

UNELLEZ
VICERRECTORADO DE INFRAESTRUCTURA
Y PROCESOS INDUSTRIALES
PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR
SAN CARLOS – VENEZUELA



EFICIENCIA DEL LACTOSUERO DE LECHE DE BÚFALA EN LA
PRODUCCIÓN DE *Lactococcus lactis*
Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial

Br. Acevedo M. Carmen Y
Br. Palencia M. Yermal de la Chiquinquirá
Tutor: Prof. Ing. Gabriel Cravo

Octubre, 2016

UNELLEZ
VICERRECTORADO DE INFRAESTRUCTURA
Y PROCESOS INDUSTRIALES
PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR
SAN CARLOS – VENEZUELA



EFICIENCIA DEL LACTOSUERO DE LECHE DE BÚFALA EN LA
PRODUCCIÓN DE *Lactococcus lactis*

El Trabajo de Grado titulado “Eficiencia del Lactosuero de Leche de Búfala en la producción de *Lactococcus lactis*” presentado por las bachilleres: Acevedo M. Carmen Y., C.I: 13.079.368 y Palencia M. Yermal de la Chiquinquirá., C.I: 21.137.432, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero Agroindustrial**, fue aprobado en fecha 26 - 10 - 2016, por el siguiente jurado:

Prof. Ing. Jacovelin Morales de
Pérez

C.I: 13.971.493

Prof. Ing. Miguel Torrealba

C.I: 9.539.468

Prof. Ing. Gabriel Cravo

C.I: 13.806.954

Tutor - Coordinador

DEDICATORIA

Definitivamente en primer lugar dedico este logro a ti, mi gran **Dios** todo poderoso, mi luz, mi guía, mi creador, mi padre. Nunca has dejado de llenarme de bendiciones durante todo este camino, siempre he sentido tu amor y tu presencia, sé que nunca me has desamparado y por eso hoy te dedico este logro alcanzado.

A mi hermosa madre **Mireye Mora**, sin duda alguna eres ese gran regalo que Diosito me obsequio, nunca he dejado de sentirme tan afortunada de que seas mi madre, de tenerte a mi lado cada día, siempre aconsejándome y apoyándome en todo momento. Te amo mucho mami y hoy esto es para ti.

Al mejor padre del mundo, al mío... **Luis Palencia**. Siempre me he sentido orgullosa de la persona que eres, siempre tratando de hacer las cosas de manera justa para que este mundo sea mejor. Esta meta de la dedico a ti papi, porque te amo y porque siempre has estado ahí para aconsejarme y llenarme de amor.

A mi tía **Gladys**, Diosito fue demasiado generoso conmigo y me regalo una segunda madre.

A ti mi **Felicita**, mi viejita linda, yo nunca había conocido una persona tan buena como tú. Eres otra prueba de que Dios ha sido demasiado bueno conmigo al ponerte en mi camino.

A mi hermana **Yeremi**, por apoyarme cuando más he necesitado de ella y por el cariño que me brinda a su manera.

A mis niños **Esthefanna, Cristian, Santiago, Sofía, Valezca y Luis Carlos**, llegaron para llenarme de alegría con su inocencia y sus ocurrencias.

A mis primas hermanas **Nayibe, Berioskalina, Vanessa y Christynne María** a ustedes este logro porque siempre han estado ahí y son muy importantes para mí. Y por supuesto a ti **Jhonny**, el hombre entre tantas mujeres, igualmente esto es para ti.

A mis mascotas *Ysis, Casper y Minie*, solo Dios sabe el amor que yo siento por ustedes y el amor que ustedes me transmiten con sus colitas moviéndose y sus miradas que me llenan de felicidad, ningún ser humano podrá darme el amor más puro y sincero que el que ustedes hoy me dan; y por eso no podía dejar de nombrarlos aquí. Son mi alegría en cada día difícil, son una hermosa bendición de mi Dios.

En el transcurso de este viaje me he dado cuenta que sin duda alguna la vida es bella; está llena de momentos hermosos llenos de alegría pero, también de momentos llenos solo de tristeza y ahora es el turno de la tristeza; porque solo puedo sentir tristeza al escribir estas líneas, ya que van dedicadas a unos seres maravillosos que durante el transcurso de mi carrera partieron de este mundo para encontrarse con el más grande y poderoso. Debo sentirme feliz por ellos porque están en un lugar mejor pero la verdad es que solo me embarga la tristeza en este momento:

A ti tía *Carmen*, te fuiste al comienzo de este camino, nunca llegue a pensar que tu partida me iba a doler tanto, que iba a llegar a extrañarte tanto, desde que te fuiste las navidades no son iguales, tu ausencia es tan notoria como una rosa roja en un jardín de claveles blancos. Pero tengo la dicha y el consuelo que en mis sueños te veo y siempre me muestras las estrellas.

A ti mi *Mario José (marito)*, te me fuiste demasiado pronto, yo aún necesitaba compartir más tiempo contigo. Aun no logro olvidar el dolor que sentí cuando me dieron la peor noticia que me han dado en toda mi vida; tú trágica partida. Aun me cuesta creer que ya no estás, que ya no puedo ver tus hermosos ojos en persona. Mi único consuelo es que te llegue a conocer como nadie te conoció y fue en el momento indicado. Te quiero amigo y te extraño muchísimo.

A mi tío *Juan Rafael (sute)*, querido tío sé que siempre seré su niña bonita y que algún todos nos volveremos a reunir para seguir jugando caída como lo hacíamos antes. Su partida dejó un vacío que nadie nunca podrá llenar.

A mi abuelo *Elpidio*, fui dichosa por tener al abuelo más lindo de todos, espero nunca olvidar ese último momento en donde solo estábamos tú y yo sintiendo la brisa fresca y el olor a la naturaleza, ese momento exacto en el que te vi admirando tu alrededor y presintiendo que tu día estaba aún más cerca, y fui dichosa al poder tener ese momento hermoso contigo.

Yermal Palencia.

RECONOCIMIENTO

A mi **Dios** creador del cielo y de la tierra, sin él yo hoy no estaría donde me encuentro ahora. Tú has permitido que todo esto sea posible para mí. Gracias mi señor por tanto, por darme más de lo que realmente merezco, gracias por tus infinitas bendiciones, por haberme puesto en el camino a las personas correctas durante este viaje, por llenarme de salud y amor, y así poder lograr alcanzar mi meta.

A **mi madre**, gracias mami por tanto, por tu apoyo incondicional en todo momento, porque gracias a ti he logrado hacer las cosas bien y este logro es el resultado de todos los valores y principios que tú siempre me has inculcado, y del amor con que me has llenado toda mi vida.

A **mi padre**, gracias a ti papi hoy estoy culminando una meta más, a ti porque siempre has estado ahí para cuidarme y para aconsejarme siempre a tratar de hacer las cosas lo mejor posible, ya anhelo que llegue ese momento en el que seas tú quien me imponga la medalla, porque por ti es que hoy estoy aquí.

A todos **mis familiares; tías, tíos, primas, primos, madrinas, padrinos** gracias a todos por haberme apoyado siempre, por darme buenos deseos en todo momento y por haber sido parte de este hermoso viaje.

A mis compañeros y amigos; **Vicente, Víctor, Mario, Fermaris, Javier y Enrique** gracias por su amistad y el compañerismo que me brindaron y especialmente a **Carmen Acevedo**, gracias por haber aceptado ser parte de mi vida, no pude elegir una mejor compañera, de ti he aprendido que no importa lo duro que se ponga la cosa siempre hay que seguir hacia adelante, porque el que persevera alcanza. Espero que después de esto nuestra amistad siga aún más unida y fuerte.

Al *Lcdo. José Landaeta*, al *Ing. Antonio Martínez* y a *Mike*, gracias por su colaboración y apoyo el cual bridaron siempre, sin ustedes muchas cosas no hubiesen sido posibles. Gracias por tanto.

A los profesores *Llelysmar Crespo* y *Gabriel Cravo*, Gracias a ustedes por haber aceptado ser parte de este logro y por todos los conocimientos que adquirimos de parte de ustedes durante este proceso.

A la *Universidad Nacional Experimental Ezequiel Zamora (UNELLEZ)* por permitirme formarme como profesional.

A *tí...* que por alguna razón no me atrevo a nombrarte directamente, pero sé que si algún día llegas a leer estas líneas por cuestiones de la vida o de Dios, sabrás que son solo para ti. En este momento no puedo olvidar que una parte de este logro es gracias a ti; porque mientras estuviste a mi lado solo recibí de ti apoyo incondicional y amor en todo momento; hoy ya no estamos juntos pero aun así tengo que agradecerte lo que hiciste por mí. Gracias por todo... y si algún día se vuelven a juntar nuestros caminos que sea porque así Dios lo quiere.

Yermal Palencia.

DEDICATORIA

Primeramente a **Dios**, porque sin él nada sería posible en el mundo... Ya que nunca me abandona y me da la fortaleza que necesito para poder avanzar en todo proyecto que me propongo a lograr, en esos momentos en los que he sentido que no puedo, con su infinita bondad me ha demostrado que hay que seguir adelante vencer cualquier obstáculo, adversidades o barreras que se presentan en el día a día e ir detrás de mis sueños y ser constante, paciente y ante todo perseverar para alcanzar mis metas. A **San Miguel Arcángel**, mi ángel protector, ese guía de luz quien me cuida y me guía en todo momento, quien me ha inspirado para ser guerrera y luchar por lo que quiero.

A mis padres, a los que Amo profundamente **Carmen Machado y Francisco Acevedo** que me dieron la vida con la gracia de Dios, a ellos por ser un apoyo incondicional, por creer en mí en todo momento, por hacer de mí la mujer que soy y por hacerme ver que nunca es tarde para lograr una meta soñada. Y que todo con sacrificio, esfuerzo es un logro satisfactorio. A mis hermanos **Adashy y Hernán** por darme aliento, ánimos e impulso para seguir de pie en los momentos difíciles.

A mi esposo **Axel** y a mi hijo **Axel Miguel** que son el amor de mi vida y los motores que me impulsan con motivación a seguir con optimismo todos aquellos objetivos que me permiten crecer como ser humano... Por todo su amor y comprensión en todo momento, esto es para ustedes...

A mis abuelos **Alejo, Silveria, Eutimia, y Valerio** que desde el cielo me acompañan y celebran conmigo este gran logro, gracias por todo lo bueno que en vida me enseñaron.

Carmen Acevedo.

RECONOCIMIENTO

A todos los profesores de mi casa de estudio **UNELLEZ** que participaron en mi formación académica, transmitiendo sus conocimientos con la mayor ética y compromiso posible.

Al profesor **Ing. Gabriel Cravo** por ser tutor, asesor, guía y colaborador en el desarrollo de este trabajo.

Al profesor **Ing. José Antonio Martínez** por su asistencia técnica, su valiosa ayuda, dedicación y apoyo a través de sus conocimientos y experiencia, aclarando mis dudas en todo momento.

A la profesora **Ing. Lleylsmar Crespo** por su paciencia, orientación, ayuda invaluable, su profesionalismo y por haber sido una excelente profesora de la cual aprendí mucho.

Al personal técnico del LITA y al **Lcdo. José Landaeta** por su valiosa amistad, por brindarme una palabra de aliento, un consejo en todo momento en que lo necesite.

A mis amigos y compañeros; **Vicente, Víctor, Enrique, Javier, Mario** y **Fermaris** por su amistad y colaboración durante el desarrollo de este proyecto. A **Yermal Palencia** por su valiosa amistad, por haber sido compañera incondicional durante todo este camino de esfuerzo y sacrificio.

A mis suegros **Luisa** y **Alexis** por su apoyo incondicional, en los momentos difíciles, por estar allí cuando más los necesite.

Y a todas aquellas personas que de una manera u otra contribuyeron en el logro y cristalizaron este sueño.

Mil Gracias !!!

Carmen Acevedo.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS.....	xiv
INDICE DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	2
I.1. EL PROBLEMA.....	2
I.1.1. Planteamiento del problema.....	2
I.1.2. Formulación del problema.....	5
I.1.3. Formulación de los objetivos.....	5
I.1.3.1. Objetivo General.....	5
I.1.3.2. Objetivos Específicos.....	6
I.1.4. Evaluación del problema.....	6
I.1.4.1. Importancia.....	6
I.1.4.2. Interés.....	7
I.1.4.3. Novedad.....	7
I.1.5. Justificación.....	8
I.1.6. Alcances y limitaciones.....	9

I.1.6.1. Alcances.....	9
I.1.6.2. Limitaciones.....	9
I.1.7. Ubicación geográfica.....	9
CAPÍTULO II.....	10
II.1. MARCO TEÓRICO.....	10
II.1.1. Antecedentes de la investigación.....	10
II.1.2. Bases Teóricas.....	12
II.1.2.1. Lactosuero.....	12
II.1.2.2. Leche de búfala.....	14
II.1.2.3. <i>Lactococcus lactis</i>	15
II.1.2.4. Crecimiento microbiano.....	17
II.1.2.5. Parámetros cinéticos.....	21
II.1.2.5.1. Temperatura.....	21
II.1.2.5.2. pH.....	22
II.1.2.5.3. Oxígeno disuelto.....	22
II.1.2.6. Biorreactor o fermentador.....	23
II.1.2.6.1. Tipos de biorreactores.....	23
II.1.2.6.2. Diseño e instrumentación de biorreactores.....	24
II.1.2.6.3. Modos de operación.....	25

II.1.2.7. Eficiencia.....	25
II.1.2.8. Análisis envolvente de datos (DEA).....	26
II.1.2.9. Lógica difusa.....	27
II.1.3. Definición de términos básicos.....	28
CAPÍTULO III.....	34
III.1. MARCO METODOLÓGICO.....	34
III.1.1. Tipo de investigación.....	34
III.1.2. Población y muestra.....	35
III.1.3. Diseño de la investigación.....	35
III.1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
III.1.4.1. Materiales, equipos y reactivos empleados en la investigación.....	36
III.1.4.2. Métodos.....	38
III.1.4.2.1. Preparación de los medios de cultivo.....	41
III.1.4.2.2. Proceso biotecnológico (fermentación semicontinua).....	43
III.1.5. Técnicas de recolección de datos.....	47
III.1.6. Recuento en placas.....	48
III.1.7. Técnicas de análisis de datos.....	49
CAPÍTULO IV.....	50
IV.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
IV.1. Caracterización del lactosuero de leche de búfala esterilizado.....	50

IV.1.2. Simulación y comportamiento del modelo de proceso seleccionado.....	51
IV.1.3. Evaluación de la eficiencia con el análisis envolvente de datos (DEA).....	55
IV.1.4. Efectividad del microorganismo validada a través del software Matlab, Toolbox lógica difusa.....	63
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXOS.....	84

INDICE DE TABLAS

1. Composición general del suero de leche dulce y ácido.....	14
2. Propiedades fisicoquímicas de la leche de búfala.....	15
3. Caracterización del lactosuero de leche de búfala esterilizado.....	50
4. Descriptivos para la biomasa de <i>Lactococcus lactis</i>	60
5. Descriptivos para los sólidos totales (⁰ Brix) de <i>Lactococcus lactis</i>	61
6. Pruebas de normalidad.....	63

INDICE DE FIGURAS

1. Curva de crecimiento microbiano.....	18
2. Variación de la biomasa de un cultivo a lo largo del tiempo.....	19
3. Estructura de la fructosa.....	31
4. Preparación de diluciones.....	45
5. Diagrama de Proceso de elaboración del queso gouda.....	46
6. Concentración de Biomasa de <i>Lactococcus lactis</i> en lactosuero de leche de Búfala al 12,5 % de fructosa (Ufc) Vs Tiempo (h).....	51
7. Concentración de Biomasa de <i>Lactococcus lactis</i> en lactosuero de leche de Búfala al 10% de fructosa (Ufc) Vs Tiempo (h).....	52
8. Concentración de Biomasa de <i>Lactococcus lactis</i> en lactosuero leche de Búfala al 7,5 % de fructosa Vs Tiempo (h).....	53
9. Sólidos Totales (⁰ Brix) vs Tiempo.....	54
10. Diagrama de Proceso del Sistema Simulado.....	55
11. Eficiencia del sustrato lactosuero de leche de cabra (%).....	56
12. Eficiencia del sustrato lactosuero de leche de búfala (%).....	57
13. Correlación entre la eficiencia (%) y la biomasa para el lactosuero de Leche de búfala (Ufc).....	58
14. Comparación de la eficiencia para los diferentes sustratos.....	59

15. Estructura Difusa tipo Mandani.....	64
16. Funciones de pertenencia del atributo aceptación.....	65
17. Reglas Difusas para el sistema tipo Mandani.....	66
18. Reglas Difusas para el sistema tipo Mandani.....	67
19. Superficie de acción de control del sistema para el atributo color y sabor.....	68
20. Superficie de acción de control del sistema para el atributo textura y sabor.....	69
21. Superficie de acción de control del sistema para el atributo color y textura.....	70

UNELLEZ
VICERRECTORADO DE INFRAESTRUCTURA
Y PROCESOS INDUSTRIALES
PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR
SAN CARLOS – VENEZUELA

RESUMEN

**EFICIENCIA DEL LACTOSUERO DE LECHE DE BÚFALA EN LA
PRODUCCIÓN DE *Lactococcus lactis***

Autores:

Br. Acevedo M. Carmen Y

Br. Palencia M. Yermal de la Chiquinquirá

Tutor: Prof. Ing. Gabriel Cravo

La finalidad de la presente investigación fue la evaluación de la eficacia del lactosuero de leche de búfala en la producción de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454), dándole un uso al lactosuero como sustrato. Este último resulta ser uno de los mayores contaminantes que existe en la industria alimentaria, además de ser poco valorado para la cantidad de nutrientes que presenta en su composición; gran parte de las vitaminas y minerales de la leche están presentes en el lactosuero. Es por esta razón que resulta oportuno el uso del lactosuero como sustrato para el desarrollo de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454), ya que este microorganismo láctico posee necesidades nutricionales complejas que el lactosuero de leche de búfala puede cubrir. El mismo fue acondicionado con una temperatura de 36°C y un pH 6 con una concentración de fructosa diferente para cada corrida; donde se trabajó con 12,5%, 10% y 7,5% Siendo la última la de mejores resultados, donde obtuvo un rango cercano a 9×10^9 Ufc de *Lactococcus lactis*. Mientras que para 12,5% fue de 4×10^4 Ufc y $2,1 \times 10^8$ Ufc para 10%. Por medio del análisis envolvente de datos (DEA) se midió la eficiencia y además se realizó una comparación entre el lactosuero de leche búfala y lactosuero de leche cabra, para conocer en cuál de los dos se comportó mejor el microorganismo láctico. El resultado fue de 1000% de eficiencia para el lactosuero de leche de búfala y 200% de eficiencia para el lactosuero de leche de cabra; comprobando así que el lactosuero de leche de búfala es altamente eficiente en la producción de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).

Palabras claves: Lactosuero, *Lactococcus lactis* y eficiencia.

UNELLEZ
VICERRECTORADO DE INFRAESTRUCTURA
Y PROCESOS INDUSTRIALES
PROGRAMA CIENCIAS DEL AGRO Y DEL MAR
SAN CARLOS – VENEZUELA

SUMMARY

EFFICIENCY WHEY IN BUFFALO MILK PRODUCTION *Lactococcus lactis*

Autores:

Br. Acevedo M. Carmen Y

Br. Palencia M. Yermal de la Chiquinquirá

Tutor: Prof. Ing. Gabriel Cravo

The purpose of this research is the evaluation of the effectiveness of buffalo milk whey in the production of *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454), giving an application to whey as substrate. The latter turns out to be one of the biggest polluters that exist in the food industry, besides being underrated for the amount of nutrients present in its composition; much of the vitamins and minerals are present in milk whey. It is for this reason that it is appropriate to use whey as a substrate for the development of *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454), as this lactic microorganism has complex nutritional needs that buffalo milk whey can cover. The same was fitted with a temperature of 36 ° C and a pH 6 with a concentration of fructose different for each run; where he worked with 12.5%, 10% and 7.5% last being the best results where he obtained a range close to 9 x 10⁹ CFU of *Lactococcus lactis*. While for 12.5% it was 4 x 10⁴ CFU and 2.1 x 10⁸ CFU to 10%. Through data envelopment analysis (DEA) efficiency was measured and also a comparison between buffalo milk whey milk and goat milk whey was performed to know which of the two lactic microorganism performed better. The result was 1000% efficiency for buffalo milk whey and 200% efficiency for goat milk whey; thus proving that the buffalo milk whey is highly efficient in producing *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).

