

COMPORTAMIENTO POBLACIONAL DE *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*
EN UN MEDIO A BASE DE SUERO DE LECHE

ANA ESCOBAR CANO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
2008

COMPORTAMIENTO POBLACIONAL DE *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*
EN UN MEDIO A BASE DE SUERO DE LECHE

ANA ESCOBAR CANO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo
con énfasis en Ecología

ASESORA:
MSc. MILENA GUERRERO FLÓREZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGIA
2008

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1 del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanada del honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Directora

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto _____

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Milena Guerrero Flórez, por toda su paciencia y dedicación puesta para la elaboración de este trabajo.

A la profesora Luz Estela Lagos Mora, directora del Departamento de Biología, quien puso su entera confianza en mí, además por su apoyo incondicional académico y personal a lo largo de mi carrera.

A mis jurados Dr. Pablo Fernández & Esp. Fabiola Romo por su comprensión y por abrir un espacio en su valioso tiempo para la evaluación de este trabajo.

A la Empresa Lácteos Andinos de Nariño Ltda. Por su comprensión y apoyo logístico en la realización de esta investigación.

A Jhon Jairo Calderón por el apoyo que me brindó a lo largo de mi formación profesional.

Al profesor Guillermo Castillo por ser mi maestro durante toda la carrera.

A mi gran amiga Carolina Obando, por su ayuda en todo este proceso, por sus conocimientos, apoyo y compañía que me ayudaron a lograr que este proyecto se convierta en una realidad.

A los laboratoristas Guido Villota y Mauricio Rodríguez por toda su colaboración, paciencia en el desarrollo del trabajo de laboratorio.

A Sandra Álvarez y Eliana Revelo por su colaboración en los momentos difíciles de este trabajo.

A Doña Cecilia Leyton, Marta Calderón y Amparo Castillo, por su ayuda y apoyo incondicional a lo largo de todo este tiempo.

A Sergio, por ser el motivo que me impulsa a seguir luchando.

A mi madre, que aunque ahora no está presente físicamente para compartir este logro conmigo, siento su presencia y amor en cada paso de mi vida.

A Dios, por guiar mi vida y darme cada día la oportunidad de crecer como persona.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	18
1. TITULO	
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo General	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. MARCO REFERENCIAL	22
4.1 Impacto ambiental asociado a la actividad de la industria láctea	22
4.2 Problemas para la utilización del lactosuero	23
4.3 Características del lactosuero	23
4.4 Probióticos	25
4.5 Bacterias ácido lácticas	26
4.6 Parámetros de fermentación	31
5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y DISEÑO METODOLOGICO	36
5.1 Diseño experimental	36
5.2 Diseño metodológico	37
5.3 Análisis de resultados	39
5.3.1 Análisis del comportamiento de <i>L. casei subsp. rhamnosus</i> en el medio a base de suero de leche	39
5.3.2 Balance de masas	40
5.4 Análisis de factores y variables.	40

5.5 Análisis fisicoquímico post fermentación.	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1 ETAPA I. Activación y conservación de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i>	41
6.2 ETAPA II: cinética de crecimiento de <i>L. casei subsp rhamnosus</i> en medio a base de suero de leche y evaluación de parámetros de fermentación.	42
6.2.1 Preparación de inóculos y preinóculos	42
6.2.2 Cinética de crecimiento de <i>L. casei subsp rhamnosus</i> en medio a base de suero de leche	42
6.2.3 Análisis del comportamiento de <i>L. casei subsp rhamnosus</i> en relación con el factor velocidad de agitación durante 24 horas de fermentación	44
6.2.4 Evaluación de parámetros de fermentación	47
6.3 ETAPA III. DISEÑO EXPERIMENTAL PRELIMINAR	53
7. CONCLUSIONES	61
8. RECOMENDACIONES	62
9. LITERATURA CITADA	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de lactosuero.	26
Tabla 2. Composición de lactosuero dulce fluido	27
Tabla 3. Factores a evaluar durante la fermentación de <i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>ramnosus</i> en suero de leche.	36
Tabla 4. Composición de los medios empleados para la fermentación de <i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>ramnosus</i> en suero de leche.	36
Tabla 5. Respuestas evaluadas durante la fermentación de <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> .	39
Tabla 6. Combinación de Factores y Niveles utilizados en la determinación de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> .	42
Tabla 7. Factores, variables y resultados obtenidos durante la fermentación de <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> .	43
Tabla 8. Datos de balance de masas y rendimientos para ensayos 1 a 15 con <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> .	52
Tabla 9. Descripción del diseño experimental preliminar.	53
Tabla 10. Resultados de análisis de de DBO5 realizados a ensayos seleccionados.	58
Tabla 11. Resultados de análisis de de DQO realizados a ensayos seleccionados.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Influencia de los efectores internos y externos sobre la expresión celular	32
Figura 2. Morfología macroscópica y microscópica de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i>	41

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Dinámica de crecimiento de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> a 200 rpm.	45
Grafica 2. Dinámica de crecimiento de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> a 120 rpm.	46
Grafica 3. Dinámica de crecimiento de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> a 300 rpm.	47
Grafica 4. Producción de proteínas por <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> , ensayo 6.	48
Grafica 5. Producción de proteínas por <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> , ensayo 3.	49
Grafica 6. Producción de proteínas por <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> , ensayo 14.	49
Grafica 7. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares por <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> , ensayo 2.	50
Grafica 8. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> , ensayo 2.	51
Grafica 9. Cambios de pH de <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> , ensayo 2	51
Grafica 10. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares por <i>Lactobacillus casei subsp rhamnosus</i> , ensayo 8.	52
Grafica 11. Diagrama de Pareto y Superficie de Respuestas para Variable biomasa	54
Grafica 12. Diagrama de Pareto y Superficie de Respuestas para Variable ácido láctico	55
Grafica 13. Diagrama de Pareto para Variable consumo de sustrato	56
Grafico 14. Diagrama de Pareto para Variable pH	57
Grafico 15. Diagrama de Pareto para variable producción de proteínas.	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias. Método de Recuento en Placa	68
Anexo B. Determinación de Consumo de Azúcares Totales. Método de Antrona o Dubois	68
Anexo C. Determinación de Producción de Proteínas. Método de Lowry modificado.	69
Anexo D. Determinación de Producción de Acido Láctico.	71
Anexo E. Determinación de pH.	71
Anexo F. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno	72
Anexo G. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno	75

GLOSARIO

ADENOCARCINOMA: tumor maligno que se origina del epitelio glandular.

ADP: adenosina difosfato, nucleósido que se forma generalmente tras la hidrólisis del ATP, cuando suministra energía para el metabolismo.

AGENTE ANTIMICROBIANO: agente que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos.

AGENTES PROBIOTICOS: monocultivos o mezclas de microorganismos vivos que al ser ingeridos por el hombre o los animales actúan benéficamente, mejorando el balance microbiano y las propiedades de la microflora del intestino.

ANTIBIÓTICO: agente químico producido por un organismo que es dañino para otro microorganismo.

ATP: adenosina 5- trifosfato, molécula muy energética que posee un potencial de transferencia del grupo fosfato elevado, constituyendo la principal “moneda “ de energía de la célula.

BACTERICIDA: que produce la muerte de las bacterias.

BACTERIOCINA: moléculas de naturaleza proteica, co-agregados de proteínas o bien glicoproteínas producidas por las bacterias lácticas que poseen una marcada acción inhibitoria sobre otras cepas bacterianas muy similares.

BACTERIOFAGO: virus que infecta células procarióticas.

BACTERIOSTATICO: que inhibe el crecimiento de las bacterias sin causar su muerte.

BIOMASA: o masa celular, se puede estimar mediante diversos métodos dependiendo del microorganismo de que se trate.

BIOTA INTESTINAL: microorganismos vivos que se encuentran colonizando el tracto gastrointestinal humano.

CANCER: tumor maligno que se extiende localmente, invadiendo los tejidos adyacentes, y sistemáticamente, por metástasis.

CANCERIGENO: calificativo que reciben los factores que se sabe producen algún tipo de cáncer y que pueden ser de naturaleza física, química, bacterial o viral.

CARCINOGENO: sustancia que inicia la formación de un tumor, suele ser también un mutágeno.

CARCINOMA: tumor maligno constituido por la proliferación indefinida de células epiteliales, con tendencia a la infiltración de tejidos vecinos y a extenderse lejos del foco primario por metástasis.

CATALASA: enzima del grupo de las cromo proteínas porfirínicas, cuya molécula contiene ión férrico y que interviene en la descomposición del agua oxigenada. Su acción catalítica es extraordinariamente rápida; existe en los tejidos vegetales y animales y también en algunos géneros de bacterias.

CEPA: población de organismos que descienden de un único organismo o de un cultivo puro.

CITOCROMO: anillos porfirínicos con hierro que forman complejos con proteínas, y que actúan como portadores de electrones en el sistema de transporte de electrones.

COLONIA: grupo o conjunto de microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida como la de un medio de cultivo con agar. La colonia se observa a menudo directamente, pero también puede verse solamente con microscopio.

COLONIZACION: establecimiento de una zona de multiplicación microbiana sobre una superficie inanimada u organismo, sin que tenga como consecuencia necesariamente la invasión o daño tisular.

CULTIVO DISCONTINUO: cultivo de microorganismos producido al inocular un medio de cultivo en un sistema cerrado, es decir, sin una renovación de los nutrientes ni eliminación de los residuos durante la incubación.

