607E-53
	Residuos	47	0.71743854	0.01526465		
	Total	48	109.072012			

Análisis de varianza del tratamiento 6						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	108.169511	108.169511	8335.57754	1.4444E-54
	Residuos	47	0.60991179	0.01297685		
	Total	48	108.779422			
16 h	Regresión	1	109.605979	109.605979	7315.02789	3.0533E-53
	Residuos	47	0.70423259	0.01498367		
	Total	48	110.310212			
24 h	Regresión	1	112.957215	112.957215	7192.52867	4.5294E-53
	Residuos	47	0.73812554	0.0157048		
	Total	48	113.695341			
32 h	Regresión	1	112.389758	112.389758	7906.7731	4.9619E-54
	Residuos	47	0.66807515	0.01421436		
	Total	48	113.057833			
40 h	Regresión	1	108.842844	108.842844	7638.8746	1.1101E-53
	Residuos	47	0.66968159	0.01424854		
	Total	48	109.512525			
48 h	Regresión	1	107.928912	107.928912	7587.27275	1.3005E-53
	Residuos	47	0.66857473	0.01422499		
	Total	48	108.597487			
56 h	Regresión	1	107.044617	107.044617	8134.96017	2.5523E-54
	Residuos	47	0.61845379	0.01315859		
	Total	48	107.66307			
64 h	Regresión	1	108.365003	108.365003	6931.14581	1.075E-52
	Residuos	47	0.73482153	0.0156345		
	Total	48	109.099824			
72 h	Regresión	1	106.995729	106.995729	7144.53732	5.2958E-53
	Residuos	47	0.70386633	0.01497588		
	Total	48	107.699595			

Análisis de varianza del tratamiento 7						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	111.02877	111.02877	8273.10274	1.722E-54
	Residuos	47	0.6307612	0.01342045		
	Total	48	111.659531			
16 h	Regresión	1	111.951891	111.951891	7278.54266	3.4315E-53
	Residuos	47	0.72291105	0.01538109		
	Total	48	112.674802			
24 h	Regresión	1	111.347989	111.347989	7746.66207	8.0023E-54
	Residuos	47	0.67556264	0.01437367		
	Total	48	112.023551			
32 h	Regresión	1	111.286286	111.286286	8022.96658	3.5287E-54
	Residuos	47	0.65193534	0.01387096		
	Total	48	111.938221			
40 h	Regresión	1	108.508067	108.508067	7167.64646	4.9112E-53
	Residuos	47	0.71151377	0.01513859		
	Total	48	109.219581			
48 h	Regresión	1	112.10933	112.10933	7674.12444	9.9692E-54
	Residuos	47	0.68661103	0.01460875		
	Total	48	112.795941			
56 h	Regresión	1	111.035745	111.035745	12434.6022	1.2483E-58
	Residuos	47	0.41969015	0.00892958		
	Total	48	111.455435			
64 h	Regresión	1	116.075268	116.075268	9057.17587	2.074E-55
	Residuos	47	0.60234423	0.01281583		
	Total	48	116.677613			
72 h	Regresión	1	108.705231	108.705231	8061.76796	3.1525E-54
	Residuos	47	0.63375005	0.01348404		
	Total	48	109.338981			

Análisis de varianza del tratamiento 8						
Corrida		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Valor crítico de F
8 h	Regresión	1	108.231522	108.231522	8783.71879	4.247E-55
	Residuos	47	0.57912618	0.01232183		
	Total	48	108.810648			
16 h	Regresión	1	105.000486	105.000486	8969.29382	2.605E-55
	Residuos	47	0.55021309	0.01170666		
	Total	48	105.550699			
24 h	Regresión	1	105.373424	105.373424	8782.45805	4.2613E-55
	Residuos	47	0.56391399	0.01199817		
	Total	48	105.937338			
32 h	Regresión	1	105.704935	105.704935	8825.08991	3.8052E-55
	Residuos	47	0.56295539	0.01197777		
	Total	48	106.267891			
40 h	Regresión	1	105.491814	105.491814	8197.6303	2.1333E-54
	Residuos	47	0.60482299	0.01286857		
	Total	48	106.096637			
48 h	Regresión	1	107.032577	107.032577	8194.81516	2.1505E-54
	Residuos	47	0.61386755	0.01306101		
	Total	48	107.646444			
56 h	Regresión	1	107.671998	107.671998	9327.41273	1.0429E-55
	Residuos	47	0.54254958	0.01154361		
	Total	48	108.214547			
64 h	Regresión	1	108.01412	108.01412	9145.11336	1.6546E-55
	Residuos	47	0.5551231	0.01181113		
	Total	48	108.569243			
72 h	Regresión	1	107.538241	107.538241	8503.93726	9.0512E-55
	Residuos	47	0.59434791	0.0126457		
	Total	48	108.132588			