Keywords: Whey, *Lactococcus lactis* and efficiency.

INTRODUCCIÓN

A través del tiempo la industria alimentaria en su desarrollo ha luchado por reducir el uso de conservantes químicos, buscando así que los alimentos procesados mantengan su calidad y seguridad al ser ingeridos por los consumidores. Elaborar productos donde se apliquen métodos para alargar la vida útil, ejerciendo un control en las fermentaciones y biopreservación de estos.

En este propósito, los microorganismos lácticos constituyen un grupo importante como cultivos iniciadores, participando en la transformación como es el caso de la maduración. Es evidente entonces, que el *Lactococcus lactis* es una alternativa para tal fin.

El lactosuero representa un subproducto en el proceso de elaboración del queso, el cual en muchas ocasiones no es bien aprovechado a pesar de los nutrientes que este posee y su alto valor biológico. Con referencia a lo anterior, el lactosuero de leche de búfala representa una buena opción como sustrato para la producción del *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) porque su valor nutricional es mayor al de la leche común.

Sobre la base de las consideraciones anteriores la investigación se enfocó en determinar qué tan eficiente puede ser este sustrato en la producción (biomasa) de *Lactococcus lactis* al ser comparada con la obtenida a través de leche de cabra como sustrato. Por ello se empleó el análisis envolvente de datos (DEA), el cual es una técnica de programación matemática utilizada para la medición de eficiencias. Se emplearon concentraciones de fructosa diferentes: 12,5 %; 10 % y 7,5 % respectivamente, buscando optimizar la salida (Biomasa) en función de las entradas (Sólidos totales, pH y Temperatura).

CAPITULO I

I.1. EL PROBLEMA

I.1.1. Planteamiento del problema

Los microorganismos lácticos constituyen un grupo de gran importancia desde el punto de vista aplicado, por esto son los componentes fundamentales de muchos de los cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria. Participan en la transformación primaria, y en muchos casos en la maduración, de una gran variedad de alimentos fermentados donde se incluyen, entre otros, derivados lácteos, vegetales y cárnicos, productos de panadería, bebidas alcohólicas y también ensilados (Gilliland, 1986, citado por Martínez 1996).

La mayoría de los microorganismos lácticos sólo pueden obtener energía a partir de azúcares y otros compuestos relacionados. Debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio *et al.*, 1994, citado por Martínez 1996).

El *Lactococcus lactis* se presenta en forma de coco agrupándose en pares y en cadenas cortas (0,5 a 1,5 μm). Son gram positivo, no esporulante e inmóvil. Son anaerobios aerotolerantes ya que, aunque en general carecen de catalasa, poseen peroxidasas y superóxidodismutasas que destruyen, respectivamente, el H₂O₂ y el O₂- que se forman en condiciones de aerobiosis. Este microorganismo es utilizado en la producción de algunos quesos como lo son: el Cheddar, Gruyère, Parmesano y Roquefort, entre otros.

El mismo es un microorganismo mesófilo, capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas en forma genérica como, bacteriocinas (Nisina) de amplio espectro que se utilizan en varias aplicaciones a nivel industrial para la biopreservación, la extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y para el control de las fermentaciones (Valbuena *et al*; 2005).

Cabe agregar, que la industria lo utiliza para reducir el uso de conservantes químicos y suavizar los tratamientos a los que se someten los alimentos procesados sin que afecten su calidad y seguridad. Son utilizados especialmente en productos lácteos como el queso Gouda y el queso Emmenthal. Es la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, Codex Alimentarius; en su norma estándar para quesos, la nisina puede ser usada en una concentración 12,5 mg/kg (CODEX STAN 283-1978) (Sierra, 2012).

Por otra parte, Bounous y Kongshavn (1988), describen el lacto suero como un líquido obtenido en el proceso de fabricación del queso, después de la separación de la cuajada. Sus características corresponden a un líquido fluido, de color verdoso amarillento, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido, con un contenido de nutrientes o extracto seco del 5.5% al 7% provenientes de la leche. El lactosuero se considera un subproducto de la industria láctea que posee cerca del 20% de las proteínas que se encuentran en la leche, ellas tienen un alto valor biológico; es decir, que son absorbidas casi en su totalidad por el sistema digestivo en donde cumplen múltiples funciones bio-activas tales como: fortalecer el sistema inmunológico. Además promoción de la reparación tisular, mantenimiento de la integridad intestinal, destrucción de patógenos y eliminación de toxinas entre otros (Clare y Swaisgoodhe, 2000, citado por Walzem *et al.*, 2002).

El lactosuero es uno de los mayores contaminantes que existe en la industria alimentaria. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado debido a que no se puede comercializar de forma directa como suero líquido para el consumo humano, sin embargo, al ser tratado por diferentes técnicas se extrae una parte de sus componentes (lactosa y proteínas), que resultan ser fuentes potenciales para la alimentación humana. Pero aun así solo una pequeña parte del subproducto se utiliza para estos fines, quedando todavía gran cantidad del efluente sin utilizar; lo que conlleva al desecho del mismo. Esta acción afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto (Aider *et al.*, 2009). El lactosuero presenta una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) dentro de un rango de 30,000-50,000 mg/L, siendo su disposición difícil y costosa. La presencia de lactosa en el lactosuero es la principal responsable para este valor de DBO alta (Mukhopadhyay *et al.*, 2005, citado por Parra 2009). Es por esto que el lactosuero es considerado uno de los subproductos más contaminantes de la industria alimentaria.

La leche de búfala tiene un sabor peculiar, levemente endulzado y color muy blanco, debido a la ausencia de caroteno en la grasa, es un excelente suplemento de proteína, vitamina, sales minerales, y otros valiosos nutrientes así como las calorías. Al compararla con la vacuna y humana, la bufalina presenta mayor valor energético. Uno de los atractivos de los derivados de la leche de búfala es su valor nutricional ya que tiene mayor porcentaje de vitaminas, proteínas y minerales.

Cabe agregar, que en su composición química la leche bufalina presenta mayores valores de sólidos totales, grasa, proteína y lactosa, además de calorías que la bovina y valores similares de cenizas. La leche de búfala tiene un 25,5 % más de aminoácidos esenciales que la leche de vaca, a excepción de cistina y triptófano.

Resulta oportuno indicar que, el análisis envolvente de datos (DEA) es un procedimiento no paramétrico que utiliza una técnica de programación lineal y que va a permitir la evaluación de la eficiencia relativa de un conjunto de unidades productivas homogéneas. El DEA trata de optimizar la medida de eficiencia de cada unidad analizada, para crear así una frontera eficiente basada en el criterio del óptimo de Pareto donde, se busca un punto de equilibrio en el que ninguno de los agentes afectados puede mejorar su situación sin reducir el bienestar de cualquier otro agente. (Sabarrieta, N.; 2008).

I.1.2. Formulación del problema

Por lo anterior expuesto referente al *Lactococcus lactis*, el lactosuero y la leche de búfala, con el presente trabajo de investigación pretende determinar la eficiencia, por medio del análisis envolvente de datos (DEA), del lactosuero de leche proveniente de la leche de búfala en la producción de un cultivo del *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454). Aprovechando así los beneficios nutritivos que aporta el lactosuero; y dándole una nueva aplicación como sustrato, para evitar el desperdicio del mismo. Además que la leche de búfala presenta un valor nutricional más alto comparada con la leche bovina por lo que representa un medio apto para el desarrollo de microorganismos beneficiosos para la industria alimentaria.

I.1.3. Formulación de los objetivos

I.1.3.1. Objetivo General

Determinar la eficiencia del lactosuero de leche de búfala en la producción de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).

I.1.3.2 Objetivos Específicos.

- Caracterizar física y químicamente el sustrato (lactosuero de leche de búfala) a emplear en la producción del microorganismo *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).
- Establecer la concentración óptima del sustrato (lactosuero de leche de búfala) en la producción de biomasa de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).
- Determinar los parámetros cinéticos tasa de crecimiento y velocidad de reacción, que caracterizan al microorganismo *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).
- Evaluar la eficiencia de los sustratos (lactosuero de leche de búfala y lactosuero de leche de cabra) utilizando análisis envolvente de datos (DEA).
- Elaborar un queso tipo gouda a escala de laboratorio a fin de comprobar la efectividad del microorganismo.

I.1.4. Evaluación del problema

El problema se evalúa bajo tres criterios: importancia, interés y novedad.

I.1.4.1. Importancia

A través de la presente investigación se pretende determinar la eficiencia del suero de leche de búfala en la producción de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454). La leche de búfala posee 25,5% más de aminoácidos esenciales, grasa y proteína que la leche de vaca. Por tal motivo el suero de la leche de búfala posee proteínas y lactosa, nutrientes que pueden proporcionar un sustrato óptimo para el desarrollo de este microorganismo, el cual tiene la propiedad de aportar acción antimicrobiana y

conservante natural para prolongan la vida útil de diversos productos lácteos pasteurizados.

En este mismo orden y dirección el empleo del lactosuero de leche de búfala proporciona un buen uso a este subproducto poco aprovechado y que generalmente es desechado convirtiéndose en un contaminante para el medio ambiente.

De esta manera la investigación busca darle una utilidad creando una alternativa funcional como medio de sustrato a este tipo de microorganismo que inhibe el crecimiento de otras bacterias lácticas patógenas durante la maduración de los quesos y además la misma no es perjudicial para la salud.

I.1.4.2. Interés

El interés de esta investigación radica en el aprovechamiento del lactosuero; un subproducto originado por la industria quesera, que no es lo suficientemente aprovechado. Este es rico en nutrientes que lo hacen un medio favorecedor para la producción de biomasa del *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454), dándole así al subproducto un nuevo uso y evitando su desperdicio al ambiente.

Por otra parte, es importante medir la eficiencia de este sustrato (lactosuero de leche de búfala) utilizando análisis envolvente de datos (DEA) para la optimización y determinación de la viabilidad del uso del mismo en la producción del microorganismo.

I.1.4.3. Novedad

Por lo general el lactosuero es proveniente de la elaboración de queso fresco de leche de vaca; sin embargo, la leche de búfala es mucho más rica en grasa,

proteínas y minerales que la leche bovina, por lo cual el lactosuero de la leche de búfala resulta ser un medio apto para el desarrollo *del Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) por contener mayor porcentaje de nutrientes.

I.1.5. Justificación

El proyecto de investigación se encuentra enmarcado en el plan general de investigación de la UNELLEZ 2008-2012, en el área Ciencias del Agro y Ambientales, esta área comprende las investigaciones referidas al estudio de los sistemas de producción agrícola y sus vinculaciones con los componentes socioeconómicos, aunado a esto se centra en las líneas de investigación, estudio y mejoramiento de la genética vegetal y animal, estudios biotecnológicos, moleculares y celulares.

Por otra parte, el lactosuero de leche es el subproducto más abundante de la industria láctea, es el residual obtenido de la manufactura del queso. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado porque sus características no lo hacen apto para su comercialización directa, el mismo es tratado como un desperdicio que trae como consecuencia daños al ambiente.

Por esta razón, los procesos de bioconversión surgen como una alternativa para el aprovechamiento de este desecho como sustrato para el crecimiento de microorganismos capaces de producir sustancias, como el ácido láctico, ampliamente usado en la industria alimenticia.

El establecer la concentración óptima y evaluar la eficiencia de este sustrato permitirá comprobar la efectividad del microorganismo, a fin de obtener un producto final (queso tipo gouda) que posea buena aceptación y alto valor nutritivo.

I.1.6. Alcances y limitaciones

I.1.6.1. Alcances

La presente investigación se basó en evaluar la eficiencia del lactosuero de leche de búfala en la producción de la cepa *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454). La misma se realizó a nivel de laboratorio utilizando un biorreactor vertical con un volumen de trabajo de 1,8lts. Se trabajó con temperaturas de 34°C y 36°C, con un pH 6 y concentraciones de fructosa diferentes en cada corrida microbiológica (12,5%; 10% y 7,5%). La variación de las concentraciones se debió para determinar con cual creció mejor el microorganismo láctico. La generación de la biomasa fue discontinua y cada periodo de trabajo fue de un máximo de 12 horas seguidas.

I.1.6.2. Limitaciones

Esta investigación tuvo como limitantes la adquisición de todos los insumos a utilizar como; agar plate cout, agua peptonada, fructosa, caldo nutritivo, entre otros.

Esto debido a la escasez y al elevado costo que presentaban cada uno de ellos al momento de encontrarlos, y el tiempo que se tardaba para realizar los trámites de envío. Además de los problemas internos que se presentaban en el laboratorio; ya sea por falta de luz, falta de agua o cualquier otro inconveniente con los equipos e intencillos a utilizar.

I.1.7. Ubicación geográfica

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Alimentos (LITA) del Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales (VIPI), en el municipio Ezequiel Zamora, parroquia San Carlos de Austria del Estado Cojedes- Venezuela.

CAPITULO II

II.1. MARCO TEORICO

II.1.1. Antecedentes de la investigación

Con referencia a lo anterior, Mago y Natera (2012), estudiaron el diseño de una estrategia de control para la producción de *Lactococcus lactis* utilizando como sustrato lactosuero de leche de cabra. El objetivo de la investigación fue el diseño de un estrategia de control para la producción de *Lactococcus lactis* CVCM 614, en un sustrato de bajo costo como lo es el lactosuero de leche de cabra, el mismo fue acondicionado con tres formulaciones en donde se varió la concentración de sacarosa con concentraciones de 10%; 15% y 20%, y se evaluó durante 12 horas el consumo del sustrato y cada hora se realizaron siembras en profundidad en placas de Petri, con diluciones de 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} , 10^{-1} . Como resultado se obtuvo que la estrategia de control que más se adaptó al proceso de generación de biomasa, fue la de control difuso, la formulación empleada para la simulación en el programa Matlab fue la de 20% de sacarosa, con la cual se obtuvo mejores resultados en cuanto a crecimiento y consumo de sustrato.

El antecedente anterior descrito, se relaciona con la investigación propuesta, en el estudio del crecimiento del microorganismos *Lactococcus lactis* a través de un sustrato no convencional como lo es el lactosuero de leche de cabra, sustrato también rico en vitaminas que servirá de base al momento de comparar la eficiencia en la producción del microorganismo.

Por otra parte, Piña *et al.* (2011), Estudiaron la producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersion. Evaluaron la producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 en biorreactor en suero de leche suplementado a pH controlado (5,5; 6,0 y 6.5). Los tiempos de fermentación fueron de 24 h, El cultivo bacteriano creció de forma constante y se comprobó que el suero de leche puede ser

empleado como medio de cultivo para la producción de nisina por *Lactococcus lactis*UQ2.

Vielma *et al.*, (2004). Realizaron una investigación sobre la producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. Se estudió el cultivo continuo de la bacteria *Lactobacillus helveticus* ATCC 8018 en suero de leche desproteínizado y suplementado con 20 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona tripsina de caseína, como una función de la tasa de dilución a pH 5,9 y temperatura de 40°C, condiciones adecuadas de crecimiento del microorganismo previamente determinadas en cultivo por carga. Se utilizó un biorreactor con un volumen de trabajo de 4 L y controles automáticos de los flujos de alimentación, extracción, temperatura, pH y velocidad de agitación. La máxima concentración de biomasa y ácido láctico fue de 55 y 10,97 kg/m³ respectivamente y se alcanzaron a D= 0,1 h. La máxima productividad de biomasa y ácido láctico fue 6,2 y 1,83 kg/m³.h respectivamente a D= 0,2 h⁻¹. Estos resultados revelan y sugieren el potencial uso del lactosuero como sustrato para bacterias homolácticas.

Las dos antecedentes anteriores indica el potencial que tiene el lactosuero de leche como un sustrato tanto en la producción de nisina por *Lactococcus lactis*, como para la producción de ácido láctico al trabajar con *Lactobacillus helveticus*

Finalmente Martínez, *et al.*, (2009), evaluaron la influencia de la temperatura en el crecimiento de la cepa Lc. Lactis. 166cVCOR bajo condiciones de cultivo en lote. Determinaron el crecimiento celular en medio Elliker inoculado al 2% a 15, 19, 25, 30, 35, 40 y 45°C, midiendo la absorbancia a 560 nm y el recuento de células viables mediante recuento en placa usando Agar (1,5%) Elliker. Obteniendo mejores respuestas de crecimiento a 30 y 35°C, la fase de latencia se prolongó una hora adicional respecto de la generada a 35°C, indicando que el microorganismo invirtió mayor cantidad de tiempo en adecuar su metabolismo al sistema reinante a esa temperatura.

La cinética de crecimiento a la temperatura óptima (35°C) mostró que la cepa en estudio alcanzó una carga máxima de células viables de $1,01 \times 10^9$ UFC al cabo de 8h.

El estudio antes descrito proporcionó información valiosa para el desarrollo de la investigación debido a que muestra los rangos óptimos de temperatura para el desarrollo de *lactococcus lactis* cepa 166cVCOR, estableciendo así una referencia al momento de realizar las corridas en el laboratorio.

II.1.2. Bases teóricas

II.1.2.1. Lactosuero

El lactosuero es definido como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso” (Foegeding y Luck, 2002). Es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína (Jelen, 2003).

La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso. A partir de estas diferencias se encuentran los tipos de lactosuero (Poveda, 2013). Los dos tipos más comunes de suero de leche son el dulce y el ácido.

El suero dulce se obtiene de la elaboración del queso mediante el uso de enzimas proteolíticas o cuajo, las cuales actúan sobre las caseínas de la leche y las fragmentan, haciendo que éstas se desestabilicen y precipiten, todo esto bajo condiciones específicas de temperatura, aproximadamente entre 15-50 °C, con un pH levemente ácido.

Por otro lado, el suero ácido se genera mediante la precipitación ácida de la caseína, la cual se logra disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4,5 o 4,6. A este pH se alcanza el punto isoeléctrico de la mayoría de las caseínas presentes; en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas (Jovanovic *et al.*, 2005). En la tabla 1 se muestra la composición general del lactosuero dulce y lactosuero ácido.

Se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90% del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55% de sus nutrientes (Liu *et al.*, 2005), como lactosa, albúmina y la mayor parte de los minerales de la leche. Además, presenta características funcionales para ser procesado como alimento para la humanidad. Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, el lactosuero se ha convertido en una materia prima conveniente para obtener diferentes productos a nivel tecnológico. Se ha establecido que es posible transferir diversas propiedades funcionales identificadas en el suero de leche a nuevos productos alimenticios. Por tal motivo, se ha incrementado el uso de proteínas de suero de leche como ingredientes en alimentos fisiológicamente funcionales (Morr y Ha, 1993). Sin embargo el lactosuero Sin embargo el lactosuero la mayoría de las veces es tratado como un desperdicio por la industria quesera, generando así problemas ambientales ya que la demanda biológica de oxígeno (DBO) es de aproximadamente 40000 mg/L, mientras las aguas residuales para lácteos deben estar cercano a los 100 mg/L. (Beardsley *et al.*, 1996).

Tabla 1. Composición general del suero de leche dulce y ácido

Componentes (g/l)	Suero de leche dulce	Suero de leche ácido
Sólidos totales	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactosa	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Grasa	0,0 – 5,0	0,0 – 5,0
Proteína	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fósforo	0,4 – 0,7	0,5 – 0,6
Potasio	1,4 – 1, 6	1,4 – 1, 6
Cloruros	2,0 – 2,2	2,0 – 2,2

Fuente: Panesar (2007); Callejas (2012).

II.1.2.2. Leche de búfala

Las características fisicoquímicas (tabla 2) y organolépticas de la leche de búfala facilitan su identificación: presenta un sabor peculiar, levemente endulzado y color blanco, debido a la ausencia casi total de carotenos en su grasa (Andrade *et al.*, 2010; Patiño, 2004). Cada vez es mayor el interés en investigaciones e inversión por la leche de búfala en varios países, debido principalmente a su atractivo contenido de nutrientes. En comparación con la leche de vaca, la leche de búfala tiene un mayor contenido de grasa, proteína cruda, lactosa, sólidos totales, vitaminas y minerales, que la convierten en un ingrediente adecuado para la fabricación de una amplia variedad de productos lácteos, tales como queso, mantequilla, helados y yogurt (Ahmad *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2012).