CULTIVO INICIADOR O STARTER: inóculo compuesto por una mezcla de microorganismos seleccionados que se emplea para comenzar una fermentación.

EFFECTOS ANTIMICROBIANOS: actividad antagonista contra patógenos por parte de una bacteria láctica, incluyendo la utilización de compuestos antimicrobianos específicos producidos por ésta.

ENFERMEDAD INFECCIOSA: cualquier cambio producido en el estado de salud de un organismo en el que parte o la totalidad del huésped no pueden desempeñar sus funciones normales por la presencia de un agente infeccioso o de sus productos.

ENTEROPATOGENOS: bacterias entéricas entre las que están muchas cepas patógenas para el humano, animales y plantas.

FERMENTACION: proceso liberador de energía en el cual las moléculas orgánicas actúan tanto de donadores como de aceptores de electrones.

FERMENTACION ACIDO LACTICA: fermentación que produce ácido láctico como uno o principal producto final.

FOSFORILACION: síntesis de enlaces fosfato de alta energía, como el ATP.

GASTRITIS: inflamación aguda o crónica del estómago, en especial de su capa mucosa.

GLUCOLISIS: conversión anaeróbica de glucosa en ácido láctico por la vía de Embden Meyer-Hoff Parnas.

HUESPED: cuerpo de un organismo que aloja a otro. Se puede considerar, como un micro ambiente que protege y mantiene el crecimiento y la multiplicación del organismo parásito.

in batch: fermentación discontinua que puede ser considerada como un “sistema cerrado”.

INHIBICION: fenómeno por el cual el funcionamiento de una actividad biológica disminuye o cesa completamente por la acción de un agente de naturaleza variable denominado inhibidor. La inhibición de contacto es una acción que se manifiesta en los cultivos *in vitro* de células sanas. Las células proliferan y ocupan zonas cada vez mayores del sustrato hasta que sus prolongaciones entran en contacto con las membranas de otras células.

INOCULO: crecimiento optimizado de células microbianas que va a dar origen a un proceso fermentativo, reconocido como el “material iniciador”.

***in vitro*:** locución latina que significa en vidrio. En general, se aplica a los procesos biológicos cuando se producen experimentalmente aislados del conjunto del organismo.

MICROAEROFILICO: un organismo aeróbico que puede crecer solamente cuando la tensión de oxígeno es inferior a la del aire.

MICROBIOTA: microorganismos asociados normalmente con un tejido o estructura particular, población microbiana autóctona.

OXIDASA: enzima que cataliza la oxidación de un sustrato por eliminación de hidrógeno que se combina con oxígeno molecular.

PATOGENO: se refiere a un organismo o material que produce una enfermedad.

SUSPENSIÓN CELULAR: se le denomina así a una concentración de células presentes en un cultivo líquido, el cual aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células haya, más luz se dispersa y más turbia aparece la suspensión.

TIEMPO DE DUPLICACION: tiempo necesario para que una población microbiana duplique su número.

TINCION DE GRAM: método de tinción usada en bacteriología. Permite diferenciar muchos tipos de bacterias que se tiñen (Gram +) por ejemplo: Staphylococcus, de otras que no lo hacen (Gram. -) por ejemplo: bacterias tifoideas. La tinción se debe a la presencia de las bacterias de una nucleoproteína.

TOXINA: sustancia microbiana perjudicial para el hospedador.

TURBIDIMETRIA: método aplicado para realizar el seguimiento del crecimiento microbiano en medios totalmente solubles, la absorbancia de suspensiones celulares se determina en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

ULCERA GASTRICA: se asocian con un exceso de secreción de ácido, y el dolor constituye el resultado de la erosión superficial de la capa de células que revisten la cara interna del estómago.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC): número de microorganismos que pueden formar colonias cuando se cultiva en medios de cultivos sólidos; indican el número de microorganismos viables en una muestra.

RESUMEN

Este estudio fue llevado a cabo para encontrar las condiciones óptimas de los factores velocidad de agitación, concentración de suero de leche y cantidad de carbonato de calcio para el crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* y la evaluación de los efectos sobre las variables respuesta mediante el uso de análisis por Superficie de Respuestas. Las variables evaluadas fueron producción de biomasa, producción de proteínas, consumo de azúcares, producción de ácido láctico y pH. Un diseño experimental denominado Box Behnken fue empleado para la asignación de la combinación de tratamientos. Las mejores condiciones para la producción de biomasa se obtienen en valores intermedios de carbonato de calcio y niveles altos de agitación, mientras que la mayor producción de proteínas se obtuvo en fermentaciones realizadas bajo los valores intermedios de los factores evaluados. Por otro lado, el porcentaje de remoción de materia orgánica utilizando *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, es relativamente bajo a diferencia de estudios que utilizan cultivos mixtos.

ABSTRACT

This study was undertaken to find optimum conditions of speed agitation, whey milk concentration and calcium carbonate amount for the growth of *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* and to assess the effects over these factors by use of response surface methodology. The evaluated responses were biomass production, proteins production, sugars consumption, lactic acid production and pH. Box Behnken design was used as an experimental design for allocation of treatment combinations. The best conditions for biomass production happen in intermediate values of calcium carbonate and high levels of agitation, while the larger proteins production happen in fermentations with intermediate values of evaluated factors. In the other hand, the percentage of organic material remove using *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, is relative poor if compared with studies using mixers cultures.

INTRODUCCION

El lactosuero es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria, cada 1000 litros de lactosuero generan cerca de 35 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas residuales producidas en un día por 450 personas. (INDA, 2000)

El suero lácteo o lactosuero, es un importante producto de desecho que se obtiene tras el procesamiento de quesos, contiene un alto contenido de materia orgánica y representa un gran contaminante ambiental.

Dadas las altas cantidades de suero que producen y desechan diariamente las industrias lácteas, las alternativas para su uso y aprovechamiento deben ser varias y permanentes, sin embargo, innovar procesos y realizar investigaciones que conlleven a soluciones efectivas requiere de recursos y disponer de tecnologías a las cuales pocas empresas pueden acceder.

Uno de los principales problemas de la cantidad de suero que diariamente se desecha y vierte a suelos y fuentes de agua aledañas a las plantas de procesamiento de leche, son todos los efectos ambientales y la imposibilidad inmediata de tratarlos biológica y fisicoquímicamente. En este sentido, la búsqueda e implementación de programas de manejo de este subproducto así como la recuperación y conversión de este a un producto primario, ayudaría a minimizar el impacto sobre el ambiente por un lado y por otro ayudaría a generar alternativas para el fortalecimiento e iniciativa de las pequeñas industrias dedicadas a esta, una de las cadenas productivas más importantes de la región.

Una de las alternativas que serviría para aprovechar este subproducto y reducir su carga contaminante en el ambiente es la búsqueda y uso de microorganismos capaces de utilizar los nutrientes del lactosuero y transformarlos en sustancias benéficas y de interés agrícola, agroindustrial, industrial, ambiental, entre otros. Entre los usos mejor documentados se tienen microorganismos fermentadores que transforman glucosa en ácido láctico, un metabolito importante a nivel industrial (Vassala, 2005); la obtención de etanol a partir de lactosuero por vía enzimática o por vía fermentativa con microorganismos, la producción de polihidroxicanoatos PHA por bacterias fermentadoras del suero y la producción de bebidas fermentadas con microorganismos probióticos (Miranda, 2007); en relación con esta última, las bacterias ácido lácticas, específicamente del género *Lactobacillus* han sido las más utilizadas.

Lactobacillus casei subsp *rhamnosus*, una de las cepas de *Lactobacillus* que se han estudiado ampliamente *in vivo* e *in vitro*, ha demostrado su capacidad

probiótica por lo cual es útil en la evaluación de sustratos sobre los cuales éste microorganismo pueda aprovechar los nutrientes y generar productos o metabolitos de interés. En varios estudios se ha comprobado su efecto antagónico sobre *Helicobacter pylori* cuya infección está asociada al desarrollo de gastritis, atrofia glandular gástrica, duodenal y adenocarcinoma gástrico, patologías con alta incidencia en la zona Andina del departamento de Nariño (Ruales, B et al. 2007). El efecto protector de *L. casei* subsp *rhamnosus* sobre enterobacterias como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. (Pazos, 2000). La producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos (Sejong OH et al., 1995). La utilización del suero para la producción de biomasa útil en procesos industriales (Ruales y Vallejo, 2007).

El comportamiento o expresión fenotípica, o sea lo que realmente se observa como respuesta del microorganismo al medio ambiente es, además, de las condiciones genéticas como efectores internos, el resultado de la influencia de las variables de naturaleza física y química que constituyen los efectores externos. En este sentido, en el presente trabajo se pretende analizar el comportamiento poblacional de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* en un medio a base de suero de leche producido por una empresa láctea regional, *in batch*, a fin de determinar las condiciones de crecimiento sobre las cuales este microorganismo, potencialmente benéfico para la salud humana y animal, podría utilizar de mejor forma los nutrientes del lactosuero.