La riqueza de la leche de búfala permite la economía en la producción de alguno de estos alimentos; ya que por ejemplo, para elaborar 1kg de queso se requieren de 8 litros de leche de vaca, mientras que solamente se requieren de 4 a 5 litros de leche de búfala. Así mismo para la producción de 1 kg de mantequilla se necesitan de 14 litros de leche de vaca y solamente 10 litros de leche de búfala (Carrero, 1997, citado por Bríñez *et al*; 2000).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la leche de búfala

Variable	Medida
Densidad (g/ml)	1,0307
Acidez (°Dornic)	19,65
pH	6,71
Sólidos totales (%)	16,35
Grasa (%)	7,22
Proteína (%)	3,85
Lactosa (%)	4,49
Cenizas (%)	0,83

Fuente: Patiño (2003)

II.1.2.3. *Lactococcus lactis*

Los *Lactococcus* son cocos no esporulados, inmóviles, crecen a 10°C pero no a 45°C, se encuentran en parejas o cadenas cortas, catalasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentativos y con necesidades nutricionales complejas. La longitud de la cadena depende principalmente de la cepa y en ocasiones por el medio de crecimiento.

Antiguamente incluidos en el género *Streptococcus*, han sido elevados a la categoría de género, siendo admitidas las cuatro especies y tres subespecies siguientes (Prescott *et al.*, 1999; Jay, 2000):

- *Lc. Lactis subesp. Lactis*
- *Lc. Lactis subesp. Cremoris*
- *Lc. Lactis subesp. Hordniae*
- *Lc. Garvieae*
- *Lc. Plantarum*
- *Lc. Raffinolactis*

El *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* es un microorganismo mesófilo, capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas en forma genérica como bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina. Ambos factores, acidez y bacteriocinas, son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos. Además es muy utilizado como cultivo iniciador principalmente en quesos madurados (Valbuena *et al.*; 2005).

Lactococcus lactis subesp. Lactis fue aislada por primera vez en 1873 por Joseph Lister en leche fermentada, denominándola *Bacterium lactis* y reconociéndola como agente primario en la acidificación de la leche coagulada; es la BAL más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular en quesos y leches diversas (Leveau y Bouix, 2000).

II.1.2.4. Crecimiento microbiano

La multiplicación celular es una consecuencia directa del crecimiento y da lugar, en el caso de las bacterias, a colonias, mediante un sistema de reproducción asexual denominado división binaria. Los procesos sintéticos involucrados en el crecimiento bacteriano incluyen más de 2000 reacciones bioquímicas. (Molina y Uribarren, 2011).

Cuando una célula aislada comienza a crecer sobre un sustrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula viva y aislada que se encuentra en un sustrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo. Una UFC también puede corresponder a más de una célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente (estreptococos o diplococos, por ejemplo) ya que cada grupo formará una sola colonia.

García (2014) Explica las cuatro fases del crecimiento (figura 1) de los microorganismos:

Fase de Latencia: La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente. En esta fase no hay incremento de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células.

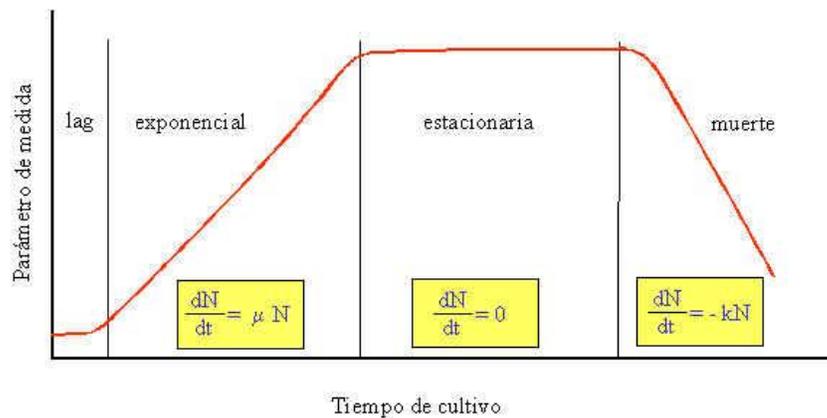


Figura1. Curva de crecimiento microbiano

Fuente: Buchanan y Solberg (1972)

La duración de esta fase puede variar dependiendo del crecimiento de las células en el inóculo, el cual debe tener una edad tal que la mayor parte de las células que contiene deben encontrarse en fase exponencial y metabólicamente activas (Barrera, 2004, citado por Durango, 2007). Es recomendable utilizar inóculos entre aproximadamente 5 y 10% del volumen total del reactor con el fin de reducir el tiempo de latencia (Soto, 2004, citado por Durango, 2007).

Fase exponencial o logarítmica: En esta fase las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento. Es el periodo de la curva del crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir, que cada vez que pasa un cierto tiempo de generación la población se duplica. Este crecimiento de las células se puede describir cuantitativamente como la duplicación del número de células o biomasa por unidad de tiempo (figura 2). Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima.

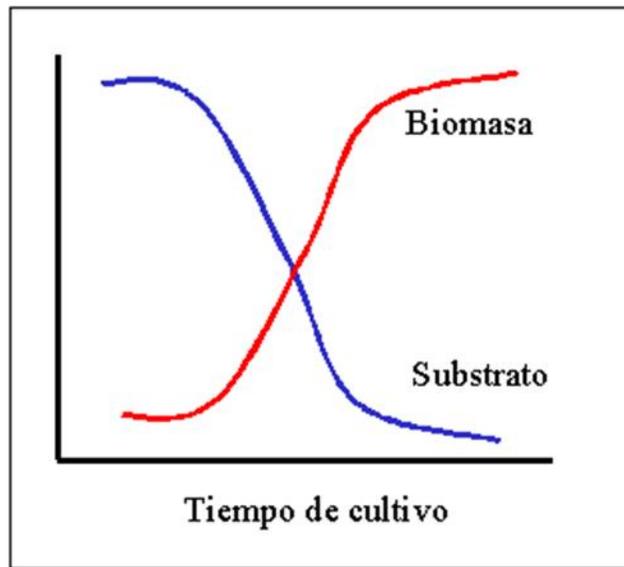


Figura 2. Variación de la biomasa de un cultivo a lo largo del tiempo

La velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato mientras exista sustrato en el medio y se correlaciona con la velocidad de crecimiento específico μ y la concentración de células x [células/ mL] según la ecuación:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (\text{II.1})$$

La velocidad de crecimiento específico μ , es generalmente una función de tres parámetros: la concentración del sustrato limitante S , la tasa de crecimiento máxima $\mu_{\text{máx.}}$, y la constante específica de sustrato K_s , en cuya concentración se obtiene la mitad de la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu = 0,5 \mu_{\text{máx.}}$). Esta relación puede ser expresada por medio de la ecuación:

$$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{II.2})$$

La velocidad máxima de crecimiento específico μ máx. es de considerable importancia a nivel industrial, debido a que es en este punto donde se obtiene el valor máximo de μ a niveles de saturación de sustrato, relacionando la dependencia de los microorganismos con las condiciones del fermentador, donde a medida que aumenta la densidad de población decrece la concentración del sustrato limitante del crecimiento, causando un descenso de μ .

Fase estacionaria: En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente de forma exponencial. Las limitaciones de crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por combinación de las causas anteriores.

Fase de muerte: Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y seguir metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables, y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

II.1.2.5. Parámetros Cinéticos

Los parámetros cinéticos son importantes para la descripción de la evolución de la población microbiana, ya que del conocimiento de estos parámetros depende la modelación adecuada del sistema. Por ejemplo uno de los más importantes es la tasa específica de crecimiento μ , que se define como la velocidad de crecimiento de la biomasa (r_1) por unidad de concentración de biomasa $x^{(1)}$:

$$\mu = \frac{r_1}{x^1} \quad (\text{II.3})$$

La velocidad de crecimiento de la biomasa (r_1) a su vez, se define como la cantidad de biomasa formada por unidad de tiempo y por unidad de volumen de reacción. Del mismo modo, la velocidad de consumo del sustrato (r_2) es la cantidad de masa de sustrato consumido por unida de tiempo y por unidad de volumen.

Denotemos por τ el coeficiente de rendimiento en la conversión sustrato-biomasa el cual está definido:

$$\tau = \frac{r_1}{r_2} \quad (\text{II.4})$$

La caracterización matemática de los parámetros cinéticos es difícil porque depende generalmente de numerosas condiciones extracelulares físicas (temperatura, pH, homogeneidad del medio de cultivo,...) y químicas (concentración de sustrato en el reactor, naturaleza de las fuentes,...). A continuación describiremos los efectos de estos parámetros.

II.1.2.5.1. Temperatura

Es un factor muy importante que afecta el funcionamiento de las células. De acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento, los organismos se clasifican en tres grupos: (1) psicrófilos (Temperatura optima < 20 °C), (2) mesófilos ($20^{\circ}\text{C} < \text{Temperatura óptima} < 50$ °C), (3) termófilos (Temperatura óptima ≥ 50 °C). La temperatura se va incrementando hasta llegar a la temperatura de crecimiento óptimo y la velocidad de crecimiento se incrementa aproximadamente el doble por cada 10 °C que aumenta la temperatura. La temperatura afecta también la formación de producto y al coeficiente de rendimiento.

Cuando la temperatura se incrementa por encima de su temperatura optima, se incrementan también los requerimientos de mantenimiento celular. Lo anterior significa que el coeficiente de mantenimiento se incrementa conforme la temperatura aumenta con una energía de activación de 15 a 20 *kcal/mol*.

II.1.2.5.2. pH

La concentración de iones hidrogeno (pH) afecta la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento microbiano. El pH óptimo para el crecimiento puede ser diferente del requerido para la formación de producto. Cada organismo tiene su pH óptimo: el pH óptimo para los microorganismos es de 3 a 8; para las levaduras de 3 a 6; para los mohos de 3 a 7; para las células vegetales de 5 a 6; y para las células animales de 6,5 a 7,5. Cuando el pH no es el óptimo, los requerimientos de energía de mantenimiento aumentan. En las fermentaciones, el pH varía sustancialmente.

El pH también puede cambiar debido a la producción de ácidos orgánicos. El pH se puede controlar por medio de buffers o un sistema de control de pH.

II.1.2.5.3. Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto (DO) es un sustrato muy importante en las fermentaciones aeróbicas y puede ser un sustrato limitante debido a que el oxígeno es un gas soluble en el agua. En alta concentración celular, la tasa de consumo de oxígeno puede exceder a la tasa de suministro. Cuando el oxígeno es un factor limitante, la tasa específica de crecimiento varía con la concentración de oxígeno disuelto de acuerdo con la cinética de saturación; por debajo de la concentración crítica, el crecimiento o

respiración se aproxima a una tasa de primer orden dependiente de la concentración de oxígeno disuelto. La concentración crítica de oxígeno es de aproximadamente 5% al 10% de la concentración de oxígeno disuelto saturado para microorganismos y levaduras (Shuler y Kargi (1992); Barley y Ollis (1977); Blanch y Clark (1996) *et al.*).

II.1.2.6. Biorreactor o fermentador

Un biorreactor o fermentador se define como “aquel dispositivo que proporciona un medio ambiente controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto”. El medio ambiente adecuado que proporciona un biorreactor, tiene que tener niveles óptimos de temperatura, pH, sustrato, sales, y oxígeno, para así convertir las materias primas en productos específicos (metabolitos) de interés (Rodríguez *et al.*, 2003).

II.1.2.6.1. Tipos de biorreactores

Según Rodríguez *et al.*, 2003, los tipos de biorreactores son:

- Fermentadores bucle agitado por aire (air-lift)
- Fermentadores de torre
- Fermentadores con agitación mecánica

Los fermentadores con agitación básicamente consisten de un tubo cilíndrico con un agitador en el fondo o en la parte superior, estos son los fermentadores más comúnmente usados debido a su fácil operación, confiabilidad y duración. Estos biorreactores pueden variar en capacidad desde 1 litro hasta 30 litros.

En estos tipos de fermentadores es necesario un motor para poder llevar a cabo la agitación, el motor deberá generar la suficiente potencia para asegurar que el medio de cultivo en el fermentador permanezca como una mezcla homogénea, para un biorreactor de 20 litros un motor de 1 kwatt es suficiente.

Las operaciones realizadas por estos biorreactores son las siguientes:

1. Homogeneización, para mantener temperatura y distribución de concentración uniformes.
2. Mezcla sólido/líquido, para mantener una suspensión con una distribución de sólidos uniforme.
3. Procesos líquido/líquido, para dispersar una fase en otra, formar emulsiones y realizar extracciones.
4. Procesos gaseoso/líquido, para dispersar el gas en los líquidos, airear el líquido.
5. Intercambio de calor.

II.1.2.6.2. Diseño e instrumentación de biorreactores.

La instrumentación y control de un biorreactor requiere de sensores que midan las variables de un proceso fermentativo, y sistemas que ajusten el equipo a un punto óptimo de operación. Idealmente, los sensores deben de estar en línea, para medir las propiedades físicas del cultivo, estos sensores deben ser esterilizables para asegurar la asepsia del proceso. Sin embargo, no todas las mediciones pueden ser hechas en línea, algunas medidas fuera de línea, requieren de tomar muestras y analizarlas, lo cual consume tiempo y hace lenta la respuesta de control (biomasa, sustrato, metabolitos, etc.).

Los sensores de propiedades físicas pueden ser monitoreados continuamente, y son la temperatura, presión, poder de agitación, velocidad de agitación, viscosidad del medio, flujo y concentración de gases y fluidos, espuma, volumen y masa. Los utilizados en el prototipo son de agitación, temperatura y nivel de líquido. Para la medición de las propiedades químicas se utilizan electrodos esterilizables al vapor, de pH, redox, oxígeno disuelto y CO₂. El más utilizado es el de pH, aunque no tiene utilidad para todas las fermentaciones, sólo en las de tipo continuo donde se necesita mantener un valor estable de acidez o basicidad. Para ello, contamos con sensores de pH y oxígeno disuelto (Rodríguez *et al.*, 2003).

II.1.2.6.3. Modos de operación

Rodríguez *et al.*, 2003 Los biorreactores, tienen básicamente tres modos de operación para realizar las fermentaciones:

1. Modo lote (Batch)
2. Modo lote alimentado (Fed-Batch)
3. Modo continuo

Los modos de operación por lote, son modos discontinuos de operación, el modo lote es comúnmente llamado discontinuo, mientras que el modo lote alimentado se conoce como discontinuo alimentado a intervalos.

II.1.2.7. Eficiencia

Una definición de "eficiencia" es la siguiente: "La eficiencia es la relación entre un ingreso y un gasto; entre una entrada y una salida; entre un recurso y un producto" (Parra., 2007).

La expresión en cualquiera relación de eficiencia toma la forma de una proporción: una salida dividido por una entrada, y se presenta en forma matemática de la siguiente forma:

$$F = E / I \quad (\text{II.5})$$

Dónde:

F= eficiencia

I = salida especificada

E= entrada especificada

Lindbeck (1971) citado por Parra 2007. Consideró la eficiencia técnica, la cual surge de la interpretación de la función de producción como el conjunto de los puntos frontera del conjunto de producción, quedando particionado así el espacio de asignaciones en eficientes (las ubicadas justo sobre la función de producción), las ineficientes (las situadas debajo de la misma) y las imposibles (las localizadas más allá).

Los métodos para estimar la eficiencia pueden ser divididos en dos (Coelli, 1995): métodos paramétricos, que estiman una frontera estocástica por técnicas econométricas; y métodos no paramétricos, como el DEA, que se basa en la resolución del modelo por programación lineal.

II.1.2.8. Análisis envolvente de datos (DEA)

DEA es una técnica de programación matemática no paramétrica, que es utilizada para la medición de la eficiencia basada en la obtención de una frontera de eficiencia a partir del conjunto de observaciones que se considere sin la estimación de ninguna función de producción, es decir, sin necesidad de conocer ninguna forma de relación funcional entre entradas y salidas.

El DEA, trata de optimizar la medida de eficiencia de cada unidad analizada para crear así una frontera eficiente basada en el criterio de Pareto (Charnes *et al*; 1997, citado por Parra 2007). El óptimo de Pareto consiste en buscar un punto de equilibrio en el que ninguno de los agentes afectados puede mejorar su situación sin reducir el bienestar de cualquier otro agente.

Mediante el empleo de técnicas de programación lineal, el DEA compara la eficiencia relativa de un conjunto de unidades que producen “salidas” similares a partir de una serie de “entradas” comunes. De este modo, primero se construye la frontera de producción empírica y después se evalúa la eficiencia de cada unidad observada que no pertenezca a la frontera de eficiencia. Así, además de no ser un método paramétrico, tampoco es estadístico puesto que no asume que la eficiencia no captada siga algún tipo de distribución probabilística.

La eficiencia relativa de las diferentes unidades consiste en calcular los siguientes cocientes que miden la relación entrada-salida:

(II.6)

$$\text{Eficiencia de la unidad } i - \text{ésima} = \frac{\text{Suma ponderada de salidas de la unidad } i\text{-ésima}}{\text{Suma ponderada de entradas de la unidad } i\text{-ésima}}$$

Recurriendo a la notación usual en este campo, para el caso de m salida y n entrada se tiene:

$$E_j = \frac{U_1 Y_{1j} + U_2 Y_{2j} + \dots + U_i Y_{ij} + \dots + U_m Y_{mj}}{V_1 Y_{1j} + V_2 Y_{2j} + \dots + V_i Y_{ij} + \dots + V_n Y_{nj}} \quad (\text{II.7})$$

Dónde:

E_j es la eficiencia relativa de la unidad organizativa j-ésima.

U_i es el peso asociado al salida genérico i-ésimo.

V_i es el peso asociado al entrada genérico i -ésimo.

Y_{ij} es la cantidad de salida genérico i -ésimo en la unidad organizativa j -ésima.

X_{ij} es la cantidad de input genérico i -ésimo en la unidad organizativa j -ésima.

II.1.2.9. Lógica difusa

Es una lógica que permite valores imprecisos, inexactos, intermedios o aproximados para poder definir evaluaciones convencionales entre sí/no, verdadero/falso, negro/blanco, etc. La inventó Lofti Zadeh en los años 60 combinando los conceptos de la lógica y de los conjuntos de Lukasiewicz mediante la definición de grados de pertenencia. Expresiones como “bastante”, “mucho”, “poco”, ”casi” ,”muy” e inclusive valores numéricos inexactos (0.001, 0.999, 1.0, 2.052) se pueden formular matemáticamente y procesarse por medio del computador para así simular con mayor precisión la forma de pensar del cerebro humano (Hernández, 2012).

La lógica difusa es una extensión de la lógica tradicional que utiliza conceptos de pertenencia de sets más parecidos a la manera de pensar humana. Un sistema difuso puede simularse e implementarse directamente usando un lenguaje de programación como el que incorpora matlab.

En matlab existe un toolbox dedicado a los sistemas difusos. Este toolbox puede definir un sistema difuso por medio de diálogos y ventanas que facilitan la introducción a los datos. Además, dispone de un conjunto de funciones para analizar el comportamiento de dichos sistemas (Rodríguez, 2013).

II.1.3. Definición de términos básicos

Software análisis frontier banxia

Es software que utiliza la técnica del análisis envolvente de datos (DEA) para desarrollar estudios comparativos que permitan mejorar la eficiencia.

Matlab

(Aracil, Gómez, 2007, p.1) es un programa de gran aceptación en ingeniería destinado a realizar cálculos técnicos, científicos y de propósito general. En el que se integran operaciones de cálculo, visualización y programación.

Campos de acción (aplicaciones):

- Matemática y cálculo
- Teoría de control
- Desarrollo de algoritmo
- Modelación, simulación y prototipado
- Análisis y procesado de datos
- Gráficos científicos y de ingeniería
- Mapeo y tratamiento de imágenes
- Instrumentación y adquisición de datos
- Identificación de sistemas

Toolbox

Librerías de funciones MATLAB asociadas a las diferentes aplicaciones (Stateflow y Sisotool, interfaz gráfico, control neuronal y borroso).

Sistema Semicontinuo (feedbatch)

En un cultivo semicontinuo o fed-batch, los nutrientes son alimentados al biorreactor de forma continua o semicontinua, mientras que no hay efluentes en el sistema según sea el objetivo de la operación, la adición intermitente del sustrato mejora la productividad de la fermentación manteniendo baja la concentración del sustrato. Un proceso de este tipo está restringido por la capacidad volumétrica del recipiente (López y Borzacconi 2009).

Biomasa

Es la cantidad de materia acumulada expresada en peso por unidad de área o de volumen.

Microorganismos mesófilos aerobios

Son microorganismos que crecen en presencia de oxígeno en intervalos comprendidos entre 20 a 45 °C con temperaturas optimas entre 30 y 40 °C.

Siembra en profundidad

Es una técnica de siembra que se caracteriza fundamentalmente por la recuperación de células bacterianas viables. Una célula viable se define como la que es capaz de dividirse para dar lugar a descendencia y la forma habitual para llevar a cabo un recuento de este tipo, es determinado por el número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. El subracional que subyace en este tipo de prueba es que cada célula viable puede dar lugar a una colonia. (Anderson y Calderón, 1999).

En esta técnica un volumen no mayor de 1ml de la disolución apropiada se mezcla en el medio de cultivo fundido. La placa se incuba hasta la aparición de colonias contables. (ICMSF, 2000).

Liofilización

Es una técnica que consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismos y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por el estado intermedio líquido. Luego los liófilos se conservan entre 0 y 5° C durante muchos años. Para su recuperación se resuspende el liófilo en el medio de cultivo adecuado y se incuban a la temperatura adecuada (Castillo, Andino 2010, p.51).

Recuento en placas

Es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias (Ufc) en un alimento. Los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de alimento (dilución) e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas. Para la dilución se suele utilizar agua de peptona tamponada (Castillo, Andino 2010, p.51).

Fructosa

La fructosa, o levulosa, es una forma de azúcar encontrada en los vegetales, las frutas y la miel. Es un monosacárido con la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura, es decir, es un isómero de esta.

D-Fructosa

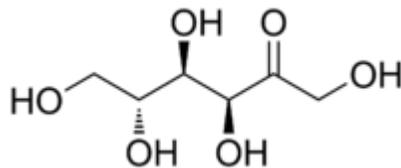


Figura 3. Estructura de la Fructosa

Queso

Según la norma COVENIN 1813:2000. Norma General de Quesos

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

- a) Coagulación total o parcial de las siguientes materias primas: leche y/o productos obtenidos por efecto del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación.
- b) Técnicas de elaboración que compartan la coagulación de la leche y/o de productos obtenidos de la leche y que dan un producto final que posee características físicas, químicas y organolépticas similares que el producto definido anteriormente.

Clasificación

- 1) **Queso sometido a maduración.** Se entiende por queso sometido a maduración el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos, físicos y sensoriales necesarios y característicos del queso en cuestión.
- 2) **Quesos madurados por mohos.** Se entiende por queso madurado por mohos, un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso.
- 3) **Queso sin madurar.** Se entiende por queso sin madurar el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación.

Queso Gouda

Según la Norma COVENIN 2851-92 es el producto elaborado a base de leche pasteurizada o con la mezcla pasteurizada de leche fresca con leche reconstituida, con la adición de fermentos lácticos, cuajo y sometido a un proceso de maduración.

CAPÍTULO III

III.1. MARCO METODOLÓGICO

III.1.1. Tipo de investigación

Esta investigación se encuentra enfocada dentro de la investigación exploratoria, (Hernández (2016) p. 76) afirma:

Los estudios exploratorios sirven para familiarizarse con fenómenos relativamente desconocidos, obtener información sobre la posibilidad de llevar a cabo una investigación más completa respecto de un contexto particular, investigar nuevos problemas, identificar conceptos o variables promisorias, establecer prioridades para investigaciones futuras, o sugerir afirmaciones y postulados. Esta clase de estudios son comunes en la investigación, sobre todo en situaciones donde existe poca información. Los estudios exploratorios en pocas ocasiones constituyen un fin en sí mismos, generalmente determinan tendencias, identifican áreas, ambientes, contextos y situaciones de estudio, relaciones potenciales entre variables; o establecen el “tono” de investigaciones posteriores más elaboradas y rigurosas. Estas indagaciones se caracterizan por ser más flexibles en su método en comparación con las descriptivas, correlacionales o explicativas, y son más amplias y dispersas. Asimismo, implican un mayor “riesgo” y requieren gran paciencia, serenidad y receptividad por parte del investigador.

Dentro de esta investigación se estudió las relaciones potenciales entre las variables, tanto las que son controladas a nivel del laboratorio como el pH y la temperatura y las variaciones ocurridas en los grados Brix (sólidos totales) al utilizar concentraciones diferentes de fructosa cuyos resultados se evaluarán mediante el análisis envolvente de datos (DEA) a manera de establecer la eficiencia del sustrato (lactosuero de leche de búfala).

III.1.2. Población y muestra

“La población se define como la totalidad del fenómeno a estudiar donde las unidades de población poseen una característica común la cual se estudia y da origen a los datos de la investigación” (Tamayo 1997, p.114). Dentro de esta investigación la población en estudio está constituida por las cepas de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) distribuidas en el sustrato de lactosuero de leche de búfala acondicionado, en una cantidad de 1.8 litros, este es el medio en donde se evaluó el crecimiento de la cepa para determinar la eficiencia del mismo.

Por otra parte, la muestra “es un subgrupo de la población de interés sobre el cual se recolectarán datos, y que tiene que definirse o delimitarse de antemano con precisión, éste deberá ser representativo de dicha población” (Hernández, 2016, p. 173). Se retiraron 10 ml por hora para evaluar los cambios en el proceso de crecimiento del microorganismo mediante las determinaciones de las variables involucradas, y las horas de estudio se establecieron para un máximo de 12 horas por lo que el tamaño de la muestra estuvo constituido por 12 unidades experimentales de 10 ml para un total de 120 ml.

III.1.3. Diseño de la investigación

La investigación planteada, cuyo objetivo principal fue determinar la eficiencia del lactosuero de leche de búfala en la producción de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) es de tipo exploratoria, en la que ubicaron los sistemas semicontinuos, debido a que permiten utilizar soluciones simples de nutrientes con los cuales se determinaron los parámetros cinéticos como velocidad de reacción (μ) y tasa de crecimiento, en tal sentido los resultados se evaluaron utilizando el análisis envolvente de datos (DEA).

El desarrollo del trabajo de investigación se encuentra estructurado de la siguiente manera:

- **Fase I.** Caracterización física y química del sustrato (lactosuero de leche de búfala) a emplear en la producción del microorganismo *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).
- **Fase II.** Establecimiento de la concentración óptima del sustrato (lactosuero de leche de búfala) en la producción de biomasa de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC11454).
- **Fase III.** Determinación de los parámetros cinéticos (tasa de crecimiento y velocidad de reacción) que caracterizan al microorganismo *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).
- **Fase IV.** Evaluación de la eficiencia de los sustratos (lactosuero de leche de búfala y lactosuero de leche de cabra) utilizando análisis envolvente de datos (DEA).
- **Fase V.** Elaboración de un queso tipo gouda a escala de laboratorio a fin de comprobar la efectividad del microorganismo.

III.1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.4.1. Materiales, equipos y reactivos utilizados en la investigación

Materiales

- Cepa de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) liofilizada
- Fructosa
- Vitamina B-12 (1000 µg)
- Vitamina E (400 mg)
- Placas de Petri
- Frascos

- Buretas (50 ml)
- Beaker (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)
- Micro pipetas (1 ml, 10 ml)
- Fiolas (1000 ml, 2000 ml)
- Pipetas graduadas (10 ml, 5ml)
- Tubos de ensayo
- Varilla de vidrio
- Cilindro graduado (100 ml, 250ml)
- Soporte universal
- Gradilla para tubos de ensayo
- Micro goteros
- Alcohol
- Agua destilada
- Algodón
- Piseta
- Espátula
- Papel de Aluminio
- Tirro
- Marcador
- Guantes
- Gorro
- Tapa boca
- Bata de laboratorio

Equipos

- Autoclave
- Balanza

- Plancha de calentamiento
- Contador de colonias digital
- Estufa de incubación
- Estufa de esterilización
- Refractómetro digital
- pH metro
- Termómetro de vidrio
- Biorreactor
- Centrifugador
- Mechero Bunsen
- Determinador de actividad de agua AQUALAB
- Nevera

Medios de cultivo

- Agar Plate Count
- Agua Peptonada

Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Ácido cítrico

III.1.4.2. Métodos

A continuación se describen los métodos por cada fase de investigación:

Fase I: Caracterización física y química del sustrato (lactosuero de leche de búfala). En esta fase se determinó el pH, la acidez titulable, sólidos totales (° Brix), actividad de agua, grasas entre otros, empleando lo establecido en la Normas Venezolanas COVENIN.

pH (acidez iónica)

Para la determinación de pH del lactosuero de leche de búfala se utilizó el procedimiento descrito en la norma COVENIN 1315-79 para Alimentos.

Este método se basa en que al introducir una muestra en una celda electrolítica compuesta por dos electrodos se desarrolla un voltaje que es proporcional a la concentración de iones hidrogeno de la solución, el cual es expresado en unidades de pH.

Acidez titulable

Se determinó por medio del método descrito en la norma COVENIN 658-97 Leche y sus Derivados.

El método consiste en titular un volumen determinado de muestra, con una solución decinormal (0,1 N) de hidróxido de sodio (NaOH), en presencia de un indicador.

Grasas

La determinación de la grasa se llevó a cabo por el método de Gerber indicado en la Norma COVENIN 1053-82.

Este método se basa en el empleo de un Butirómetro, el cual es utilizado para determinar el contenido de grasa en la leche y otras sustancias. Es un método volumétrico, donde la grasa de la leche es separada de las proteínas agregando ácido sulfúrico, esta separación es facilitada usando alcohol amílico o isoamílico y centrifugación. El contenido de grasa es leído directamente en el Butirómetro.

Proteína

El análisis para determinar la proteína se realizó por el método indicado en la norma COVENIN 370-1997. Leche y sus Derivados.

El método consiste en la mineralización de la materia orgánica por digestión con ácido sulfúrico concentrado y catalizadores, para lograr transformar el nitrógeno en amoníaco, el cual se destila y se recolecta en una solución ácida y se valora posteriormente.

Aw.

La Aw se determinó por el método detallado en la norma AOAC 925.10

Fase II: Establecimiento de la concentración óptima del sustrato (lactosuero de leche de búfala) en la producción de biomasa de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC11454).

En esta etapa se ejecutaron todas las operaciones preliminares necesarias para obtención del lactosuero de leche de búfala. Luego se formuló un sustrato del mismo en diferentes concentraciones para evaluar el crecimiento del *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) mediante el empleo de un biorreactor.

- **Preparación del sustrato (lactosuero de leche de búfala)**

Para la obtención de este sustrato, se procedió a la elaboración de un queso a partir de la leche de búfala, según las Normas Venezolanas COVENIN 3821-2003. Queso Blanco.

Posteriormente, se procedió a la esterilización del lactosuero en el autoclave a una temperatura de 121° C y 15 lbs de presión por 15 min.

Luego, se emplearon concentraciones diferentes de fructosa a fin de evaluar el crecimiento del microorganismo, por tal motivo se adicionó:

Corrida No 1: 12,5 % de fructosa

Corrida No 2: 10 % de fructosa

Corrida No 3: 7,5 % de fructosa

Para continuar con el acondicionamiento del sustrato se le adicionaron los siguientes nutrientes por cada corrida experimental:

Vitamina B-12 (1000 μg): 4 capsulas

Vitamina E (400 mg): 2 capsulas

Fase III. Determinación de los parámetros cinéticos que caracterizan al microorganismo *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).

Se ubicaron los sistemas semicontinuos, debido a que permiten utilizar soluciones simples de nutrientes y adquirir la Tasa de Crecimiento y Velocidad (μ).

III.1.4.2.1. Preparación de los medios de cultivo

Empleando las técnicas microbiológicas utilizadas en el laboratorio de microbiología de la UNELLEZ – SAN CARLOS, en conjunto con lo establecido en las normas COVENIN 1337-90, se prepararon los medios de cultivo necesario para la siembra en las placas del microorganismo en estudio *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).

- **Preparación del agar**

El Agar empleado para la siembra fue el Agar Plate Count, para su preparación la casa comercial especifica que se deben agregar 22,5 gr de agar por cada 1000 ml, de agua. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se preparó la cantidad de agar para cada proceso, tomando en consideración la necesidad centrada en 156 placas de Petri a las que se le adicionaron 15 ml de agar por cada una, en tal sentido, se necesitó para un volumen total de agar de 2340 ml. Por lo tanto se calculan los gramos de agar necesarios de la siguiente forma:

$$\begin{aligned}
 &156 \text{ placas con } 15\text{ml c/u} \\
 &156 \times 15 = 2340 \text{ ml de agua destilada} \\
 &22,5 \text{ gr de Agar} \longrightarrow 1000 \text{ ml} \\
 &\quad X \longleftarrow 2340 \text{ ml} \\
 &X = 52,7 \text{ gr de Agar}
 \end{aligned}$$

Posteriormente se procedió a diluir los gramos de agar calculados en la cantidad de agua necesaria, utilizando dos fioles, una de 2000 ml y otra de 1000 ml posteriormente se sometió a calentamiento con la ayuda de un mechero Bunsen agitando frecuentemente hasta obtener una apariencia cristalina.

Una vez preparado el agar, se procedió a envasar en frascos de vidrio con tapas cada uno con 90 ml, utilizando 60 frasco, los que se esterilizaron previamente en el autoclave a 121° C y 15 lbs de presión por 15 min. Luego de terminar dicho proceso se enfrió hasta una temperatura aproximada de 45 – 50° C. Posteriormente se esterilizo y se agregó cuidadosamente el medio, se dejó enfriar y se agregó aseptícamente el agar en las placas, en cada proceso, debido a que la siembra se realizó en profundidad.

- **Preparación del agua peptonada**

El agua de peptona fue empleada para la preparación de las diluciones de las muestras a sembrar, con el objetivo de lograr cuantificar las unidades formadoras de colonias (Ufc) presentes para dicha muestra. Según las especificaciones de la casa comercial se utilizan 25,5 gr por cada 1000 ml de agua destilada. Por lo tanto, para cada proceso se requiere preparar el agua peptonada necesaria para un total de 60 frascos de vidrio con tapas con 90 ml cada uno. Lo que indica que se necesitó 5400 ml; para esto se realizaron los cálculos de la siguiente forma:

60 frascos con 90 ml c/u

$60 \times 90 = 5400$ ml de agua destilada

25,5 gr de Peptona \longrightarrow 1000 ml agua destilada

X \longleftarrow 5400 ml

X = 138 gr

Una vez pesada la cantidad de peptona a utilizar y medido el volumen de agua necesaria se disolvieron las mismas en dos fioles de 2000 ml y una de 1000 ml, se agregó en los frascos de vidrio en el volumen correspondiente para su posterior esterilización.

- **Preparación del inculo**

Consistió en la reactivación del microorganismo (cepa de *Lactococcus lactis lactis* ATCC 11454 liofilizado), la cual se realizó en condiciones de esterilidad, transfiriendo el liofilizado al medio de cultivo líquido apropiado (caldo lactosado) para dicho microorganismo, transfiriéndose 2 ml del liofilizado hidratado a 8 tubos de ensayo con 8 ml de caldo, seguidamente se incubo a 36°C por 48 horas.

III.1.4.2.2. Proceso biotecnológico (fermentación semicontinua)

Preparados los medios de cultivo debidamente esterilizados, al igual que todo el material de vidrio a utilizar, se dio inicio al proceso de fermentación. En los siguientes pasos:

- Se Agregó el sustrato al recipiente de vidrio estéril del biorreactor, se separó 1/5 del volumen total del sustrato para la preparación del inóculo.
- Se encendió el equipo, con el fin de estabilizar la temperatura (36° C), pH (6), y agitación (200 rpm). Estas condiciones son variables, fijas, que se controlaron de forma continua a lo largo del proceso.
- Una vez que se activó el microorganismo y estabilizaron las condiciones del biorreactor, se incorporó el inóculo al sustrato.
- Al iniciarse el proceso se midieron los sólidos totales (°Brix) de inicio y se procede a la toma de las muestras, las cuales fueron realizadas en intervalos de tiempo de 1 hora, desde la hora de inicio (h_0) hasta la hora final (h_{12}). Esta toma de muestra consistió en extraer 10 ml del sustrato lactosuero inoculado con una pipeta estéril y agregarlo en un frasco con 90 ml de agua peptonada y de esta manera se obtuvo la dilución 10^{-1} debidamente homogenizada.
- Posteriormente se preparó la dilución 10^{-3} , tomando 1 ml de la dilución anterior para añadirlo en un frasco con 90 ml de agua peptonada previamente preparada y esterilizada. La dilución 10^{-5} se preparó tomando 1 ml de la dilución anterior adicionándose en un frasco de 90 ml de agua peptonada. Seguidamente se preparó la dilución 10^{-6} incorporando 10 ml de la dilución anterior en un frasco de agua peptonada de 90 ml y de igual manera se preparó la dilución 10^{-7} .

- Después de preparar todas las diluciones se comenzó con la siembra en placas de Petri, la misma se realizó en profundidad y consistió en agregar 1 ml de la dilución correspondiente para luego agregar el agar Plate Count previamente fundido y enfriado.
- La siembra se realizó en el siguiente orden: 10^{-7} (por triplicado), 10^{-6} (por duplicado), 10^{-5} (por triplicado), 10^{-3} (por triplicado) y 10^{-1} (por duplicado) (ver Figura 4).
- Finalmente se incuban las placas en una estufa de incubación a 36°C por 3 días.

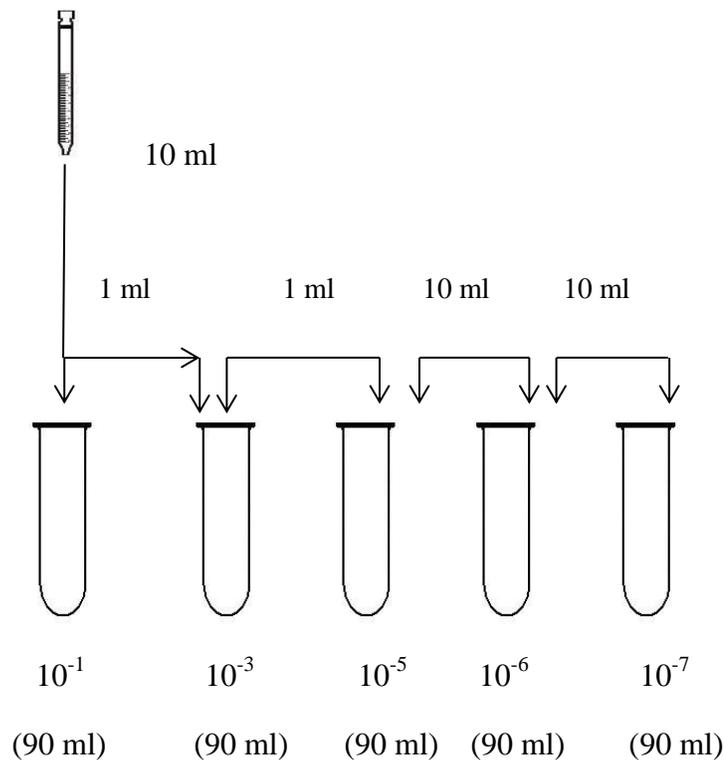


Figura 4. Preparación de diluciones

Fase IV: Evaluación de la eficiencia de los sustratos (lactosuero de leche de búfala y lactosuero de leche de cabra) utilizando análisis envolvente de datos (DEA).

En esta fase se empleó el análisis DEA a través del software análisis frontier banxia, que busca optimizar la salida (biomasa) en función de las entradas (sólidos totales, temperatura, pH), de manera de establecer la eficiencia de los sustratos.

Fase V: Elaboración de un queso tipo gouda a escala de laboratorio a fin de comprobar la efectividad del microorganismo.