Para ello se ha realizado un diseño experimental “Box-Behnken” mediante superficie de respuestas, utilizando el programa Statgraphics 5.1 Plus, con tres factores (concentración de suero de leche, carbonato de calcio y agitación) y cinco variables respuesta (consumo de azúcares, producción de proteínas, producción de ácido láctico, cantidad de biomasa y pH). Se analizó el crecimiento de *L. casei* subsp *rhamnosus*, en el medio a base de suero de leche, mediante recuento en placa y absorbancia; el aporte de cada factor sobre el crecimiento de la bacteria, las condiciones óptimas para el crecimiento de la misma en este sustrato y finalmente se analizó el porcentaje de remoción de materia orgánica por parte de este microorganismo a partir de este sustrato. Esta investigación sirve como base para el diseño a corto plazo, de una alternativa de uso y aprovechamiento de este valioso subproducto, encaminada a minimizar el problema ambiental que representa.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para cualquier empresa productora de lácteos, en la actualidad, resulta inasequible una alternativa inmediata para darle al suero de leche derivado de la elaboración de quesos, un tratamiento que permita la recolección total del mismo, su conservación y posterior comercio tal como lo sería la pulverización, proceso costoso para una mediana o pequeña empresa, dado que los equipos necesarios son altamente especializados, que se requiere de un volumen de producción diaria considerable para garantizar rentabilidad e instalaciones especiales para su funcionamiento.

JELEN, en 1976 realizó un estudio en donde evaluó los costos de evaporación y pulverización del suero en plantas pequeñas que producen alrededor de 3.000 a 25.000 kg de suero por día. Encontró que los costos de pulverización incrementan en proporción con el tamaño de la planta y que los costos financieros del funcionamiento de los equipos representan la mayor parte del total de los costos operativos de las pequeñas empresas.

Es importante el manejo del suero de leche y la minimización de impacto sobre el ambiente de éste subproducto que diariamente se vierte a suelo y fuentes de agua en cantidades considerables por estas empresas, sin embargo, esto no depende exclusivamente de una alternativa de manejo, y menos si ello representa costos elevados, razón además, para establecer programas de manejo costo-efectivos, destinados a recuperar este subproducto y utilizarlo para diferentes propósitos.

Las alternativas viables por lo tanto, son aquellas que no requieran equipos adicionales para aprovechar el suero de leche, sino que se puedan realizar con los ya existentes, que impliquen mínimo gasto de recursos económicos y eficiente generación de productos, que sean de fácil y rápido acceso y que garanticen una remoción de materia orgánica contaminante apreciable y en ello, los microorganismos juegan un papel esencial.

Lactobacillus casei, es una bacteria láctica, ampliamente estudiada y utilizada en la industria en procesos de fermentación a partir de varios sustratos como harinas, leche, carnes, conservas. En un estudio previo (Ruales y Vallejo, 2007), se reportó la utilización de *L. casei* para la fermentación de suero de leche y la optimización de la producción de biomasa a partir de este sustrato. Es así como el interés de evaluar el comportamiento poblacional y la efectividad de la remoción de materia orgánica por parte de este microorganismo servirá de base para el desarrollo de una alternativa viable y de bajo costo para la recuperación y aprovechamiento del suero de leche por parte de la industria láctea en nuestra región.

En este escenario, se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Cuales son las condiciones de crecimiento favorables para *L. casei subsp rhamnosus* en la fermentación y aprovechamiento de un medio a base de suero de leche

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento poblacional de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en un medio a base de suero de leche.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Evaluar el efecto de las condiciones de fermentación sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.
2. Analizar y seleccionar las condiciones donde mejor adaptación presente *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* mediante superficie de respuestas.
3. Establecer el porcentaje de remoción de materia orgánica del suero de leche a partir de la fermentación de este con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, aplicando análisis de DBO y DQO.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 IMPACTO AMBIENTAL ASOCIADO A LA ACTIVIDAD DE LA INDUSTRIA LÁCTEA

La industria láctea evidentemente genera impactos ambientales por sus actividades relacionadas con el uso, aprovechamiento o afectación de los recursos naturales renovables y no renovables.

Los principales impactos ambientales de la industria láctea, desde el punto de vista de afectación de los recursos naturales, están asociados con la generación de aguas residuales (principalmente vertimientos orgánicos provenientes de los restos de productos lácteos y vertimientos inorgánicos generados por los procesos de aseo y desinfección), de subproductos orgánicos (sueros de quesería), de residuos ordinarios (empaques, embalajes), residuos peligrosos (químicos, reactivos) y en un menor grado emisiones atmosféricas (combustión en calderas). (Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial y ANDI, 2007).

4.1.1 Contaminación ambiental por lactosuero

La producción de queso da lugar, aproximadamente a 9 kg de suero por 1 kg de queso partiendo de 10 litros de leche. (Pivarnik et al. 1995)

La producción mundial de suero lácteo se estimaba en 90 millones de Ton/año en 1984 (ZALL, 1984). La eliminación del suero lácteo por parte de las queserías supone un problema medioambiental de dimensiones universales. Se ha estimado que solo se recicla el 50% del suero que se produce (Pivarnik et al. 1995).

En una industria en donde se procesan diariamente 3000 L de leche, para elaboración de queso fresco, se obtienen aproximadamente 2000 L de lactosuero, de los cuales se aprovechan para otros procesos productivos 500 L diarios, el resto no tiene mercado y no se puede destinar a alimentación animal, pues no hay personas que recojan esta cantidad todos los días.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales no están diseñadas para degradar el lactosuero, ya que posee una carga considerable de materia orgánica que provocaría el colapso de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales o un costo tan elevado de manejo, que resultaría inoperable.

El suero tiene un alto poder contaminante debido a su contenido en lactosa, que hace que tenga una DBO de 35-50000 mg/L (Zall, R.R. 1984).

El lactosuero es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria; cada 1000 litros de lactosuero generan cerca de 35 kg de

demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas. (INDA, 2000).

Hasta hace algunos años, las empresas dedicadas a la elaboración de quesos vertían los lactosueros en el alcantarillado, lo que ocasionaba un impacto ambiental importante en las fuentes de agua. Actualmente la Corporación Regional CORPONARIÑO, exige que las plantas procesadoras tengan una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales y que además los lactosueros no pueden verterse al alcantarillado.

4.2 PROBLEMAS PARA LA UTILIZACIÓN DEL LACTOSUERO

Muchos son los problemas que se han encontrado en la disposición o reutilización del suero. Es costoso transportarlo dado su alto contenido de agua. Es fácilmente contaminable por bacterias y hongos y no puede ser almacenado por tiempo prolongado. Pulverizarlo requiere un gran capital de inversión, gasto de energía y no es económicamente rentable. Desechar el suero al medio es costoso dada su alta demanda biológica de oxígeno. Además, el suero contiene grandes cantidades de nutrientes potencialmente reciclables. Está estimado que el suero a desechar contiene aproximadamente 3.6×10^8 Kg de lactosa y 6.9×10^7 Kg de proteína. Así, existe una obvia necesidad de encontrar una solución al problema de la disposición del suero y al reciclaje de nutrientes presentes en el mismo (Reddy, 1976).

Es por esto que la industria ha buscado alternativas a corto plazo que permitan aprovechar este subproducto, en procesos que puedan realizarse diariamente, pues el lactosuero fluido no tiene una vida útil larga que permita su almacenamiento durante periodos prolongados.

4.3 PROPIEDADES DEL LACTOSUERO

4.3.1 Tipos de Lactosuero

El lactosuero ha dejado de ser un desecho derivado de la elaboración del queso, para ser un subproducto, dado sus propiedades nutritivas y funcionales que se han demostrado en varias investigaciones.

No todos los lactosueros son iguales. Una de las diferencias principales entre ellos es su composición, que depende no solamente de la composición de la leche para quesería y del contenido de humedad del queso sino, de manera muy significativa, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada. En la tabla 1, se presentan los rangos de pH en que se encuentran los tres tipos de lactosuero que se generan en el proceso de elaboración de queso; de éstos, el lactosuero dulce representa el sustrato para fermentación con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

Tabla 1 Tipos de lactosuero.

Tipo de Lactosuero	Procedencia	pH
Lactosuero Dulce	Se obtiene como subproducto de la elaboración de quesos duros, semiduros y ciertos quesos blandos en los cuales es utilizado el cuajo como insumo principal.	5.6 - 6.3
Lactosuero Ácido	Obtenido al elaborarse la caseína del ácido láctico.	4.4 - 5.1
Lactosuero Salado	Se genera al añadir sal a la leche o al mismo lactosuero durante el proceso de elaboración de queso.	-

Fuente: Pre-Factibilidad de la elaboración de un producto a base de lactosuero. CPMLN, 2006.

4.3.2 Composición Fisicoquímica del Lactosuero

La composición del suero es de 93% de agua y 7% de materia sólida. De esta materia sólida, el 70% es lactosa, el 14% proteínas, el 4% grasa, el 7% minerales, y entre el 1 y el 5% es ácido láctico. El componente mayoritario es la lactosa, con un 4,5% aproximado para los sueros líquidos y un 70% para los sueros desecados. Los sueros dulces tienen mayor concentración de lactosa (4,85%) que los ácidos (4,3%), debido a la fermentación producida en estos. Además, los sueros tienen vitaminas de todos los tipos menos la D, y minerales como calcio, fósforo y zinc, más abundantes en sueros ácidos. El suero lácteo constituye el 85% de la leche, por lo que de cada kilo de queso obtenido, se producen de 8,5 a 9 Kg de suero (Zall, R.R., 1984).

En la composición del lactosuero intervienen los siguientes factores:

- La tecnología de elaboración del queso.
- La composición de la leche.
- El tratamiento del calor del lactosuero.
- El almacenamiento del lactosuero.
- El tipo de queso a procesar.

El lactosuero representa del 80% al 90% del volumen total de la leche que entra en el proceso y contiene alrededor del 50% de los nutrientes de la leche original: proteínas solubles, lactosa, vitaminas y sales minerales en las proporciones que muestra la tabla 2.

Tabla 2. Composición de lactosuero dulce fluido

Tipo de Nutrientes	Lactosuero de Queso Dulce	Lactosuero de Queso Ácido
Agua (%)	93-94	94-95
Grasas (%)	0.2-0.7	0.04
Proteína (%)	0.8-1	0.8-1
Lactosas (%)	4.5-5	4.5-5
Minerales	0.05	0.4

Fuente: Pre - Factibilidad de la elaboración de un producto a base de lactosuero. CPMLN, 2006

El lactosuero también es rico en vitaminas de complejo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y vitamina C. Las proteínas que quedan en el lactosuero son la lactoalbúmina y la lactoglobulina. En otros países, donde el lactosuero se procesa para bebidas en polvo, estas proteínas son separadas para conseguir un mayor aprovechamiento económico por las características específicas de cada una de ellas dirigiéndose a necesidades médicas específicas (CPMLN, 2006).

4.4 PROBIÓTICOS

Las bacterias probióticas han sido definidas como "Microorganismos vivos, los cuales cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del individuo (Fuller, 1989).

Los probióticos han sido usados para modificar el sistema inmunológico, bajar los niveles de colesterol, tratar la artritis reumatoide, prevenir la aparición de cáncer, mejorar la intolerancia a la lactosa, prevenir o reducir los efectos de la dermatitis atópica, enfermedad de Crohn, diarrea y constipación así como también la candidiasis e infecciones del tracto urinario (Reid, 1999).

Productos lácteos como la leche, yogurt, queso y helado podrían ser vehículos potenciales para entregar estos microorganismos benéficos a los consumidores. Un producto puede ser considerado probiótico si este contiene al menos 10^6 UFC/g de producto (Shah, 2000). Esto es importante porque si la bacteria probiótica no está presente en suficiente número a través del periodo de almacenamiento del producto, entonces este no puede ser denominado como probiótico (Hekmat, 2007).

Es esencial que los probióticos permanezcan vivos durante su tránsito por el tracto gastrointestinal. Lactobacilos y bifidobacterias potencian la inmunidad, favorecen el equilibrio de la microbiota colónica, incrementan la biodisponibilidad de ciertos nutrientes, mejoran el tránsito y la motilidad intestinal, estimulan la proliferación celular y permiten elaborar ciertos productos fermentados benéficos. Se ha probado de forma concluyente en diversos estudios que disminuyen la intolerancia a la lactosa y la incidencia y duración de las diarreas por rotavirus en lactantes. *L. casei* es el único que ha demostrado con evidencia científica prevenir y acortar las diarreas por rotavirus del lactante, así como incrementar las concentraciones de IgA en tracto intestinal. *L. acidophilus* y *B. bifidum* estimulan de forma inespecífica la actividad fagocítica de granulocitos y la producción de citoquinas. Se postula un efecto hipolipemiente y reductor de la mutagenicidad al disminuir la cantidad de ciertas enzimas fecales (b-glucosidasa, b- glucuronidasa, ureasa, nitrorreductasa) así como una acción benéfica frente a enfermedades alérgicas o de etiología autoinmune e incluso frente al cáncer. Sin embargo, no todas las cepas de bacterias ejercen efectos probióticos y existe gran variabilidad en cuanto a sus acciones, tanto entre las distintas especies como dentro de la misma (Amores, 2004).

4.5. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

4.5.1 Características morfológicas y fisiológicas de las bacterias lácticas

Son un grupo de bacterias en forma de cocos o bacilos Gram positivos inmóviles y no esporulados, no tienen citocromos, catalasa y porfirinas; no realizan fosforilación por transporte de electrones y por lo tanto, obtienen la energía solo por fosforilación a nivel del sustrato. Todas las bacterias de ácido láctico crecen anaeróbicamente. No obstante, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno, y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo; son, por tanto, anaerobios aerotolerantes. Además son tolerantes a la acidez y algunos son termófilos, sin embargo pueden desarrollar crecimiento entre 30-35° C. (Madigan *et al*, 2004).

Algunas cepas pueden usar oxígeno con la mediación de sistemas de flavoproteína oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno, aunque la mayoría de las cepas no poseen catalasa y eliminan el peróxido de hidrógeno mediante enzimas alternativas, conocidas como peroxidasas. En la reacción de flavoproteína oxidasa no se forma ATP pero el sistema oxidasa puede utilizarse para reoxidación del NADH generado durante la fermentación (Madigan *et al*, 2004).

Las bacterias ácido lácticas obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares, carecen de ciclo de Krebs funcional, el rendimiento de su cultivo es muy bajo, en algunos casos pueden usar azúcares para formar polímeros extracelulares de dextrano, requieren una gran cantidad de factores nutritivos

(aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas); tienen unas posibilidades anabólicas muy limitadas, lo que reduce el rendimiento de su crecimiento, toleran bien las concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias por lo que pueden desplazarlas de los hábitats que colonizan (Ruales *et al*, 2007).

De acuerdo al tipo de productos de fermentación que generan a partir de los azúcares se dividen en 2 grupos: Homofermentativos y Heterofermentativos. Los primeros producen solamente ácido láctico, mientras que el segundo produce otros compuestos como el etanol y CO₂ (Madigan, 2004).

Las BAL o bacterias ácido lácticas, constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final de la fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, flora normal de la superficie de material vegetal (frutas y verduras), alimentos ricos en azúcares, leche y derivados, así como en nuestro tracto nasofaríngeo y gastrointestinal. Aunque se las conoce sobre todo por su labor de fermentación de productos lácteos, se emplean así mismo para encurtir vegetales en el horneado, en la panificación del vino, y para curar pescado, carne y embutidos (Guerrero M, *et al* 2002, Montes *et al*, 2003).

Los lactobacilos son considerados tecnológicamente por su rol en la manufactura preservación de muchos productos fermentados, pero además juegan un importante papel en el control de microorganismos indeseables en el tracto gastrointestinal y urogenital. Muchas cepas de lactobacilos presentes en alimentos fermentados han mostrado efectos benéficos en la salud intestinal. Las propiedades de superficie de las bacterias ácido lácticas son de mayor importancia en la tecnología de fermentación, pero también son de importancia para la adhesión de las bacterias al epitelio gastrointestinal (Schär, 2005).

Las BAL, son también comercialmente importantes, ya que los productos derivados de su crecimiento son usados ampliamente en industrias de alimentos y farmacéuticas (Berry, 1999).

4.5.2 Metabolismo de las BAL

Orla Jensen (1920) clasificó a las bacterias lácticas, atendiendo a sus características bioquímicas en dos grupos: Homofermentativas y Heterofermentativas (Montes *et al*, 2003).

4.5.2.1 Homofermentación. Tiene prácticamente un solo producto de fermentación, el ácido láctico. La realiza todos los miembros del género *Streptococcus*, *Pediococcus* y muchas especies de *Lactobacillus*. Es la principal ruta del catabolismo de la glucosa, conocido como glucólisis, o vía de Embden-Meyerhof-Parnas donde una mol de glucosa, o cualquier sustrato glicosídico es degradado a dos moles de ácido láctico, sin oxígeno molecular (Madigan *et al*, 2004).

Consta de dos fases: En la primera la glucosa es fosforilada por ATP y actividad para formar gliceraldehido fosfato en la segunda, el gliceraldehido fosfato es convertido en ácido láctico en una serie de reacciones de oxido-reducción que están acopladas por medio de moléculas de NADH y NAD a la fosforilación del ATP, para permitir el desarrollo de los ciclos de fermentación subsiguientes. En esta vía se produce doble masa celular y muy poco CO₂ o nada (Willett, 1989).

El piruvato es reducido a ácido láctico por la enzima deshidrogenasa láctica. En esta vía se forma en total cuatro moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada, pero como se consumen dos moléculas la producción neta son dos moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada, como lo muestra en la reacción (Willett, 1989).



4.5.2.2 Heterofermentación. Da otros productos, principalmente etanol y CO₂, así como Lactato; La realizan algunos tipos de bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus*. Este tipo de fermentación se lleva a cabo por la vía de las pentosas-fosfato o vía de Dickens; se caracteriza por que la glucosa vía pentosa-fosfato es fermentada a ácido láctico en un 50% y el resto a CO₂, alcohol, ácido acético o ácido fórmico, paralelamente con una molécula de ATP y de NADH₂ – NAD para permitir que el proceso de fermentación continúe, como lo indica la reacción (Willett, 1989).



4.5.3 *Lactobacillus*

Algunas cepas exhiben cuerpos bipolares o granulaciones internas, comprenden especies que son homofermentativas en su mayor parte aunque algunas especies son heterofermentativas, microaerófilicos, crecen en medios sólidos como MRS-De Man –Rogosa et Sharper (1960) a baja presión de oxígeno y con un 5-10% de CO₂ en un rango de temperatura entre 2-53 °C, óptima entre 30-40°C (Montes *et al*, 2003).