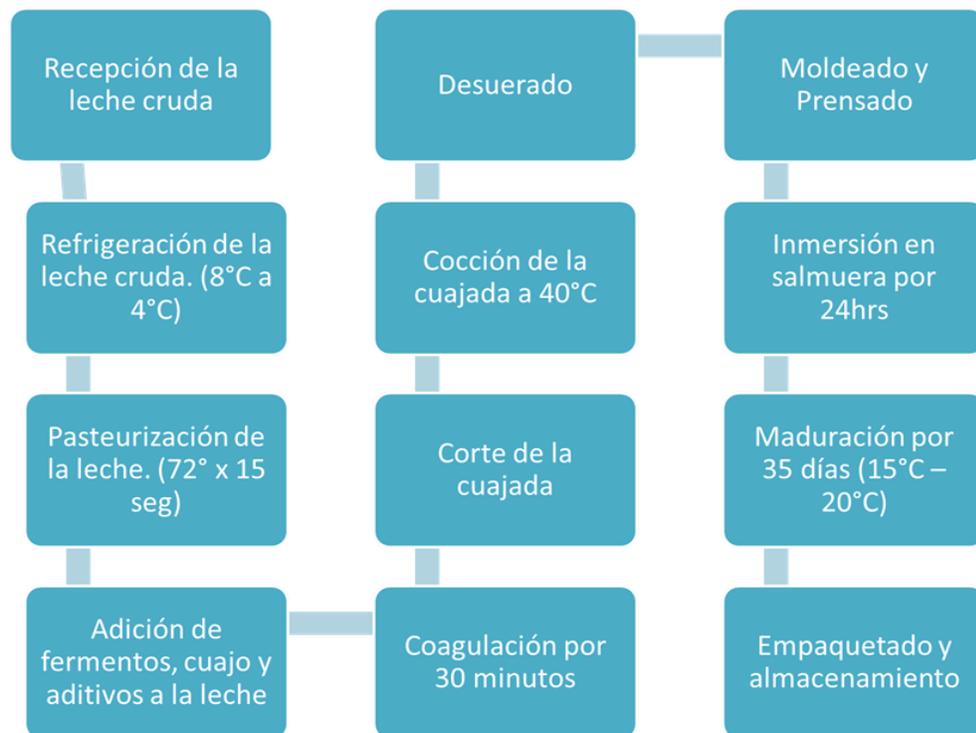


Figura 5. Diagrama de proceso de elaboración de queso gouda.

El queso tipo gouda se elaboró utilizando como referencia las normas COVENIN 2851-92, a partir de 10 litros de leche cruda la cual fue previamente refrigerada a una temperatura entre 4° y 8°C, luego se procedió a su pasteurización a una temperatura de 72°C por un tiempo de 15 segundos.

Una vez pasteurizada la leche se bajó la temperatura de la misma a 37°C y se procedió a adicionar 5,1 gr del cultivo; 0,05 gr de Nitrito y 1,7 gr cloruro de calcio; la coagulación se llevó a cabo en tiempo aproximado de 30 minutos. Ya formada la cuajada se realizó el corte de esta y se llevó a cocción entre 37° a 38°C por 40 minutos. Se hizo la separación del suero de la cuajada, y se sometió la cuajada a un proceso de moldeado y prensado para que adquiriera la forma típica del queso gouda para que, luego este pudiera ser sumergido en una salmuera al 10% por 24 horas y madurado en un ambiente fresco a una temperatura de refrigeración durante 25 días.

Para determinar la efectividad del microorganismo se realizaron pruebas sensoriales, que fueron validadas a través del software Matlab, toolbox lógica difusa.

El análisis sensorial se realizó a través de un proceso de catación, con un total de 21 participantes que evaluaron los siguientes atributos: color, sabor, textura. Luego los resultados fueron introducidos al software para determinar con cuál de ellos el producto tuvo mayor aceptación.

III.1.5. Técnicas de recolección de datos

Entre las técnicas utilizadas en este trabajo de investigación para la recopilación de información están:

La Investigación Documental, a través de la lectura de la bibliografía que describe el proceso de cultivo de *Lactococcus lactis*, representado por el modelo y la relacionada con el estado del arte sobre simulación y modelado, para biorreactores semicontinuos.

La Observación Directa, en forma general y detallada de los datos resultantes en las corridas del proceso bajo diversas condiciones de funcionamiento.

Determinación del consumo de azúcares: esta se realizó para detectar el consumo del sustrato por parte del microorganismo al ser inoculado. Por ello se utilizó como indicador de este consumo el descenso de los sólidos soluble totales medidos en °Brix. Como instrumento para esta técnica de recolección de datos se empleó un refractómetro digital y se midió ° Brix cada 10 minutos. Esta técnica consiste en tomar una porción de biomasa y colocarla en el equipo y observar con el refractómetro la cantidad de los sólidos totales disueltos.

Determinación del pH: el instrumento empleado para determinar el pH de la biomasa es un pH metro digital previamente calibrado, el mismo permite también conocer de forma digital la temperatura de la biomasa.

III.1.6. Recuento en Placas.

Es una técnica utilizada para estimar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en una muestra. El recuento se realizó con la ayuda de un contador de colonia digital.

Las unidades formadoras de colonia presente en la muestra se determinan mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$UFC = N_0 C * 10 * \left(\frac{1}{dilc}\right) \quad (III.8)$$

III.1.7. Técnicas de análisis de datos

El conjunto de datos obtenidos, a través de las técnicas empleadas para el levantamiento de información y uso de instrumentos de recolección de datos, fue clasificado, verificado y cotejado. Se realizó el análisis bajo la aplicación de los conceptos teóricos y definiciones propias del sistema, a fin de conocer el comportamiento y tendencias del proceso.

El conjunto de datos obtenidos fue procesado mediante el uso de métodos numéricos y análisis de envoltorio de datos con sus cajas de herramientas, para la obtención de una frontera de eficiencia. Se utilizó el software análisis frontier banxia, para realizar las comparaciones respectivas de la eficiencia en el sustrato lactosuero de leche de búfala. Se empleó el “Fuzzy Logic Tool Box” herramienta de Matlab para lógica difusa, para validar las opiniones de los encuestados sobre el queso tipo gouda elaborado con el microorganismo producido.

CAPÍTULO IV

IV.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.1. Caracterización del lactosuero de leche de búfala esterilizado

La Tabla 3. Presenta la composición del lactosuero de leche de búfala empleado para el desarrollo de las corridas experimentales.

Tabla 3. Caracterización del lactosuero de leche de búfala esterilizado por cada 100 ml

Característica	%
pH	6,76
Acidez	0,13
aw	0,98
Proteína	3,60
Grasa	7
Sólidos totales	6

Los resultados obtenidos mediante la caracterización del lactosuero de leche de búfala arrojaron como resultado que el mismo es un medio favorable para el crecimiento microbiano, ya que posee una aw elevada, un pH óptimo, además de esto es altamente nutritivo para ser empleado como medio de alimentación para el *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) debido a la cantidad de proteína, grasa y sólidos totales que este posee.

IV.1.2. Simulación y Comportamiento del Modelo de Proceso Seleccionado

Se presenta la simulación del comportamiento del modelo para un proceso de cultivo de *Lactococcus lactis* y el análisis de resultados.

En la figura 6, se observó durante la primera hora la fase de adaptación para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial con un crecimiento de 4×10^4 Ufc, en la hora 4 comienza la fase de declive que se prolonga hasta la hora 10, permitiendo establecer que la corrida de lactosuero leche de búfala al 7,5% de fructosa presenta mejores condiciones para la producción del microorganismo.

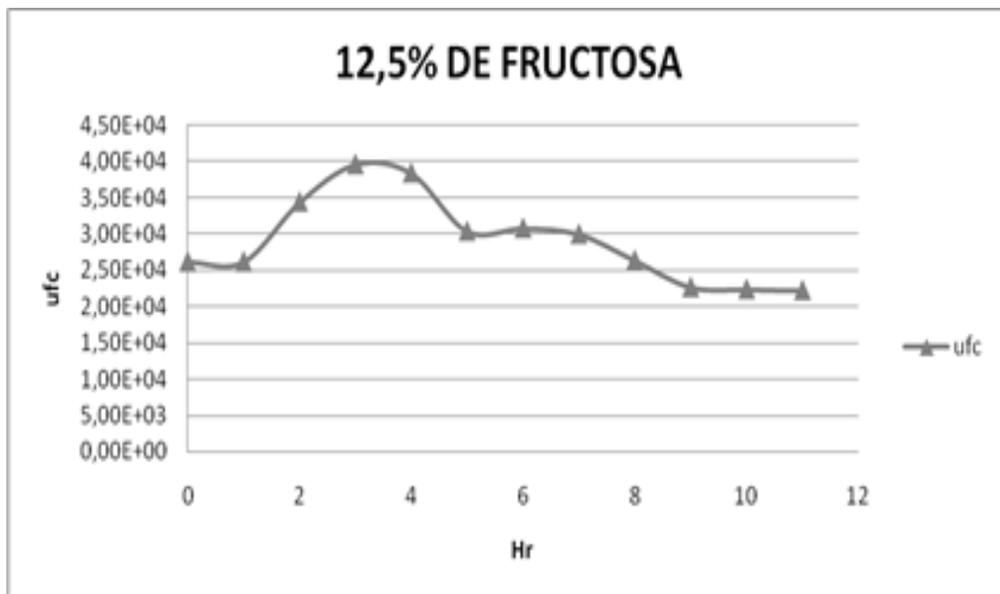


Figura 6. Concentración de Biomasa de *Lactococcus lactis* en lactosuero de leche de búfala al 12,5 % de fructosa (Ufc) vs. Tiempo (h).

En la figura 7, se observó durante la primera hora la fase de adaptación para luego pasar a la fase de crecimiento exponencial con un crecimiento de $2,1 \times 10^8$ Ufc, a su vez en la hora 5 esta pasa a una fase estacionaria donde se mantiene durante dos horas, en la hora 7 comienza la fase de declive que se prolonga hasta la hora 10, permitiendo establecer que la corrida de lactosuero de leche de búfala al 7,5% de fructosa presenta mejores condiciones para la producción del microorganismo.

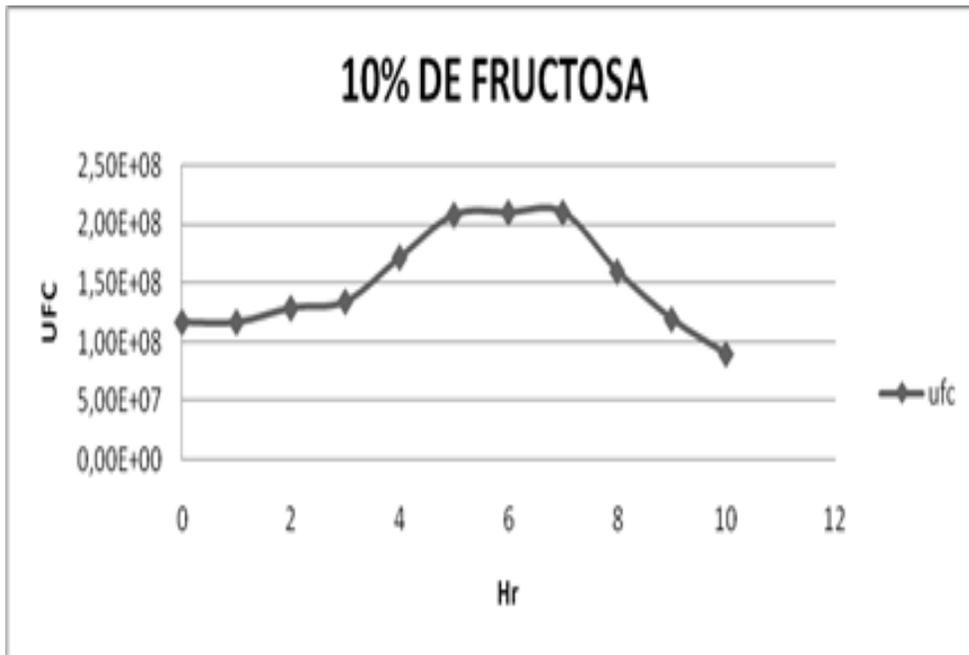


Figura 7. Concentración de Biomasa de *Lactococcus lactis* en lactosuero de leche de búfala al 10% de fructosa (Ufc) vs. Tiempo (h).

En la figura 8, se observa la máxima concentración de biomasa usando como sustrato lactosuero de leche de búfala al 7,5% de fructosa, lograda en un tiempo de 10 h con un rango cercano a 9×10^9 Ufc.

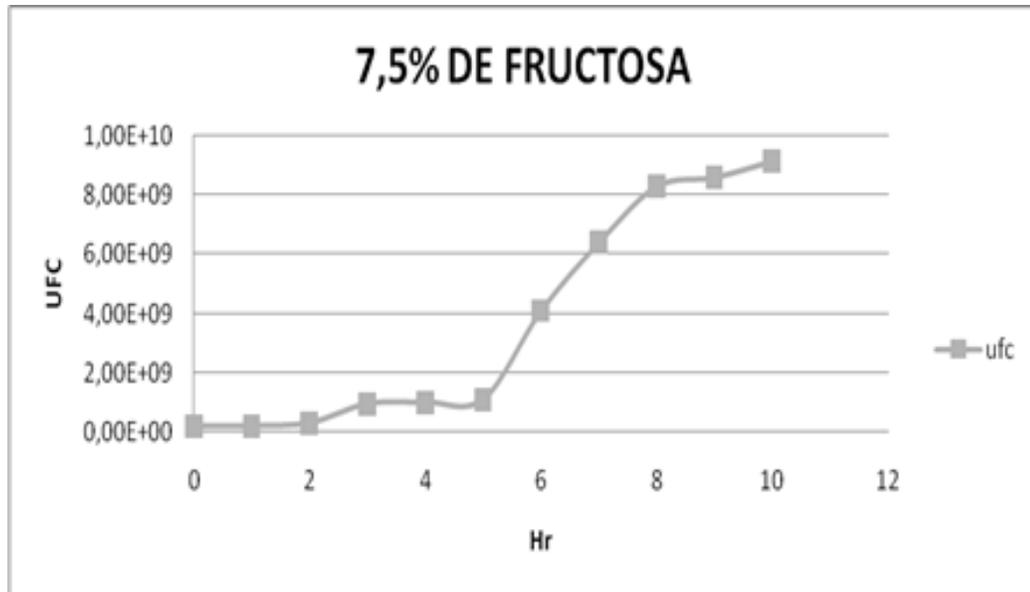


Figura 8. Concentración de Biomasa de *Lactococcus lactis* en lactosuero de leche de búfala al 7,5% de fructosa (Ufc) vs. Tiempo (h)

Las figuras que se muestran a continuación representan el comportamiento del sistema experimental, donde los sólidos totales se inician en 16 grados Brix para la corrida de 12,5 % y finalizan en 11 grados Brix, mientras que la corrida de 10% se inicia en 14 grados Brix y termina aproximadamente igual a la anterior. La concentración del 7,5 % se inicia en 12 para concluir en 8 (ver figura 9), de la misma se puede inferir que en la fase de adaptación el microorganismo requiere de todos los nutrientes y azúcares para comenzar la fase de crecimiento exponencial.

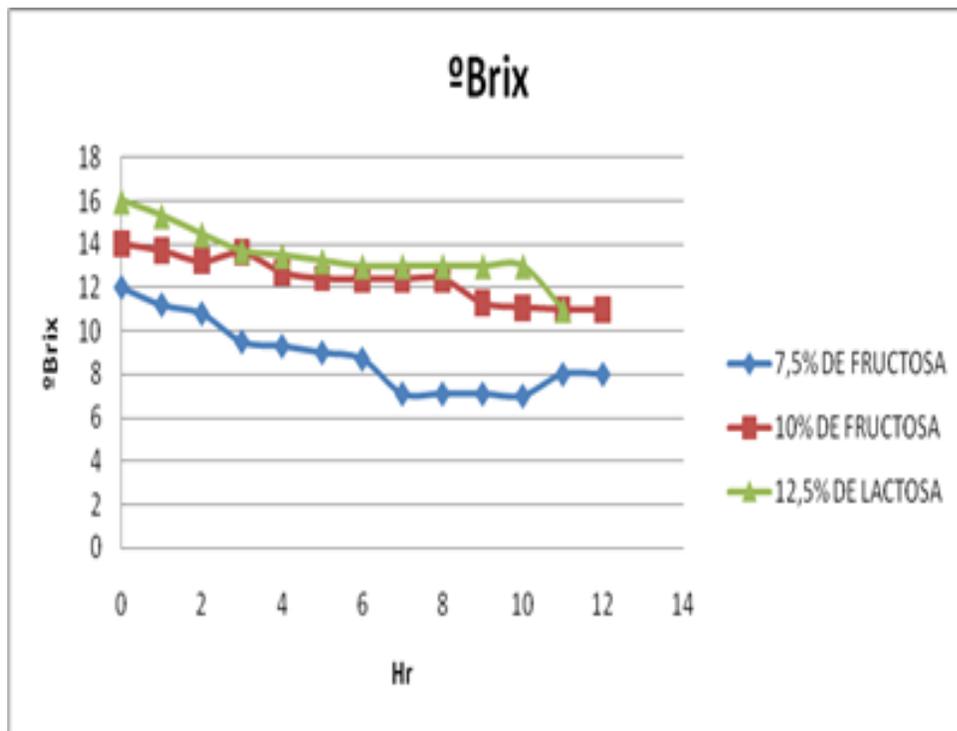


Figura 9. Sólidos Totales (Grados Brix) vs. Tiempo (h).

IV.1.3. Evaluación de la eficiencia de los sustratos

La figura 10, muestra el diagrama en Proceso del sistema simulado utilizando DEA, en el que se observa la aplicación de las variables Sólidos totales (grados Brix), pH, aireación (burbujeo) y temperatura que simula las entradas del proceso, y produce como salidas las concentraciones (Ufc) de biomasa, etanol (g/l) dentro del biorreactor.

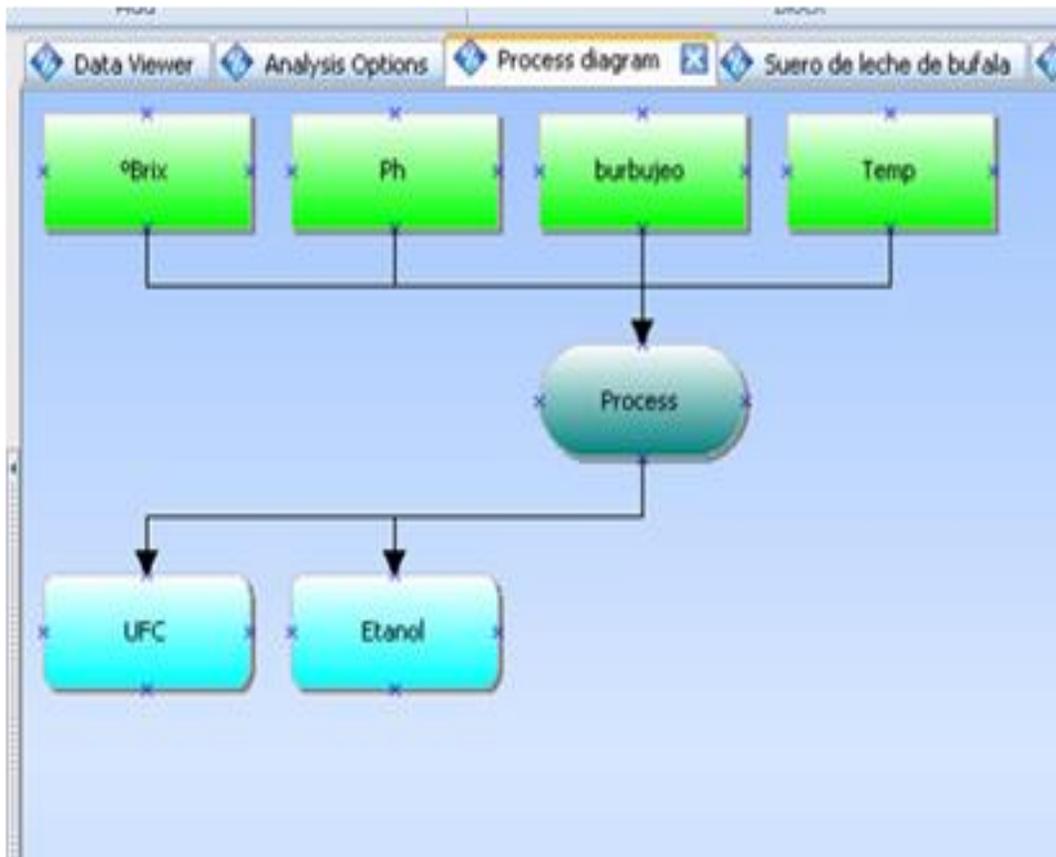


Figura 10. Diagrama de Procesos del Sistema Simulado.

Las figuras que se muestran a continuación representan el sistema simulado, donde la máxima eficiencia para el sustrato lactosuero de leche de cabra es 200 % (figura 11), la eficiencia para el sustrato lactosuero de leche de búfala es de 1000 % (figura 12).

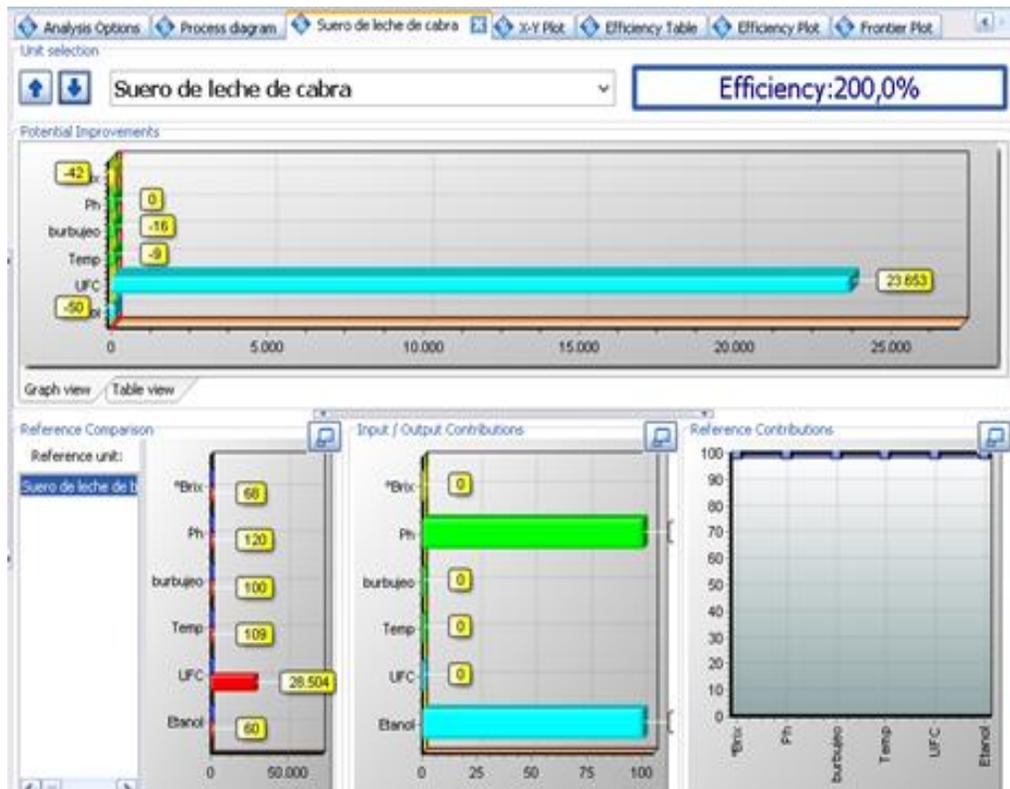


Figura 11. Eficiencia del Sustrato lactosuero de leche de cabra (%).

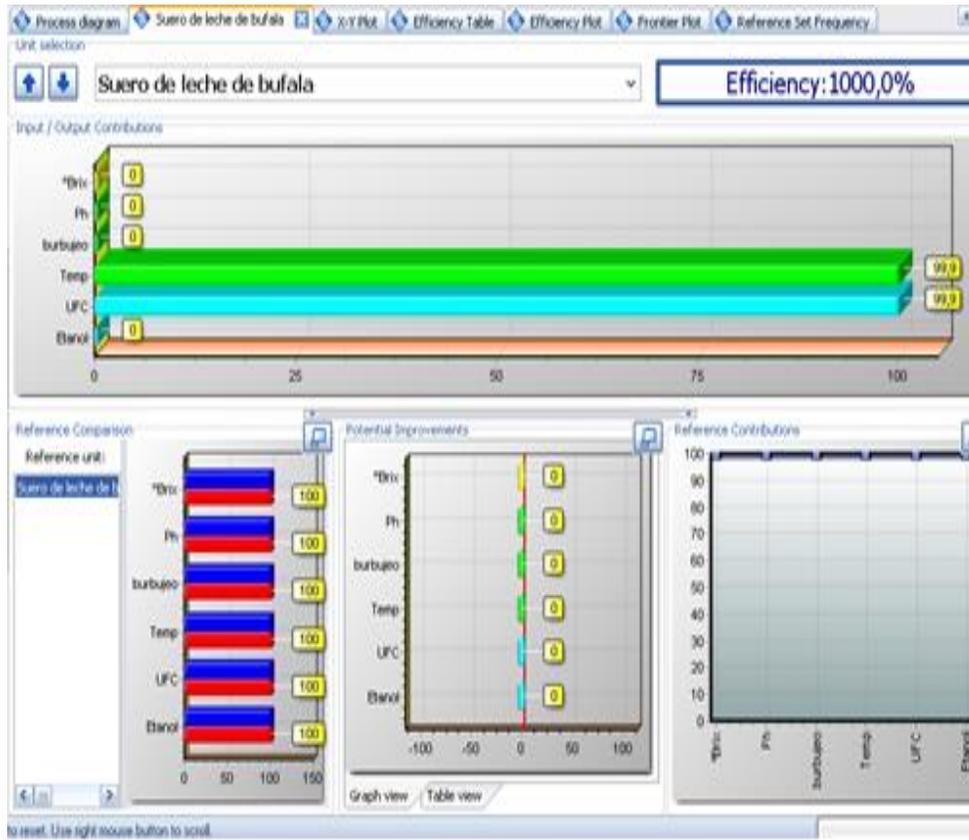


Figura 12. Eficiencia del Sustrato lactosuero de leche de búfala (%).

En la figura 13, se observa la concentración de biomasa para el suero de leche de búfala por el orden de 9×10^9 Ufc representando la corrida más eficiente con una correlación de 1, garantizando la supereficiencia del sustrato.

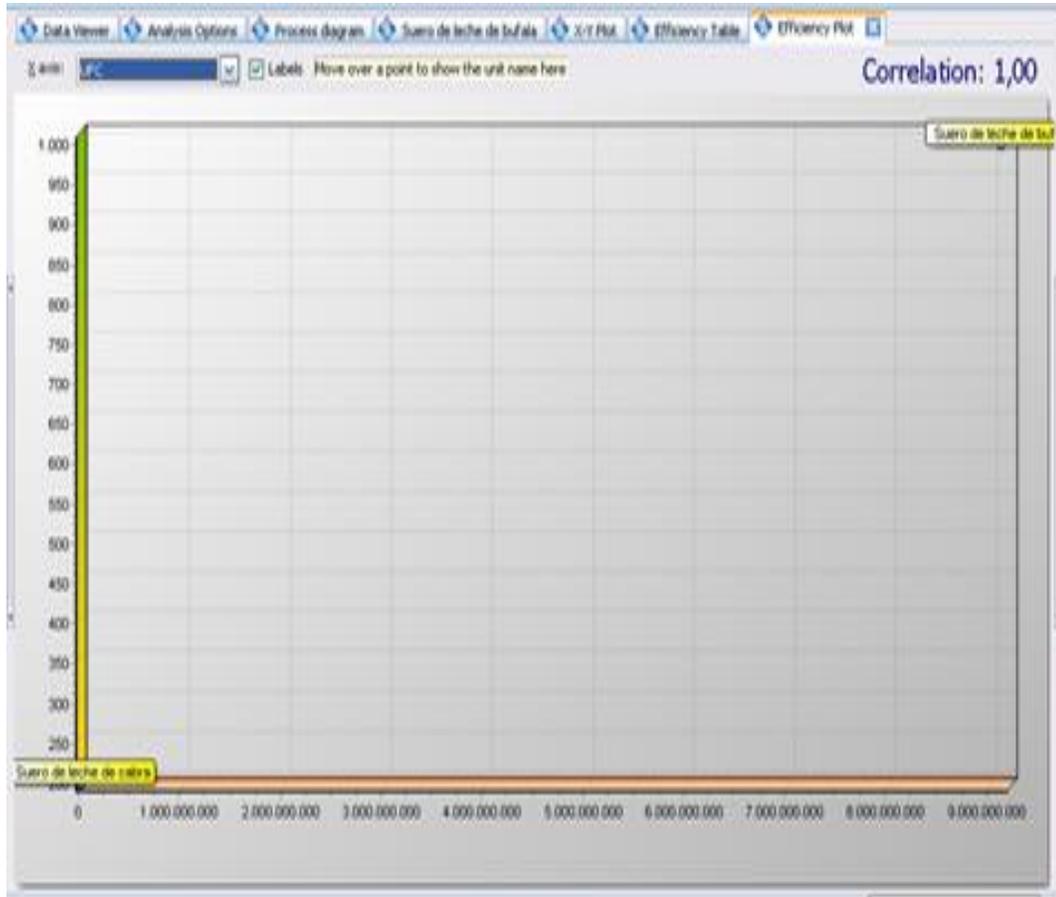


Figura 13. Correlación entre la eficiencia (%) y la biomasa para el suero de leche de búfala (Ufc).

En la figura 14, se muestra el rendimiento para el sustrato más eficiente, permitiendo afirmar que la mejor producción se obtiene con suero de leche de búfala.

Units		Comparison 1	
Unit name	Score	Efficient	Condition
Suero de leche de búfala	1000,0%	✓	●
Suero de leche de cabra	200,0%	✓	●

Figura 14. Comparación de la Eficiencia para los diferentes Sustratos

Se compararon los resultados de biomasa obtenidos con el enfoque experimental mostrados en las figuras de la 6 a la 8, y se puede observar que en la primera se obtienen mejores resultados durante las 10 horas, por lo que el sistema se logra ajustar con precisión.

Al comparar los resultados obtenidos con la simulación utilizando DEA, se observa que el sustrato más eficiente es el suero de leche de búfala, debido a que el mismo produjo más unidades formadoras de colonia para el período de tiempo muestreado, reflejando una eficiencia de 1000 %.

En la tabla 4, se puede observar que el máximo valor de la biomasa se alcanza con una concentración del 7,5 de suero de leche de búfala con un rango de $9,15 \times 10^9$ Ufc

Tabla 4. Descriptivos para la biomasa de *Lactococcus lactis*

concentración			Estadístico	Error típ.	
ufc	7,5% Fructosa	Media	3,663636E9	1,1280734 E9	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,150132E9	
			Límite superior	6,177141E9	
		Media recortada al 5%	3,551263E9		
		Mediana	1,100000E9		
		Varianza	1,400E19		
		Desv. típ.	3,7413962E9		
		Mínimo	2,0000E8		
		Máximo	9,1500E9		
		Rango	8,9500E9		
		Amplitud intercuartil	8,0000E9		
		Asimetría	,534	,661	
		Curtosis	-1,751	1,279	
			10% Fructosa	Media	1,516364E8
Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior			1,227700E8	
	Límite superior			1,805027E8	
Media recortada al 5%	1,518182E8				
Mediana	1,350000E8				
Varianza	1,846E15				
Desv. típ.	4,2968064E7				
Mínimo	9,0000E7				
Máximo	2,1000E8				
Rango	1,2000E8				
Amplitud intercuartil	9,1000E7				
Asimetría	,340			,661	
Curtosis	-1,363			1,279	

Continuación Tabla 4. Descriptivos para la biomasa de *Lactococcus lactis*

12,5% Fructosa	Media		2,915000E4	1,7109053 E3
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	2,538432E4	
		Límite superior	3,291568E4	
	Media recortada al 5%		2,895000E4	
	Mediana		2,820000E4	
	Varianza		3,513E7	
	Desv. típ.		5,9267498E3	
	Mínimo		22300,0000	
	Máximo		39600,0000	
	Rango		17300,0000	
	Amplitud intercuartil		9925,0000	
	Asimetría		,584	,637
	Curtosis		-,683	1,232

Tabla 5. Descriptivos para los Sólidos totales (°Brix) de *Lactococcus lactis*

%	7,5% Fructosa	Media	8,981818	,5421 872
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	7,773750
			Límite superior	10,189887
		Media recortada al 5%	8,924242	
		Mediana	9,000000	
		Varianza	3,234	
		Desv. típ.	1,7982315	
		Mínimo	7,0000	
		Máximo	12,0000	
		Rango	5,0000	
		Amplitud intercuartil	3,7000	
		Asimetría	,353	,661
		Curtosis	-1,164	1,279

Continuación Tabla 5. Descriptivos para los Sólidos totales (⁰ Brix) de *Lactococcus lactis*

10% Fructosa	Media		12,656364	,2795687
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	12,033446	
		Límite superior	13,279282	
	Media recortada al 5%		12,668182	
	Mediana		12,420000	
	Varianza		,860	
	Desv. típ.		,9272246	
	Mínimo		11,1000	
	Máximo		14,0000	
	Rango		2,9000	
	Amplitud intercuartil		1,2000	
	Asimetría		-,271	,661
	Curtosis		-,547	1,279
	12,5% Fructosa	Media		13,520000
Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	12,704955	
		Límite superior	14,335045	
Media recortada al 5%			13,522222	
Mediana			13,125000	
Varianza			1,646	
Desv. típ.			1,2827882	
Mínimo			11,0000	
Máximo			16,0000	
Rango			5,0000	
Amplitud intercuartil			1,2775	
Asimetría			,270	,637
Curtosis			1,195	1,232

En la tabla 5, se observa que para la concentración más eficiente de lactosuero de leche de búfala el máximo rango de sólidos totales se encuentran por el orden de 12.

Tabla 6. Pruebas de normalidad

concentracion		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
ufc	7,5% Fructosa	,299	11	,007	,803	11	,010
	10% Fructosa	,196	11	,200 [*]	,890	11	,141
	12,5% Fructosa	,179	12	,200 [*]	,911	12	,221
%	7,5% Fructosa	,216	11	,160	,896	11	,163
	10% Fructosa	,209	11	,194	,929	11	,403
	12,5% Fructosa	,259	12	,025	,892	12	,126

En la tabla 6, se puede apreciar que como el nivel de Sig (significancia) es menor a 0,05 en ambas pruebas, las concentraciones de fructosa influyen de manera significativa en la reproducción del *Lactococcus lactis*, las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk coinciden en afirmar que la concentración del 7,5 % de lactosuero de leche de búfala es la que produce un óptimo rendimiento en la producción del microorganismo.

IV.1.4. Efectividad del microorganismo validada a través del software Matlab, toolbox lógica difusa

La figura 15, muestra la estructura de un sistema lógico difuso empleado para representar el análisis sensorial de un queso tipo gouda elaborado con el *Lactococcus lactis* reproducido experimentalmente.

Los atributos utilizados como entradas: color, sabor, y textura son procesados por el controlador para obtener el atributo de salida: aceptación

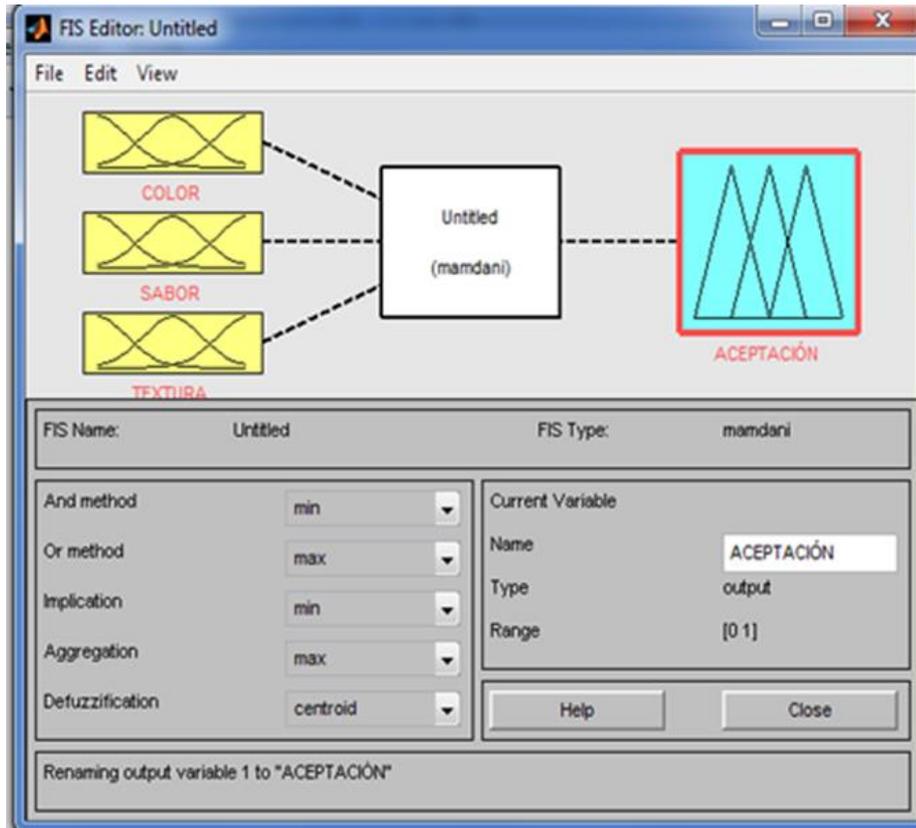


Figura 15. Estructura Difusa tipo Mandani

La figura 16, muestra las tres funciones de pertenencia del atributo aceptación las cuales van desde aceptable, regular e inaceptable.

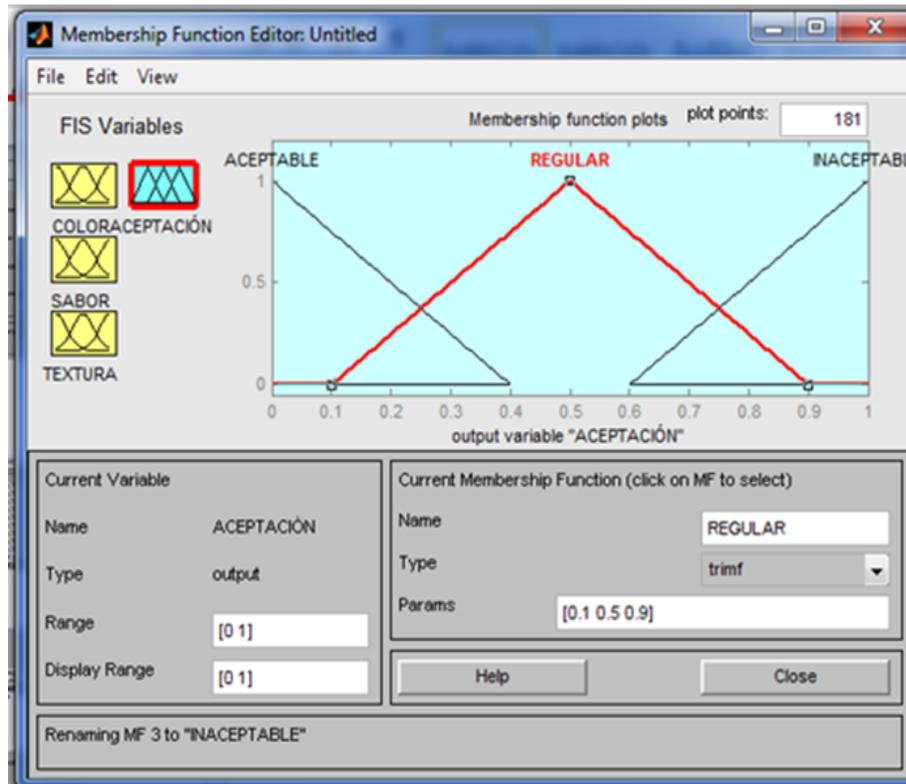


Figura 16. Funciones de pertenencia del atributo aceptación

En las figuras 17 y 18, se muestran las reglas utilizadas por el sistema para establecer las comparaciones e identificar el nivel de influencia de cada atributo en la aceptación global del queso tipo gouda.