El género ha sido dividido en tres principales subgrupos, y se reconocen más de 70 especies. Los lactobacilos se encuentran normalmente en productos lácteos y algunas cepas se usan en la preparación de derivados fermentados en la leche. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* se usa en la preparación del yogurt (Madigan, *et al* 2004).

Normalmente, los lactobacilos resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias del ácido láctico; pueden crecer bien a valores de pH alrededor

de 4 ó 5 lo que le permite su aislamiento selectivo a partir de muestras naturales empleando medios de cultivo de pH ácido que contengan carbohidratos. Su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas, cuando el valor del pH ha descendido demasiado para que otras bacterias del ácido láctico puedan crecer. Por consiguiente, los lactobacilos llevan a cabo las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácido-lácticas. Estos microorganismos casi nunca son patógenos (Madigan, *et al* 2004).

El género *Lactobacillus* conforma un apreciado porcentaje del total de la microbiota intestinal, muchas especies de ellos están distribuidas a lo largo del intestino tenue y craso (Fuller, R. 1989).

A continuación se mencionan 7 de las especies que se han aislado del tracto intestinal humano (Willians, E.S. 1979):

1. *L. acidophilus* *
2. *L. casei* *
3. *L. fermentum*
4. *L. cellobiosus*
5. *L. plantarum*
6. *L. salivarius*
7. *L. bifidus* *

*Utilizados como coadyuvantes dietéticos.

4.5.3.1 *Lactobacillus casei*. El grupo de *Lactobacillus casei* consiste en diversas especies de bacterias mesofílicas ácido lácticas, anaerobias facultativas y homo o heterofermentativas. Su metabolismo proporciona cualidades organolépticas a diversas leches fermentadas, quesos, y más recientemente, a las nuevas leches fermentadas. Su habilidad para sobrevivir en cantidades adecuadas al tránsito a lo largo del tracto intestinal, además de tener un efecto fisiológico asociado con sus beneficios potenciales sobre la salud, hacen que *Lactobacillus casei* sea un candidato ideal para considerarlo como probiótico (Gaon, D. *et al* 1995, Ruales y Vallejo, 2007).

Lactobacillus casei, además de ser la especie modelo del género *Lactobacillus*, tiene gran importancia como bacteria intestinal (algunas cepas se utilizan como probióticos) y como cultivo iniciador de productos lácteos. En estos momentos, existen herramientas genéticas y conocimientos suficientes sobre regulación génica para tratar de descifrar los procesos genéticos y ambientales que controlan la expresión de los genes de la ruta glucolítica, así como de las rutas alternativas del piruvato, siendo estas últimas responsables de la formación de compuestos volátiles importantísimos en alimentos (Pérez M., G 2001, Montes *et al*, 2003).

Diversos estudios clínicos y controlados con placebos han demostrado que el consumo oral de *Lactobacillus casei* reduce la duración de la diarrea y, en particular las gastroenteritis por rotavirus en niños (Saxelin, M. *et al* 1992).

Además de lo anterior, el *Lactobacillus casei* puede ayudar a reducir la duración de la diarrea en los niños en guarderías (Pedone, C.A. *et al* 1999), en la antibioterapia y en la diarrea del viajero (Salminén, S. *et al* 1993, Montes *et al*, 2003)

Se han llevado a cabo estudios en ratones para observar la prevención y el tratamiento de cáncer (Kato, Y. *et al* 1994), donde observaron una importante disminución en el desarrollo de tumores secundarios previamente alimentados con *Lactobacillus casei* (Perdigón, G. *et al* 1993), reconocieron que el consumo de *Lactobacillus casei* inhibía el crecimiento de un fibrosarcoma implantado subcutáneamente; estos autores enfatizaron la importancia de la concentración y frecuencia de la ingestión de *L. casei* en el desarrollo de estos efectos. La toma de leche fermentada con cultivos de yogurt y *L. casei* (DN-114 001) modificó en forma benéfica la composición de la microbiota intestinal en niños pequeños y el mismo tipo de probiótico restauró a normales los niveles del indicador inflamatorio, TNF- α , liberado por células inflamadas de la mucosa en pacientes con la enfermedad de Crohn (Guerin-Danan, C. 1998, Montes *et al*, 2003).

Las leches fermentadas con diversas clases de *L. casei* producen un efecto sobre la tasa de supervivencia de las ratas infectadas con *Salmonella typhimurium* luego de siete días de recibir una dieta complementada con diferentes leches fermentadas comparada con leche común, se mostró que la leche fermentada aumenta la supervivencia de las ratas a las cuales se les había aplicado un shock séptico inducido por *Salmonella typhimurium* (Paubert-Braquet, M. *et al* 1995, Montes *et al*, 2003)

Los resultados de un reciente y prometedor experimento sugirieron que las leches fermentadas con *Lactobacillus casei* pueden mejorar la respuesta adquirida contra un antígeno viral. Este estudio al azar y doble ciego fue para determinar si el consumo de dicha leche estimulaba específicamente la respuesta de las células inmunológicas T a tres grupos significativos de antígenos (cándida, e influenza). Se encontró que los sujetos que tomaban la leche fermentada tuvieron una pequeña pero más alta respuesta de las células T a los antígenos de la influenza que la de aquellos del grupo placebo. Estos datos garantizan un explicación más amplia acerca de la hipótesis de que las leches fermentadas con *Lactobacillus casei* pueden modular la respuesta inmune específica (Montes *et al*, 2003).

Sato *et al*, 1988, divulgaron el aumento en la resistencia del huésped contra las infecciones de *Listeria* gracias al *Lactobacillus casei*. Resultados similares fueron obtenidos por Nader de Mamas *et al* 1992, quienes recomendaron la ingestión de leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* como profiláctico contra infecciones intestinales causadas por *Shigella*. Las ventajas de estas bacterias también fueron reveladas por Perdigón. *et al*, en 1993, quienes además descubrieron su importante papel protector en la prevención de enfermedades entéricas, produciendo un aumento en la secreción de anticuerpos

IgA. En 1993, Vescovo también estudió las mismas bacterias y observó que se segregaban compuestos antimicrobianos activos contra *Clostridium tyrobutyricum*. En el mismo año Chateau. *et al.* estudiaron y observaron que las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella tiphimurium* y *Salmonella enteritidis* se inhibían por acción de los *Lactobacillus*.

4.5.4.1.1 *Lactobacillus casei ssp rhamnosus*. Fue descrito por Hansen, 1968. La especie *casei* toma su nombre por la fuente donde fue aislado, el queso; la subespecie *rhamnosus* por la particularidad de asimilar la rhamnosa. Se destaca por ser el único lactobacilo homofermentativo de la especie que desarrolla buen crecimiento de 15 °C a 45 °C. Puede ser aislado de la leche, el queso, productos lácteos, harinas fermentadas, estiércol de vaca, tracto intestinal humano, boca y vagina (Kandler, U. *et al* 1990, Ruales y Vallejo, 2007).

Lactobacillus casei subsp rhamnosus, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*. *Pediococcus pentosaceus* y *Bifidobacterium bifidus* fueron ensayados por su producción de ácido láctico, pH, e inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* (NCTC 11637), donde seis cepas de *L. acidophilus* y *L. casei subsp rhamnosus* inhiben el crecimiento de *H. pylori* mientras que *Bifidobacterium bifidus*, *Pediococcus pentosaceus* y *L. bulgaricus* no inhiben su crecimiento (Montes *et al*, 2003).

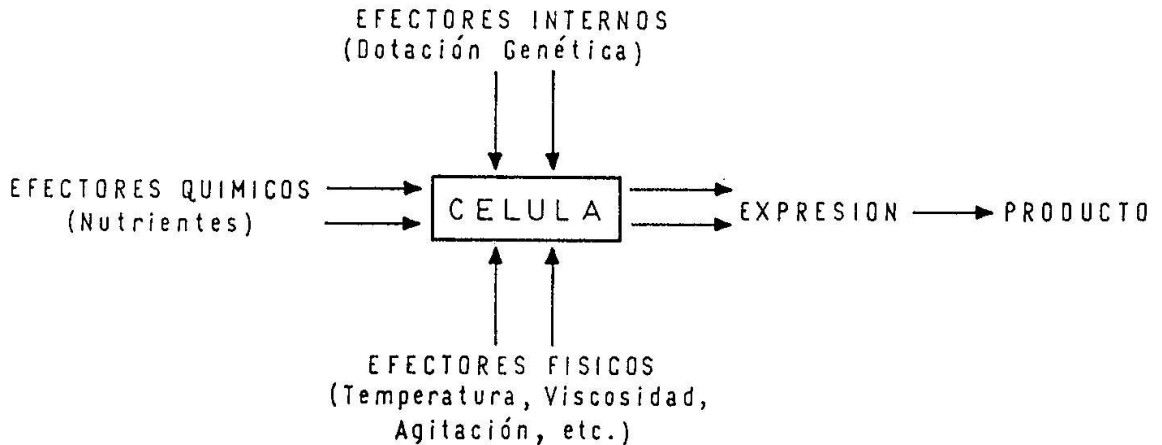
Mäkinen *et al* 1995, Patentan la especie *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, ya que encontraron que tiene un efecto controlador sobre mohos y levaduras, solo o en combinación con bacterias de los géneros *Propionibacterium* u otra cepa de *Lactobacillus casei* y/o con otro agente convencional usado para controlar mohos y levaduras en alimentos.