“si el color es agradable y el sabor es bueno y la textura firme entonces el producto es aceptable”

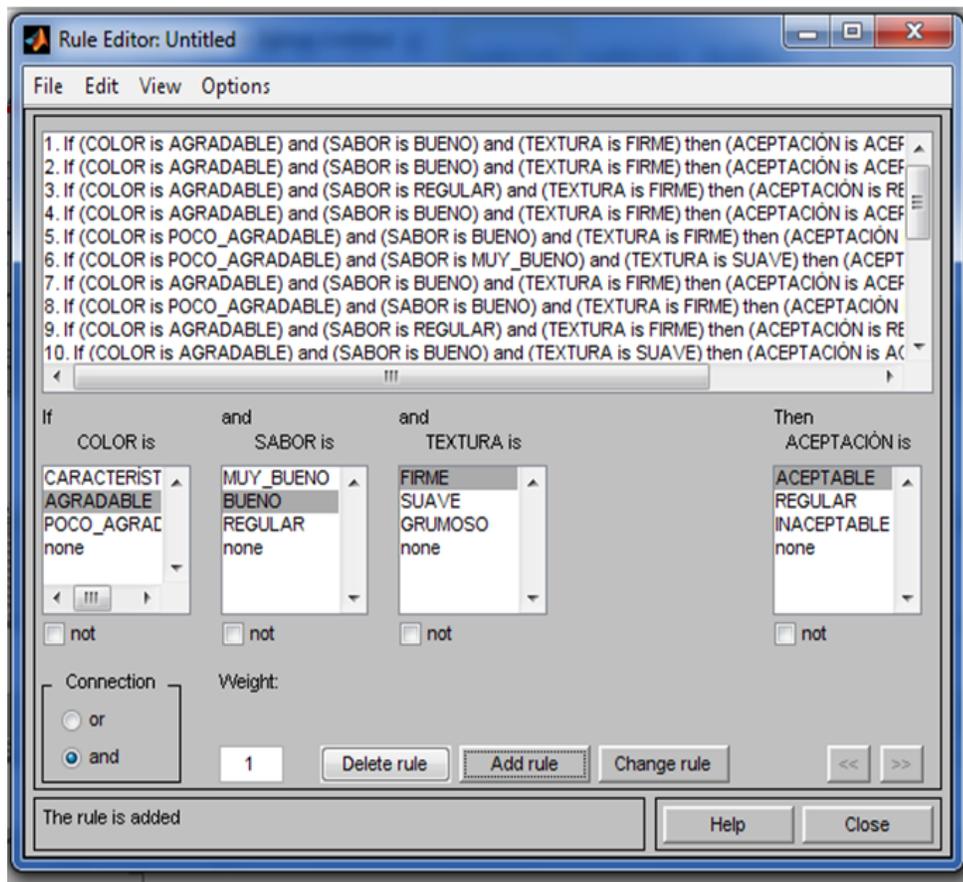


Figura 17. Reglas difusas para el sistema tipo Mandani

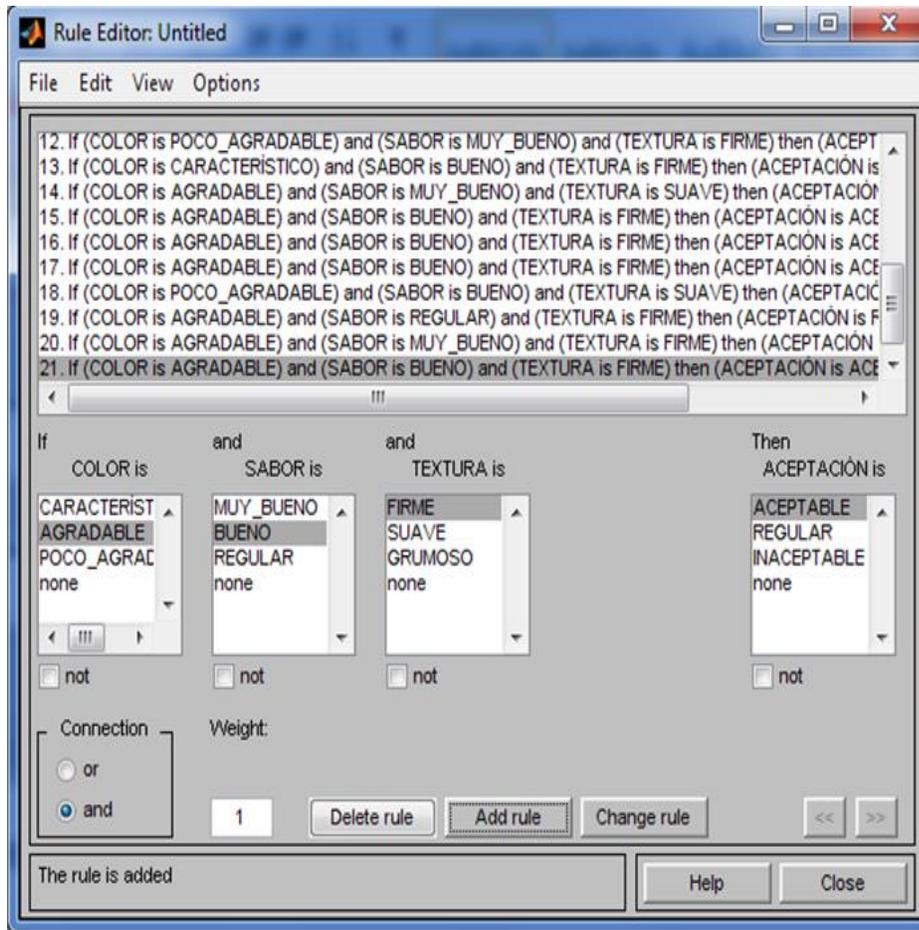


Figura 18. Reglas difusas para el sistema tipo Mandani

En las figuras 19, 20 y 21, se muestran los gráficos de las reglas que hemos ingresado donde se observan las superficies de acción de control del sistema diseñado donde se refleja el nivel de influencia de cada atributo sobre la aceptación global del producto elaborado con el microorganismo reproducido a escala de laboratorio.

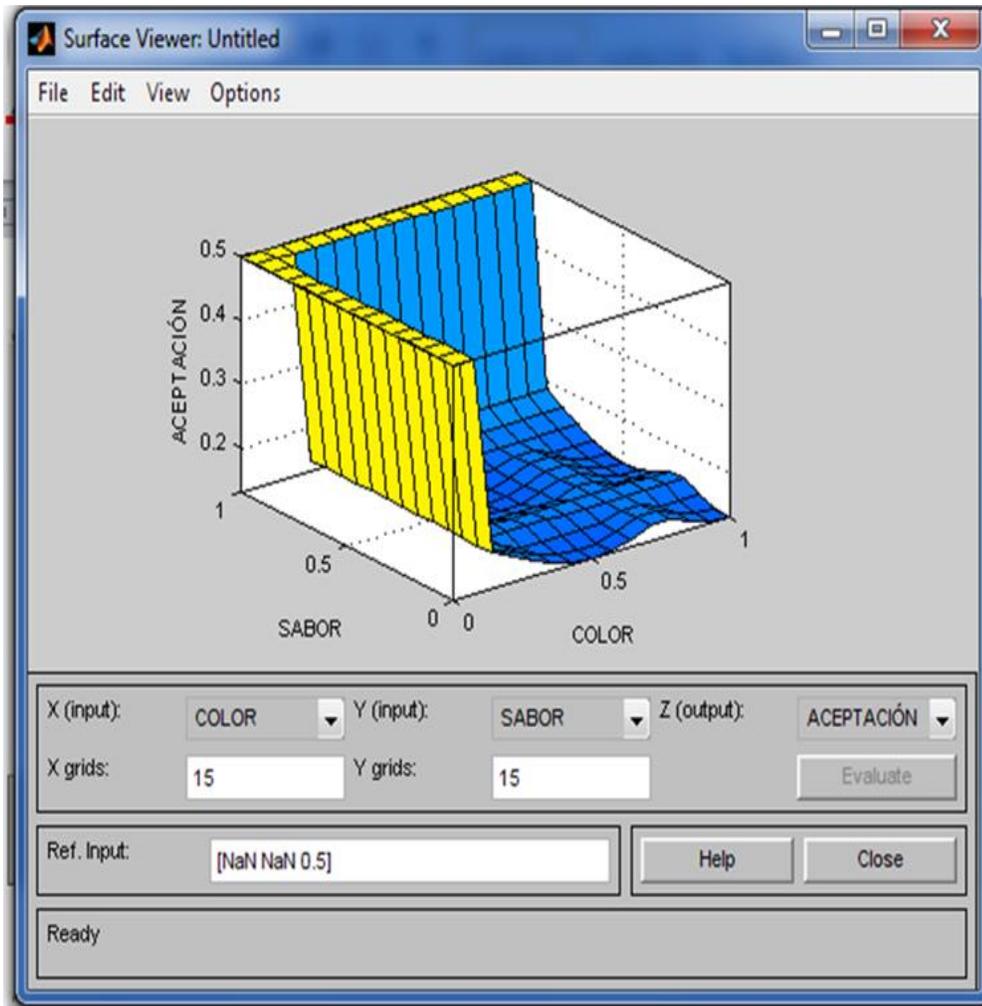


Figura 19. Superficie de acción de control del sistema para el atributo color y sabor

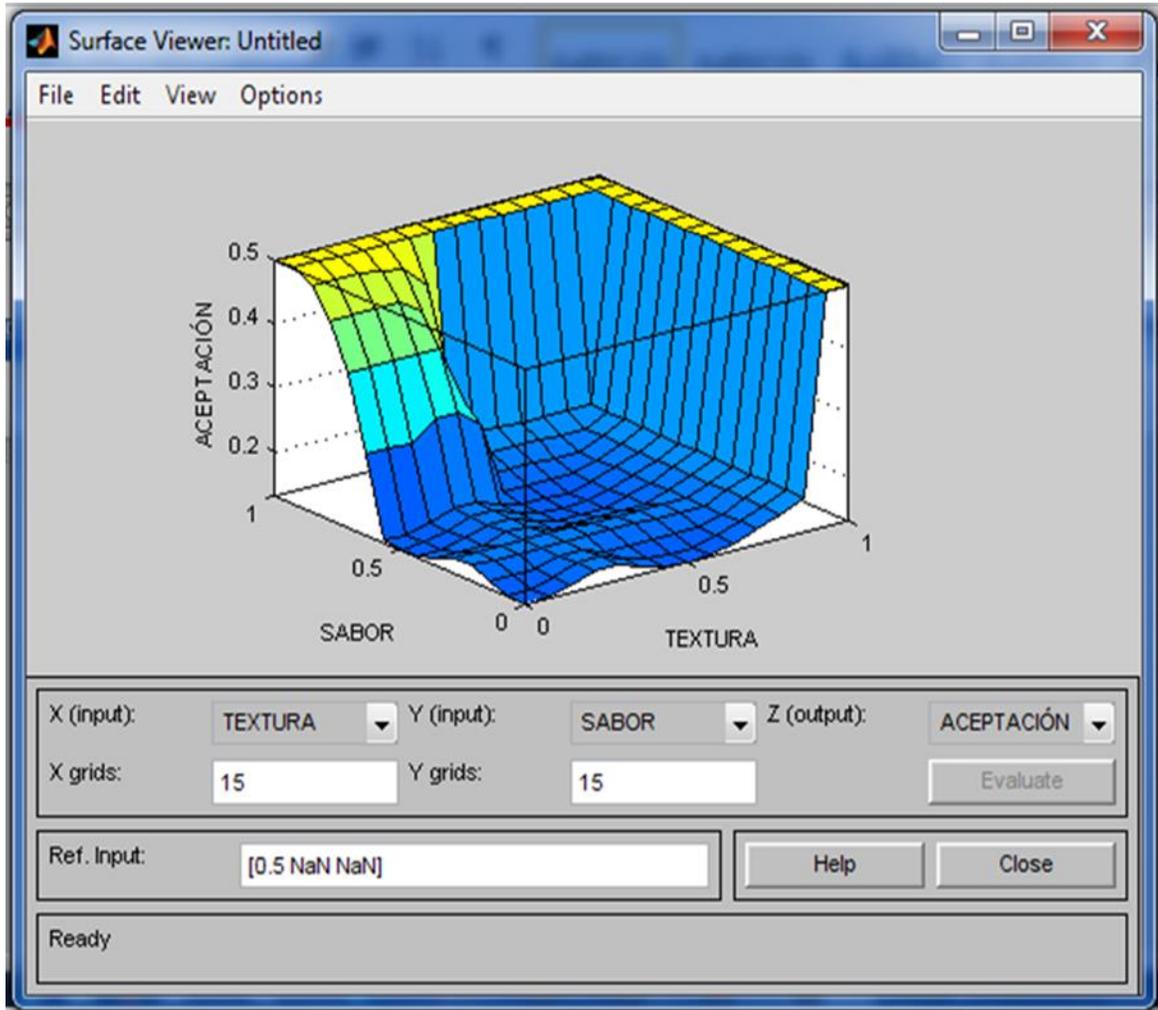


Figura 20. Superficie de acción de control del sistema para el atributo textura y sabor

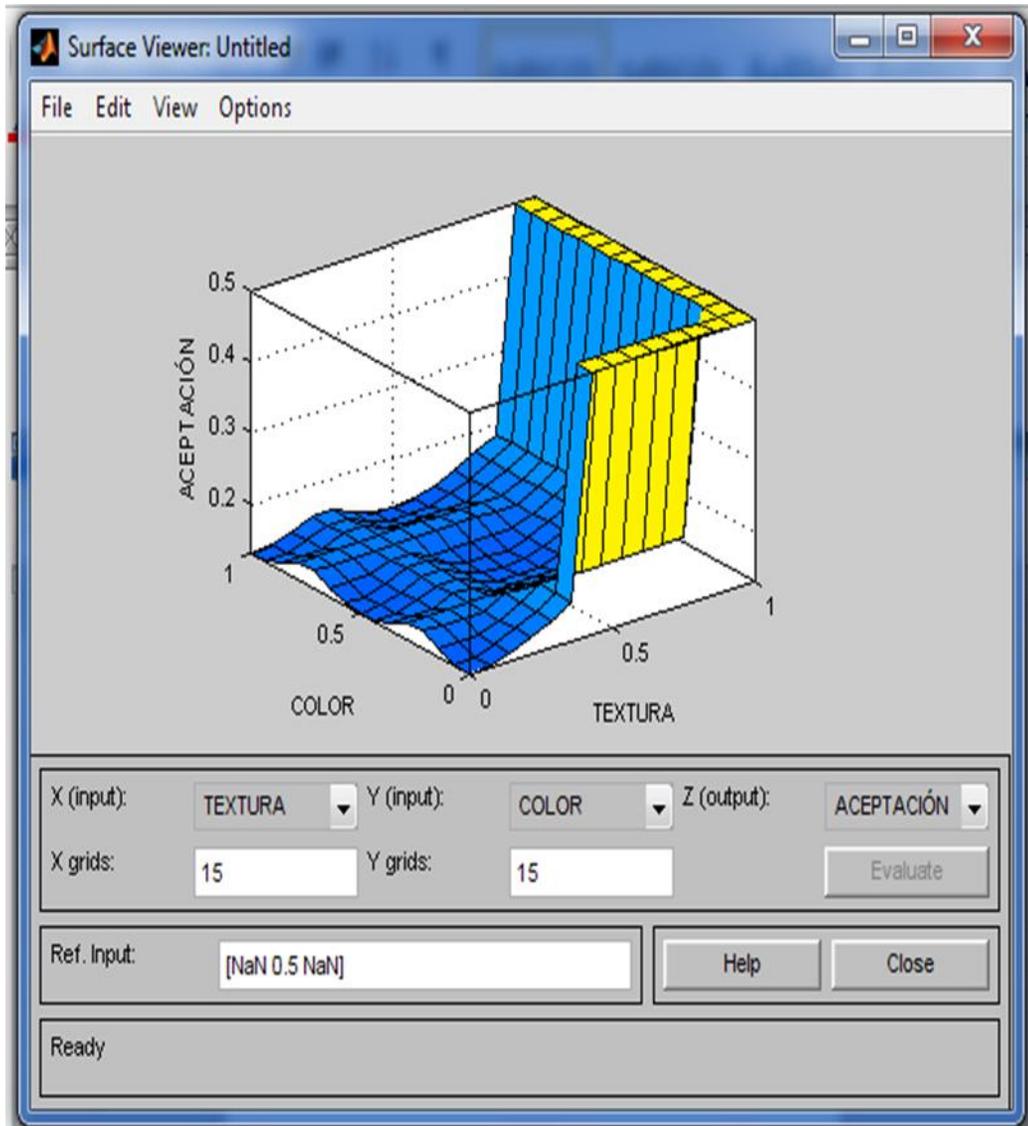


Figura 21. Superficie de acción de control del sistema para el atributo color y textura

CONCLUSIONES

Luego de los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo de grado se han establecido las siguientes conclusiones:

- Los resultados obtenidos mediante la caracterización del lactosuero de leche de búfala arrojó como resultado que el mismo es un medio favorable para el crecimiento microbiano, además de esto es altamente nutritivo para ser empleado como medio de alimentación para el *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) debido a la cantidad de proteína, grasa y sólidos totales que este posee.
- Sé estableció que para el sustrato lactosuero de leche de búfala la concentración más óptima dentro de los rangos en estudio para la generación de biomasa de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) fue de 7,5% de fructosa; donde se tuvo una fase de adaptación desde la hora 0 hasta la hora 2 y luego comienza un crecimiento exponencial de 10 horas, logrando un rango cercano de 9×10^9 unidades formadoras de colonias (ufc) de la biomasa láctica.
- El modelo que contiene la descripción del proceso bajo estudio logra ajustarse con un grado de exactitud elevado, debido a que proyectó una eficiencia de 1000 % situando al sustrato en una categoría de súper eficiente.

- Se demostró a través del uso del software análisis frontier banxia que es posible minimizar la entrada grados brix (nutrientes) y maximizar la salida biomasa (ufc) con una alta eficiencia del proceso bajo la estrategia propuesta por el DEA, además descubrir los puntos potencialmente más eficientes que permiten visualizar información importante en el crecimiento del *lactococcus lactis*. Debido a que posee mayores niveles de ufc en 7,5 % de fructosa.
- El Análisis DEA permite obtener la frontera más eficiente para las entradas y salidas de un proceso biotecnológico tan importante, como la producción de microorganismos, debido a que optimiza la medida de eficiencia de cada unidad analizada.
- Por medio del análisis envolvente de datos (DEA), se logró evaluar y comparar la eficiencia de los sustratos: lactosuero de leche de búfala y lactosuero de leche de cabra para la generación de biomasa de *lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454); obteniendo una eficiencia de 200% para el lactosuero de leche de cabra y 1000% para el lactosuero de leche de búfala. Lo que permite concluir que ambos sustratos son eficientes en la producción del microorganismo láctico, sin embargo uno resultó ser 800% más eficiente, el cual es el lactosuero de leche de búfala.

RECOMENDACIONES

Para desarrollar futuros trabajos de investigación en el área de bioprocesos, para el cultivo de microorganismos, se proponen las siguientes recomendaciones:

- Realizar el estudio de la cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* durante más de 12 horas, para determinar el tiempo en que el microorganismo paraliza totalmente su reproducción.
- Efectuar estudios comparativos con lactosuero común, con la finalidad de valorar el rendimiento en la producción de biomasa de *Lactococcus lactis*.
- Emplear concentraciones más fuertes de hidróxido de sodio para regular las variaciones de pH.
- Dejar intervalos de descanso entre una corrida y otra para evitar el agotamiento del microorganismo, y así de esta manera tenga una fase de adaptación más corta y un mejor desarrollo.
- Dotar al laboratorio con los recursos y suministros mínimos necesarios para la realización de este tipo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Aguiar H.; Guerrero A. (2009). Producción de un Concentrado Proteico a partir de Lactosuero. [Artículo en línea]. [Consultado 08/05/2016] Disponible en: <http://200.35.84.131/portal/bases/marc/texto/2101-09-02532.pdf>

Ahmad, S. (2008). Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: a comparison with cow's milk, Food Chemistry, 106 (1), 11-17. [Consultado 30/07/2016] Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=3118193&pid=S0718-0764201300010001000001&lng=es

Aider, M., D. Halleux e I. Melnikova. 2009. crioconcentración suero de la leche y la evaluación de sus propiedades funcionales: Impacto de procesamiento condiciones. Innovative Food Science and Emerging Tecnologías 10 (3): 334-341.