4.6 PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN

Influencia de factores internos y externos sobre el crecimiento de la célula microbiana.

El comportamiento de una población de células en condiciones de crecimiento in batch, sigue el siguiente esquema, donde se especifica la influencia de los factores internos (propios de la célula) y externos (del ambiente) condiciones nutricionales y del proceso.

Figura 1. Influencia de los efectores internos y externos sobre la expresión celular



Cualquier fermentación microbiana debe monitorizarse para garantizar que el proceso transcurra de forma correcta. En la mayoría de los casos, no solo es necesario medir el crecimiento del cultivo y la formación del producto, sino también controlar el proceso modificando los parámetros ambientales a medida que tiene lugar dicho proceso. Los factores ambientales que se controlan con mayor frecuencia son la temperatura, concentración de oxígeno, pH, masa celular y la concentración del producto (Madigan *et al*, 2004)

4.6.1 Fermentación Acido Láctica

Los procesos de fermentación realzan la seguridad de los alimentos al reducir los compuestos tóxicos como las aflatoxinas y cianógenos, y por la producción de factores antimicrobianos como ácido láctico, bacteriocinas, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y etanol lo cual facilita la inhibición o eliminación de patógenos de los alimentos. También han sido reportadas propiedades terapéuticas de los alimentos fermentados. En adición a los efectos nutricionales, de seguridad y preservativos, la fermentación enriquece la dieta a través de diversidad de sabores, texturas y aromas. Esto mejora la vida útil de los alimentos mientras reduce el consumo de energía requerida para su preparación. La producción de alimentos fermentados es además importante al darle valor agregado a los productos agrícolas crudos, entonces provee ingresos y genera empleo (Giraffa, 2004).

Las condiciones de fermentación como temperatura, pH, los tipos de medio de crecimiento, oxígeno y tipo de neutralizante, tienen un gran efecto sobre el crecimiento de la actividad de los lactobacilos (Sejong OH, 2005).

La búsqueda de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas densidades de microorganismos ($>10^7$ UFC/g), ha sido la meta de muchas

empresas, que están interesadas en las bacterias ácido lácticas, no sólo como microorganismos iniciadores, sino también como un ingrediente o aditivo probiótico para aumentar el valor nutritivo de sus productos. De esta forma, la biomasa de estos microorganismos ha adquirido un mayor valor y una mayor demanda. (Vargas, 2006)

4.6.1.1 pH. Mc Donald *et al* 1990, sugirieron que la capacidad de los lactobacilos para tolerar bajos valores de pH más que otras bacterias acidolácticas, como *Streptococcus* y *Leuconostoc* se origina desde los valores de pH más bajos de sus citoplasmas, permitiendo altas concentraciones de ácidos no disociados a ser tolerados. Pero esto podría además ser relacionado con la alta actividad de ATPasa responsable de la extrusión de H⁺ o relacionado con la excreción más eficiente de ácido láctico por los lactobacilos. La disminución de los valores de pH reduce la actividad de las ATPasas, como se ha mostrado en ATPasas aisladas de diferentes bacterias ácido lácticas que presentan diferente pH óptimo, que va desde 5.5 a 7.5 dependiendo de su origen (Gonçalves, 1997).

En procesos de fermentación espontánea, las bacterias ácido lácticas evolucionan en condiciones de pH no controlado, pero para otro tipo de aplicaciones (ej. Producción de ácido láctico o biomasa), es necesario lograr el control del pH. (Guyot, 2000).

Cambios en el pH pueden afectar no solo la síntesis de exopolisacáridos, sino además la finalización de distribución de productos y actividad de ciertas enzimas clave (piruvato quinasa, lactasa deshidrogenasa) que están envueltas en el cambio entre la fermentación homoláctica y heteroláctica (Torino, 2001).

4.6.1.2 Acido Láctico. El ácido láctico ha sido tradicionalmente usado en la industria de los alimentos como un agente acidulante y/o preservante y en la industria química para aplicaciones cosméticas y textiles. La vía más efectiva de sintetizar el L-acido no es través de procesos químicos, sino por medio de técnicas de fermentación con cepas definidas. Muchas cepas bacterianas son capaces de producir altas cantidades de L-ácido (ej. *L. helveticus*, *L. casei*, *L. salivarius* y *L. delbrueckii*). Sin embargo, los dos mayores factores limitantes de esta biosíntesis y que además afectan el crecimiento y productividad son: las condiciones limitantes de nutrientes y el efecto inhibitorio causado por el ácido láctico producido en el caldo de cultivo (Olmos, 1997).

Las bacterias acidolácticas juegan un importante rol en los procesos de fermentación de lácteos y cárnicos y tienen una gran influencia en la calidad y preservación de la vida útil de estos productos. El principal rol de estas bacterias es la producción de ácido láctico, causando la reducción en los valores de pH y la proteólisis del sustrato, obteniendo péptidos y aminoácidos libres, lo cual subsecuentemente afecta el sabor y textura del producto final (UL-HAQ, 2006).

El ácido láctico es un metabolito básico para la industria química y de alimentos, principalmente producido por varias bacterias ácido lácticas fermentativas. Junto con el alto precio del ácido láctico, bajo costo de materiales como el suero de leche y suero permeado han ganado mayor interés como medio de producción. Este producto derivado de procesos de elaboración de queso y lactosa aún contiene proteínas (ej. Suero 6 g/L^{-1} , suero permeado $<1,5 \text{ g/L}^{-1}$) y lactosa ($46 - 50 \text{ g/L}^{-1}$) y por lo tanto puede ser una base valiosa para procesos biotecnológicos ácido lácticos. Sin embargo, aunque la cantidad de nitrógeno orgánico (proteínas) en cultivos basados en suero puede estar en nivel suficiente, el crecimiento y producción de ácido por las bacterias ácido lácticas es usualmente pobre, junto con su ineficiente sistema proteolítico y la baja cantidad de aminoácidos libres y péptidos presentes en productos derivados de la leche. Es más, muchas cepas ácido lácticas de importancia industrial son defectuosas en cuanto a la síntesis de uno o más aminoácidos, los cuales incrementan el requerimiento para un balanceado medio de cultivo (Vasala, 2005).

4.6.1.3 Fuente de Nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D, como D-alanina y D-aspártico para su incorporación a la pared de las células. Muchos procesos a gran escala utilizan amonio, sales, urea o amonio gaseoso como fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno comúnmente utilizadas son soya, leche, suero, harina de yuca entre otras (Ertola R., Yantorno O. y Mignone C. 2005).

Hujanen, 2006, en su trabajo concluye que la producción de ácido láctico está marcada e influenciada por el tipo y la concentración inicial de la fuente de nitrógeno. Los requerimientos nutricionales de *Lactobacillus* han sido ampliamente discutidos y se ha hecho énfasis en la importancia de los aminoácidos y las vitaminas para el crecimiento celular, además de la presencia del extracto de levadura en el medio de precultivo, quien aporta principalmente bases purinas y pirimidinas además de vitaminas del grupo B. El suero por si solo es una pobre fuente de nitrógeno para los *Lactobacilos* y diferentes suplementos como el extracto de levadura y licor de maíz han sido propuestos.

4.6.1.4 Agitación. Una adecuada agitación de un cultivo microbiano es esencial para la fermentación ya que se producen los siguientes efectos: dispersión del aire en la solución de nutrientes, homogenización para igualar la temperatura pH y concentración de nutrientes en el fermentados, suspensión de los microorganismos y de los nutrientes sólidos, dispersión de los líquidos inmiscibles. Bajo estas premisas se podría concluir que cuanto la agitación es mayor, mejor es el crecimiento, sin embargo la agitación excesiva puede romper las células grandes e incrementar la temperatura lo que ocasiona un descenso en la

viabilidad celular, se debe conseguir un balance entre la necesidad del mezclado y la necesidad de evitar el daño celular. (Ertola R., Yantorno O. y Mignone C. 2005).

4.6.1.5 Fuente de Carbono. Puede ser obtenido a partir del CO₂ atmosférico o más habitualmente suele ser proporcionada como una fuente orgánica como proteínas, glúcidos, etc.

Las fuentes de carbono pueden ser: 1) Hidratos de carbono como glucosa o dextrosa, sacarosa, lactosa, almidón, dextrina; 2) Alcoholes como el glicerol y manitol; y 3) Hidrocarburos como hexadecano, octadecano y otros. Son muy importantes también por su disponibilidad y costo reducido otras materias primas que contienen hidratos de carbono como granos, melazas, celulosas, suero de queso, etc. (Ertola R., Yantorno O. y Mignone C. 2005).

Se ha demostrado que *Lactobacillus casei* es capaz de producir exopolisacáridos, importantes sustancias que influyen directamente en la textura de los productos fermentados, en un medio definido suplementado con azúcar fermentable. (Cerning, 1994).

5. DISEÑO EXPERIMENTAL Y DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo consta de un diseño experimental con tres factores y cinco variables respuestas, cuyo número de réplicas representativas para el experimento de calcularon a través del diseño “Box-Behnken” utilizando el programa StathGrafics Plus 5,1. Con un total de 15 ensayos, con tres puntos centrales correspondientes al medio control, a base de una concentración de suero optimizada en un trabajo previo (Ruales y Vallejo, 2007). Y los restantes 12 serán las combinaciones entre los factores y variables respuesta necesarios para un análisis representativo. Los tres factores evaluados fueron: Concentración de suero, concentración de carbonato de calcio y velocidad de agitación, los valores evaluados se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Factores a evaluar durante la fermentación de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* en suero de leche.

Factor	Unidad	Nivel		
		-1	0	1
Suero de leche	g/L	180	210	240
Carbonato de Calcio	g/L	7	14	21
Agitación	rpm	120	200	300

Y las variables respuesta evaluadas son: consumo de azúcares, producción de ácido láctico, producción de proteínas, formación de biomasa y pH en el medio a base de suero de leche.

La unidad experimental está constituida por el matraz con 400 ml de medio con la combinación de factor y nivel correspondiente. Tabla 4.

Tabla 4. Composición de los medios empleados para la fermentación de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* en suero de leche.

Componentes		Medios			
		Control	1	2	3
Aforar con Agua destilada a 1000 ml. [®]					
Citrate de Amonio 2 g. [®]					
Fosfato de Potasio 2 g. [®]					
Fuente de Carbono	Sacarosa 15 g. ^{*®}		X	X	X
Fuente de Nitrógeno	Suero de Leche ^{**}	X	X	X	X
Carbonato de calcio 20g		X	X	X	X

5.2 DISEÑO METODOLÓGICO

El desarrollo del presente trabajo se realizó en tres etapas:

Etapa I: Preparación de preinóculos e inóculos.

Etapa II: Cinética de crecimiento de *L. casei* subsp *rhamnosus* en medio a base de suero de leche y evaluación de parámetros de fermentación.

Etapa III: Análisis físico-químico de la fermentación de *L. casei* subsp *rhamnosus* en las condiciones óptimas de crecimiento poblacional del mismo.

5.2.1 Preparación de preinóculos e inóculos

5.2.1.1 Activación de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus*. De un preservado criogénico proveniente de una temperatura de almacenamiento de -196°C en nitrógeno líquido; se tomó la totalidad de su contenido, o sea 1 ml y se inoculó directamente en un erlenmeyer que contenía 40 ml de caldo MRS (Merck) Man, Rogosa et Sharpe (1960), en cámara de flujo laminar tipo II. Se llevó a incubación por espacio de 20 a 24 horas a $35^{\circ} - 37^{\circ}\text{C}$.

- Al día siguiente se evaluó la turbidez del caldo MRS (Merck), este al presentar turbidez se inoculó 4 ml del cultivo preactivado en otro erlenmeyer con la misma cantidad de medio de cultivo, se incubó a las mismas condiciones iniciales. De esta manera se garantizó que la cepa estuviera completamente activada.

- Seguidamente se repicó en cajas de agar MRS comercial (Merck) y en agar MRS modificado con azul de anilina. Con asa de argolla por el método de estrías y se incubó por 48 horas de 35° a 37°C .

- Se realizó la verificación de pureza y se procedió a elaborar los cultivos de trabajo y las cepas madre.

5.2.1.2 Conservación de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus*. La cepa se conservó en agar MRS para elaborar un stock reciente, para ello se tomaron colonias aisladas del medio MRS azul de anilina y se sembraron en profundidad y en superficie en tubos inclinados que contenían MRS glucosa 5g/L más agar al 1,5%, estos preservados se usaron como cepas de trabajo y se incubaron durante 20 – 24 horas a $35 - 37^{\circ}\text{C}$ y se almacenaron a 4°C .

5.2.1.3 Preparación del Preinóculo. Se preparó la cepa de interés proveniente de un stock reciente en caldo MRS comercial (Merck). Para tal efecto se inocularon algunas colonias del preservado en un erlenmeyer que contenía 40 ml de caldo MRS comercial (Merck) estéril. Se incubó por 24 horas a $35^{\circ} - 37^{\circ}\text{C}$. De esta manera se preactivó y finalmente se activó realizando una inoculación de 10 ml de

este caldo a 100 ml de caldo MRS comercial (Merck) y se incubó en las condiciones antes mencionadas.

5.2.1.4 Preparación del Inóculo. Según Crueger y Crueger (1993), el porcentaje de inóculo se debe ajustar al 10% v/v. Por lo tanto, para los 15 ensayos de 400ml de volumen de fermentación se prepararon 650 ml de caldo MRS y se inocularon con 65 ml de preinóculo. Se incubó a 37°C durante 18-24 horas.

5.2.1.5 Ajuste de inóculo. Al cabo del 16 horas de incubación del inóculo y cada hora hasta las 24 horas, se tomaron alícuotas de 1 ml, se diluyeron en 9 ml de agua destilada estéril y se homogenizó. De esta dilución se tomaron 0,1 ml y se dispusieron en la cámara de conteo de células NeuBauer, ajustando así la población a una concentración de $4,65 \times 10^7$ Bact/mL (Ruales y Vallejo, 2007)

5.2.2 Cinética de crecimiento y determinación de los parámetros de fermentación

5.2.2.1 Cinética de crecimiento. Para evaluar la cinética de crecimiento se fermentó un volumen de 400ml del medio a base de suero de leche y sacarosa en matraz de 500ml, a escala de laboratorio, con temperatura de 35°C y agitación permanente. Para evaluar cada parámetro de fermentación se tomaron muestras por duplicado en tiempo cero y subsecuentemente en lapsos de 2 horas, hasta las 24 horas.

5.2.2.2 Determinación de Biomasa. Para cada ensayo y su duplicado se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros de medición de biomasa y el volumen tomado para cada parámetro:

- Densidad Óptica (D.O): La absorbancia de la suspensión celular se determinó en espectrofotómetro (portable Datalogging Spectrophotometer HACH DR/20-10), a una longitud de onda de 460nm. Para lo cual se tomaron 5ml.

- Unidades formadoras de Colonias. Se realizó empleando el Método de Recuento en Placa. Para tal efecto se tomó 1ml del fermentado. Ver anexo A.

5.2.2.3 Determinación de Consumo de Azúcares Totales. Se realizó empleando el Método de Antrona o Dubois. Se tomó 1ml del fermentado. Ver anexo B.

5.2.2.4 Determinación de Proteínas totales. Se realizó aplicando el Método de Lowry Modificado. Se tomó 1ml del fermentado. Ver anexo C.

5.2.2.5 Determinación de producción de ácido láctico. Se realizó aplicando el método de titulación con Hidróxido de Sodio 0,1N. Se tomaron 9ml del fermentado. Ver anexo D.

5.2.2.6. Determinación de pH. El CaCO_3 es un amortiguador de pH que permite estabilizar el medio en procesos fermentativos, los cambios de pH se analizaron

para explicar el comportamiento de *L. casei subsp rhamnosus* en el tiempo en relación a su respuesta frente al CaCO_3 , agregado en el inicio de la fermentación, y la acidificación causada en un comienzo por la producción de ácido se evaluaron con pH metro digital. Se tomaron 5 ml de muestra. Ver anexo E.

5.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para analizar los datos obtenidos después de la fermentación de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, se utilizaron ecuaciones matemáticas de primer orden y para el análisis estadístico se empleó el programa Statgraphics Plus 5.1.

El diseño base constó de:

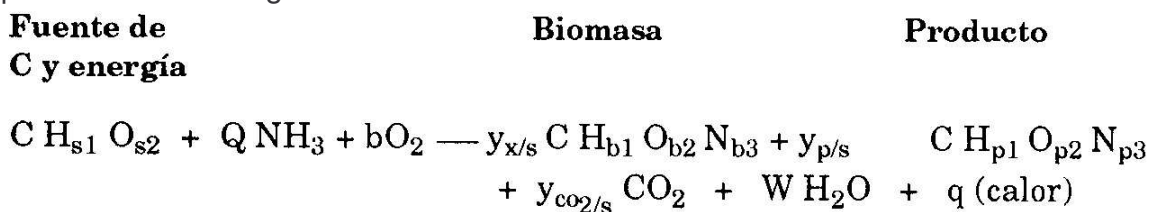
3 factores experimentales, 1 bloque, 5 respuestas, 15 corridas, con 5 grados de libertad y aleatorio. En la tabla 5 se relacionan las variables respuesta evaluadas durante la fermentación.

Tabla 5. Respuestas evaluadas durante la fermentación de *Lactobacillus casei rhamnosus*.

Respuestas	Unidades
Variable Biomasa	Moles/L
Variable Consumo de Azúcar	g/L
Variable Producción de Proteína	g/l
Variable Producción de ácido láctico	g/L
Variable pH	-

5.3.1 Análisis del comportamiento de *L. casei* en el medio a base de suero de leche.

Para este análisis se realizó inicialmente la conversión de la absorbancia registrada como una medida indirecta de la biomasa. Una vez expresada la biomasa en %p/p, se realizó el balance de masas correspondiente que consiste en establecer ¿qué peso de células corresponde a 1 mol?, siguiendo algunos parámetros de la siguiente ecuación.



Para luego calcular los rendimientos Y , correspondientes. Finalmente se analizaron los parámetros de fermentación ensayados. Para luego compararlos y explicar, la remoción de materia orgánica en este sustrato. Todo lo anterior siguiendo las recomendaciones descritas por El Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (Ertola R., Yantorno O. y Mignone C., 2005).

5.3.2 Balance de masas

Se hizo la conversión de las unidades de absorbancia por las cuales se cuantificó densidad o crecimiento a g/L y luego en Moles/L, para estimar el peso seco de la biomasa. Cálculo de cuantas Cmol se consumieron y cuantas Cmol se produjeron. Finalmente se calculó el rendimiento Y entendido como la relación general de la masa que expresa salida con respecto a la entrada. Y definido con los subíndices $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$.