Andrade, R., Arteaga, M., y Simanca, M. (2010). Efecto del salvado de trigo en el comportamiento reológico del yogurt de leche de búfala, Información Tecnológica, 21(5)117-124. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=3118195&pid=S0718-0764201300010001000002&lng=es

Anderson, M. y Calderón, V. (1999). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial: Diaz de Santos S.A. Segunda edición. Pag. 125-138.

Andrade, R., Vélez, G; Arteaga, M; Díaz, Y; y Sánchez, S. (2009). Efecto de la neutralización y adición de edulcorante en las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del arequipe de leche de búfala, *Vitae*, 16 (2), 201-209 [Artículo en línea] [Consultado 30/07/2016] Disponible en:http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=3118197&pid=S0718-0764201300010001000003&lng=es

Aracil, J., Gómez, F. (2007). Introducción a Matlab, Toolbox de Control y Simulink. Universidad de Alcalá: España. [Artículo en línea] [Consultado el 08/08/16]. Disponible en: <https://www.depeca.uah.es/depeca/repositorio/asignaturas/20614/transp.pdf>

Beardsley, D., Castro R., Feloeli, M., Keesman, A., Kraker, A., Vieto, J. (1996). 50 sugerencias para una mayor eficiencia ambiental en la industria de alimentos. Cesgeti, Cacia, Gobierno de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Bríñez, W.; Molero, E.; Villalobos, C.; Montiel, N.; Valbuena, E.; Castro, G.; & Urdaneta, S.; (2000). Parámetros de calidad y géneros bacterianos más frecuentes en leche cruda de búfala en el Municipio Mara, Estado Zulia. *Revista científica*, volumen X, No 4, pp. 346-352. [Consultado 09/06/2016] Disponible en:<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27392/2/articulo8.pdf>

Buchanan y Solberg. (1972). Curva de crecimiento. *Microbiología*. [Artículo en línea]. [Consultado 09/06/2016]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/267432029/Cinetica-Del-Crecimiento-Microbiano>

Byczko, G. D.; Byczko, N. A.; (2011). Leche de bufala en polvo. *Revista invenio*, volumen 14, No 27, pp. 135-152. [Consultado 10/06/2016] Disponible en:www.redalyc.org/pdf/877/87722114009.pdf

Cámara Nacional de Industriales de la Leche. (2011). El libro blanco de la leche y los productos lácteos. Primera edición, vol. 1, pp. 35-36. [Consultado 11/06/2016]
Disponible en:
http://www.canilec.org.mx/descarga_archivos_publico/Libro_Blanco_mail.pdf

Castillo, Y., Andino, F. (2010). Microbiología de los Alimentos. Universidad Nacional de Ingeniería. Estelí: Nicaragua. [Artículo en línea] [Consultado el 22/08/16]. Disponible en: <https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>

Clark (1996). Biorreactores (Tesis). [Artículo en línea] [Consultado el 22/08/16].
Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/1608/Capitulo2.pdf>

Callejas, J., Prieto, F. Reyes V., Marlejo, Y. y Mendez, M.A. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero.

Durango, L. 2007. Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras. Nativas tipo *saccharomyces*spp. A nivel de laboratorio. [Artículo en línea]. [Consultado 09/06/2016].
Disponible en:
https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/399/LauraPatricia_DurangoLondo%F1o_2007.pdf?sequence=1

Endara, F.; (2002). Elaboración de una Bebida a partir del Suero de Queso y Leche Descremada. [Artículo en línea] [Consultado 11/05/2015]
<http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2312/1/T1523.pdf>

Foegeding, E., y P, Luck. 2002. Los productos de proteína de suero de leche. 1957-1960. Enciclopedia de Ciencias de Alimentos y Nutrición. Academic Press, Nueva York.

García, Q.; (2014) Curva de crecimiento. [Artículo en línea] [Consultado 09/06/16] Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>

Hernández Sampieri, R. (2010). Metodología de la investigación. 5ta Edición. México: Mc Grauw Hill.

Hernández Sergio (2012). Lógica difusa (fuzzy logic). [Artículo en línea] [Consultado 30/09/16] Para más información disponible en: <http://es.slideshare.net/CrypticHernandezOrtega/lgica-difusa-fuzzy-logic?related=1>

Sierra, L. (2012). Evaluación de la preservación de extractos líquidos de café mediante el uso de bacteriocina (nisina) y aplicación de microondas [Tesis MSc].

Hernández, M.; Vélez, J.; (2014). Suero de leche y su aplicación en alimentos funcionales. [Artículo en línea]. [Consultado 07/06/2016] Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-82-Hernandez-Rojas-et-al-2014.pdf>

Hussain, I., Yan, J., Grandison, A.S., y Bell, A.E. (2012). Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk: 2. Curd yield, overall quality and casein fractions, Food Chemistry, 135(3), 1404-1410. [Artículo en línea] [Consultado 30/07/2016] Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=3118211&pid=S0718-0764201300010001000010&lng=es

International commission on Microbial specifications for Food, of the international Union of Biological Societies. (ICMSF). 2000. Microorganismos de alimentos: su significado y métodos de enumeración. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Javanovic, S., Barac, M., y Macej, O. (2005). Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.

Jay, J. M. (2000). Microbiología moderna de los alimentos. 4ta Edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp 19-27.

Jelen, P. (2003). Procesamiento de suero de leche. Utilización y productos. *Enciclopedia de las ciencias de lácteos*, 4 , 2739-2745

Leveau, J., Bouix, M. (2000). Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp 167-242

López I. y Borzacconi L. (2009). Introducción del diseño de reactor. Facultad de Ingeniería. Lima Perú.

Liu, X., K. Chung, S. Yang and A. Yousef. 2005. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Journal Process Biochemistry* 40: 13-24.

Mago, H.; & Matera, M. (2012). Diseño de una estrategia de control para la producción de *Lactococcus lactis* utilizando como sustrato lactosuero de leche de cabra. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, Cojedes, Venezuela.

Martínez, F.; Yulán, C.; Villafane, R.; Cardozo, M.; Vasek, O. (2009). Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* 166cVCOR. [Artículo en línea] [Consultado 11/06/16] Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2009/CE-023.pdf>

Martínez, B. (1996). Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* Aislados de quesos Asturianos: Nisina Z y Lactococina 972 (Tesis de Doctorado). Universidad de Oviedo, España.

Maza, M; y Legorreta, P. (2011). Generalidades de la Leche y los Productos Lácteos. En Cámara Nacional de Industriales de la Leche. El libro blanco de la leche y los productos lácteos (pp. 35-36). México, D.F. [Artículo en línea] [Consultado 30/07/2016] Disponible en: http://www.canilec.org.mx/descarga_archivos_publico/Libro_Blanco_mail.pdf

Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 94 p. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/>

Molina, J; y Uribarren, T. (2015). Generalidades de Bacterias. [Artículo en línea] [Consultado 28/07/16] Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/8416/1/bea%20tesis.pdf>

Morr, C., y Ha, E. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in food science and nutrition*, 33(6), pag 431-439.

Norma Venezolana. COVENIN 1315-79. Alimentos. Determinación del pH.

Norma Venezolana. COVENIN 658-97. Leche y sus Derivados. Determinación de la Acidez Titulable.

Norma Venezolana. COVENIN 1053-82. Leche Fluida. Determinación de Grasa por el método de Gerber.

Norma Venezolana. COVENIN 370-1997. Leche y sus Derivados. Determinación de Proteína.

Norma Venezolana. COVENIN 2851-92. Queso Gouda.

Norma Venezolana. COVENIN 1337-90. Alimentos. Métodos para recuento de Mohos y Levaduras.

Normas Internacionales de los Alimentos. CODEX STAN 283-1978. Norma General para el Queso.

Panesar, P., Kennedy, D., Gandhi, D. y Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1-14

Patiño, E. M.; La leche de búfala. [Artículo en línea]. [Consultado 10/06/2016] Disponible en: www.produccion-animal.com.ar/

Piña, M.; Uribe, D.; Regalado, C.; Amaya, S.; Castaño, E.; & García, B. (2011). Producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersión. [Artículo en línea] [Consultado 11/06/16] Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v4-n2/t6.pdf

Patiño, E. (2004). Factores que afectan las propiedades físicas y la composición química de la leche de búfalas (*Bubalus bubalis*) en Corrientes, Argentina, *Revista electrónica de Veterinaria*, 15 (1), 21-25. [Consultado 30/07/2016] Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=3118221&pid=S0718-0764201300010001000015&lng=es

Patiño, E. (2003). Caracterización de leche de búfalas mestizas en pastizales naturales de Corrientes, Argentina. *Rev. Argentina de Producción Animal*. 22: 199-203. [Consultado 30/07/2016] Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050505/050507.pdf>

Parra, R., (2009) Digestión anaeróbica del lactosuero: Efecto de altas cargas puntuales. [Artículo en línea] [Consultado el 08/08/16]. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24956/37006>

Parra, F. (2007). Análisis de eficiencia y productividad (Tesis de Doctorado). [Artículo en línea]. [Consultado 09/06/2016]. Disponible en: <https://econometria.files.wordpress.com/2007/12/analisis-de-eficiencia-y-productividad.pdf>

Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (1999). *Microbiología*. 4ta edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Zaragoza, España. pp. 515-518

Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40 (4), 379-403

Rodríguez A., Cabrera A., y Valencia F., (2003) Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo. *Revista Mexicana de*

Ingeniería Biomédica Vol. 24 N° 1 p. 56-70. [Consultado 13/09/2016] [Artículo en línea] Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/inge/ib-2003/ib031h.pdf>

Daniel Rodríguez (2013), Control avanzado de sistemas inteligentes. [Artículo en línea] [Consultado 30/09/16] Para más información disponible en: <http://es.slideshare.net/CrypticHernandezOrtega/lgica-difusa-fuzzy-logic?related=1>

Sabarrieta, N.; (2008). El análisis Envolvente de Datos. [Artículo en línea] [Consultado 11/05/2015] Disponible en: <http://www.eumed.net/tesis-doctorales/2010/mnsa/Analisis%20Envolvente%20de%20Datos.htm>

Simanca, M.; Andrade, R.; Arteaga, M.; (2013). Efecto del Salvado de Trigo en las Propiedades Fisicoquímicas y Sensoriales del Yogurt de Leche de Búfala. Información Tecnológica Vol. 24(1), 79-86 (2013). [Consultado 09/06/2016] Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642013000100010&script=sci_arttext&tlng=e

Tamayo, M. (1997). El proceso de la investigación científica. México: Editorial Limusa.

Urribarrí, L.; Vielma, A.; Páez, G.; Ferrer, J.; (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando lactobacillus helveticus en cultivo continuo. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIV, N° 4, 297 – 302 paginas 297-301 [Consultado 09/05/2015] Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28117/2/art2.pdf>

UNELLEZ. 2014. Plan general de investigación de la UNELLEZ, 2008-2012.

Valbuena, E.; Barreiro, J.; Sánchez, E.; Castro, G.; Bríñez, W.; & Tovar, A.; (2005). Modelos cinéticos aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis*. Subsp. *lactis* en leche. Revista científica, vol. XV, No 5, pp. 464- 475. [Consultado 11/06/2016] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/959/95915511.pdf>

Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., Valero, K., y Bríñez, W. (2008) Predicción del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* en leche descremada estéril en función de la temperatura. Revista Científica Maracaibo Vol. XVIII, N°6 [Artículo en línea] [Consultado 11/08/2016]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592008000600014

Walzem, R. L., Dillard, C. J. y German, J. B. (2002). Whey components millenina of evolution create functionalities for mammalian nutrition what we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(4), 353-375.

ANEXOS

ANEXO N° 01

Elaboración de caldo nutritivo para la activación del microorganismo *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).



ANEXO N° 02

Tubos de ensayo con el caldo nutritivo y ya inoculado el microorganismo *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454).



ANEXO N° 03

Preparación de agar Plate Cout para el inicio de la corrida microbiológica



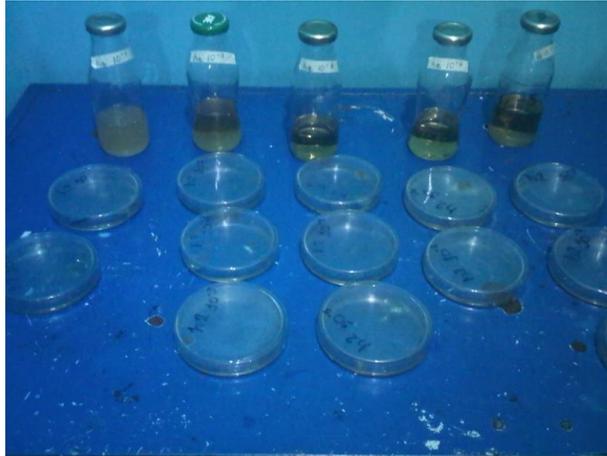
ANEXO N° 04

Frasco con agua peptonada para las diluciones.



ANEXO N° 05

Placas de petri preparadas para iniciar el proceso de siembra de *Lactococcus lactis* (ATCC 11454).



ANEXO N° 06

Biorreactor instalado en una plancha de agitación, con termómetro y pH metro para el control de las condiciones adecuadas para dar inicio a la reproducción de *Lactococcus lactis* (ATCC 11454) en el sustrato: lactosuero de leche de búfala.



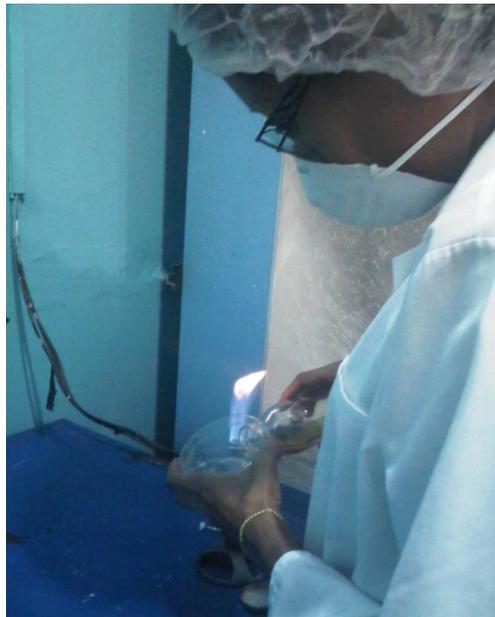
ANEXO N° 07

Realización de diluciones.



ANEXO N° 08

Siembra en profundidad.



ANEXO N° 09

Medición de los °Brix



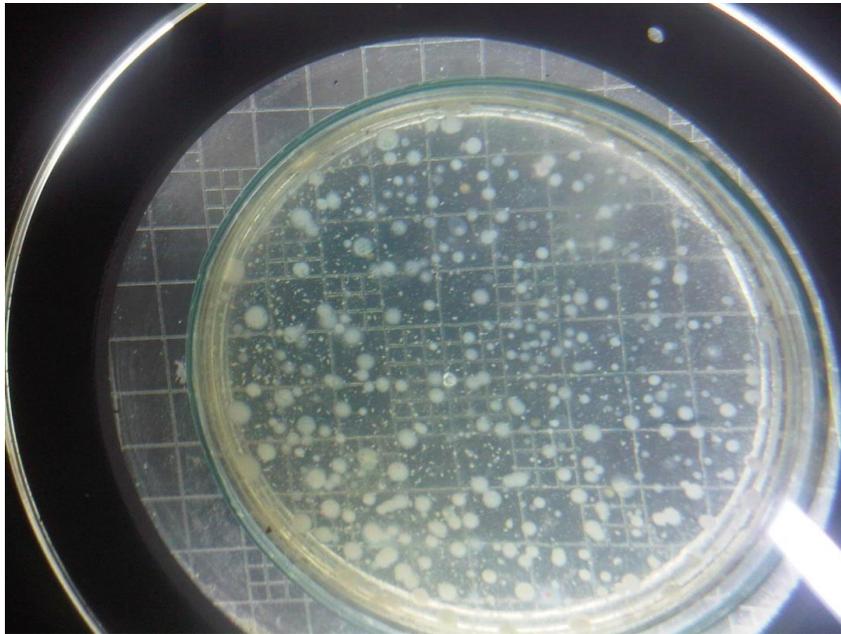
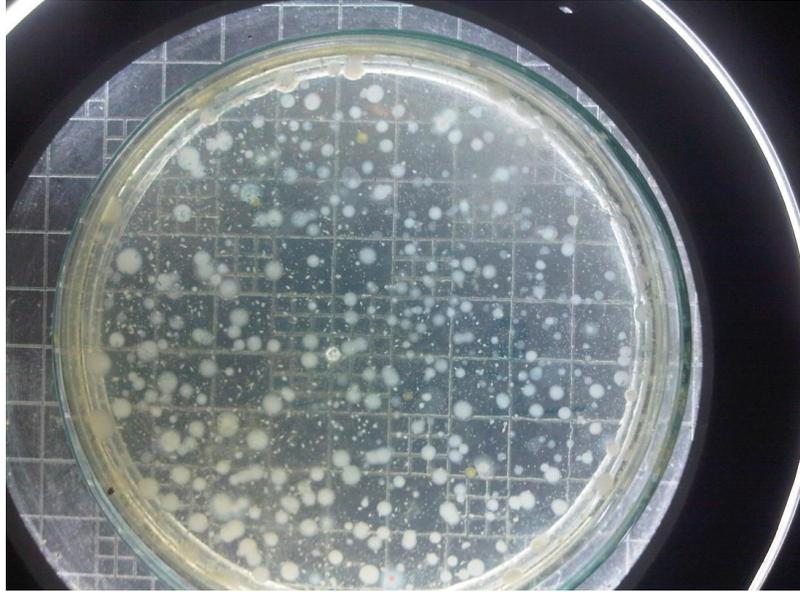
ANEXO N° 10

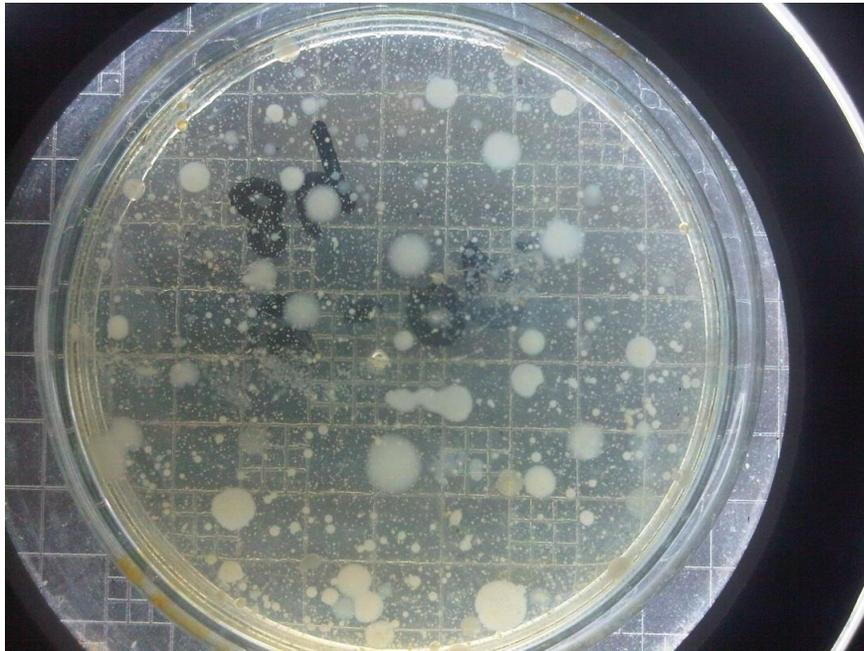
Placas de Petri sembradas y colocadas en una estufa a 36°C para la incubación.



ANEXO N° 11, 12 y 13

Crecimiento de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) en placas de Petri





ANEXO N° 14

Centrifugado de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) Corrida 01



ANEXO Nº 15

Centrifugado de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) Corrida 02



ANEXO Nº 16

Centrifugado de *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454) corrida 03



ANEXO N° 17

Biomasa final



ANEXO N° 18

Elaboración de queso tipo gouda con *Lactococcus lactis lactis* (ATCC 11454):
cuajada



ANEXO Nº 19

Queso tipo gouda