5.4 ANÁLISIS DE FACTORES Y VARIABLES.

1. Con los datos que arrojó el ensayo, se procedió al análisis estadístico para lo cual, primero se construyó un diagrama de Pareto, para comprobar el efecto y el peso de cada factor dentro del experimento y cuál de ellos aportó más en las respuestas.
2. Se escogieron los factores que más aportaron a las respuestas y se procedió a realizar el análisis de superficies de respuestas.
3. Se realizó el gráfico de superficies de respuestas y se analizó el comportamiento cinético del microorganismo en el medio a base de suero de leche con las variaciones ensayadas.
4. Se realizó finalmente un análisis mediante el gráfico de contornos que permite comprobar el análisis del gráfico de superficie de respuestas. Este permitió analizar combinaciones de variables frente a cada factor.
5. Se obtuvo el óptimo comportamiento cinético del microorganismo en el medio.

5.5 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO POST FERMENTACIÓN

Después de culminar el tiempo de cosecha, se realizaron pruebas DBO ver anexo 6 y análisis de DQO, ver anexo 7, que se analizaron en relación al aporte del microorganismo para remover materia orgánica a partir de lactosuero.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

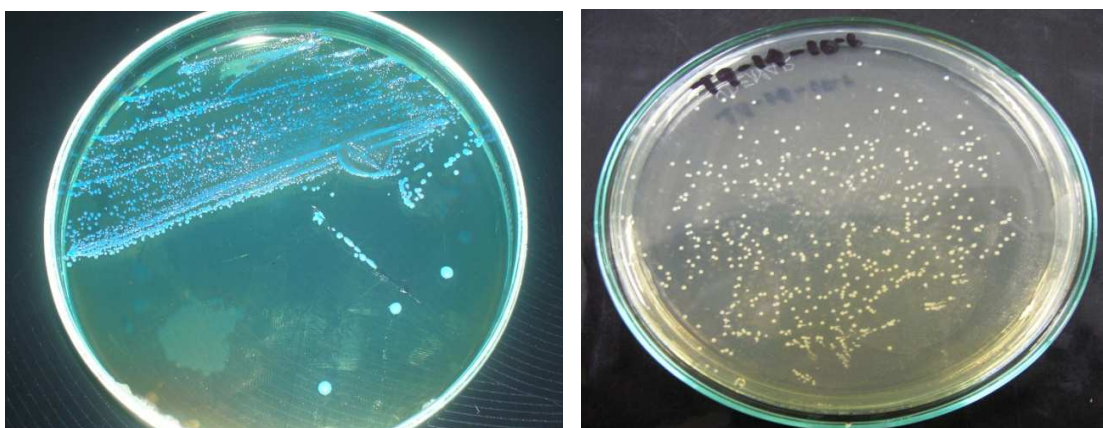
6.1 Etapa I. ACTIVACION Y CONSERVACION DE *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus*

L. casei subsp *rhamnosus* se obtuvo a partir de un stock de trabajo, proveniente del trabajo “Extracción de proteínas tipo bacteriocinas provenientes de bacterias lácticas que puedan ejercer una actividad antagónica contra *Helicobacter pylori*” desarrollado en la Universidad de Nariño (Portilla 2007).

Para la activación de la cepa, se realizó un cultivo en caldo MRS comercial (Merck) estéril durante 24 horas a 37°C, y una vez se observó turbidez en el medio, se procedió a sembrar en cajas de agar MRS (Man Rogosa et Sharp-Merck) y se incubó en iguales condiciones.

Posteriormente, se realizó la verificación de pureza de la cepa por observación de la morfología macroscópica mediante cultivo en agar MRS modificado con azul de anilina (3mg/ml), se observaron colonias pequeñas, convexas, brillantes y cremosas de color azul, compatibles con la morfología descrita para bacterias lácticas, figura 1. Y por observación microscópica mediante coloración de Gram, con la cual se observaron bacilos cortos, Gram positivos, agrupados en empalizada, tal como se presenta en la figura 2.

Figura 2. Morfología macroscópica de *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus*: Izquierda, colonias en agar MRS modificado con azul de anilina; derecha, colonias agar MRS comercial



6.2 ETAPA II: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *L. casei* subsp *rhamnosus* EN MEDIO A BASE DE SUERO DE LECHE Y EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN.

6.2.1 Preparación de inóculos y preinóculos

Para la preparación de preinóculos se tomaron 10 ml de caldo MRS comercial (OXOID) que contenía la cepa preactivada y se inocularon en 100ml de caldo MRS comercial (OXOID).

El inóculo se ajustó al 10% v/v según Crueger y Crueger (1993). Para los 15 ensayos, cada uno con un volumen de 400ml de fermentación, se preparó 650 ml de caldo MRS y se inocularon con 65 ml de preinóculo. Se incubó a 37°C durante 18-24 horas.

Posteriormente se realizó el conteo de células en cámara de NeuBauer, ajustando la población a una concentración de $4,65 \times 10^7$ bact/ml (Ruales y Vallejo, 2007).

6.2.2 Cinética de crecimiento de *L. casei* subsp *rhamnosus* en medio a base de suero de leche

Para estudiar el comportamiento de *L. casei* subsp *rhamnosus* se realizó la fermentación en un medio con suero de leche y sacarosa. Se ensayaron tres factores: velocidad de agitación, concentración de CaCO_3 y suero de leche y tres niveles por cada factor. Ver tabla 6.

Tabla 6. Combinación de factores y niveles utilizados en la determinación del comportamiento de *L. casei* subsp *rhamnosus*

Factor	Unidad	Nivel		
		-1	0	1
Suero de leche	g/L	180	210	240
Carbonato de Calcio	g/L	7	9,4	21
Agitación	rpm	120	200	300

La cinética se obtuvo luego de 24 horas, periodo durante el cual se tomaron muestras para la determinación de los parámetros de fermentación desde el tiempo cero o tiempo de inicio y después de este cada dos horas durante las 24 horas.

El experimento se realizó en 15 ensayos. Los ensayos, denominados a las combinaciones de niveles y factores sugeridos tras la aplicación del diseño experimental Box Behnken utilizando el programa Statgraphics plus 5.1 para la fermentación y el análisis de los resultados, se organizaron y codificaron de acuerdo con el factor agitación, solo por condiciones técnicas en la ejecución del experimento.

Tabla 7. Factores, variables y resultados obtenidos durante la fermentación de *L. casei subsp rhamnosus*.

Ensayo	Factores			Tiempo μ_{max}	Variables				
	Suero	CaCO ₃	Agitación		P. Proteínas (g/L)	pH	Ac Láctico (g/L)	C. Azúcares (g/L)	Biomasa (g/L)
1	-1	1	0	4	5,87	6,16	0,3	1,54	0,72
2	1	-1	0	7	5,98	5,1	2,3	2,71	0,673
3	0	0	0	5	7,86	5,99	0,75	1,13	0,777
4	1	1	0	4	8,73	5,81	0,5	1,29	0,748
5	0	0	0	6	7,05	5,88	0,775	1,19	0,624
6	0	0	0	6	13,80	5,83	0,8	1,4	0,327
7	-1	-1	0	7	12,88	5,25	1,175	2,21	0,564
8	0	-1	-1	3	5,57	6,53	0,25	0,86	0,465
9	-1	0	-1	5	5,37	4,95	2,2	1,57	0,249
10	0	1	-1	4	9,49	5,21	1	1,3	0,073
11	1	0	-1	4	4,29	5,53	1	1,99	0,159
12	1	0	1	4	6,49	6,15	0,85	1,26	0,579
13	-1	0	1	3	6,38	6,11	0,7	1,99	0,886
14	0	-1	1	4	6,56	6,04	1,3	1,6	0,584
15	0	1	1	4	8,86	6,14	0,65	1,21	0,616

En la tabla 7 se presentan los resultados de cada ensayo para cada una de las variables estudiadas, en relación con la velocidad de crecimiento máxima o μ_{Max} .

La mayor producción volumétrica de ácido láctico en la fase exponencial de crecimiento se consiguió en el ensayo 2, que de acuerdo con Sánchez, 2007, valores de pH cercanos a 5 favorecen una mayor producción de este, además este dato concuerda con la mejor conversión de sustrato a producto.

Así mismo, una de las menores producciones de ácido láctico se presentó en el ensayo 1 y es en donde el pH solo alcanzó un pH de 6.16, que no es considerado como óptimo para la producción de ácido láctico, ya que es cercano a la alcalinidad.

La mayor producción de proteínas se obtuvo en el ensayo 6, que se fermentó bajo las condiciones óptimas de los factores evaluados

Los resultados presentados en este trabajo se obtuvieron a partir de un sistema sin control de pH, lo que puede producir condiciones inhibitorias para el

crecimiento bacteriano, ya que al comparar con estudios en donde se realizó control de pH se observa una mayor producción de ácido láctico.

Se conocen dos factores principales que limitan la biosíntesis de ácido láctico, el crecimiento y la productividad: las condiciones limitadas de nutrientes que son utilizados y el efecto inhibitorio de la acumulación de ácido láctico. (Youseff, 2005)

El mecanismo por el cual el crecimiento es inhibido por el ácido láctico todavía no está totalmente entendido. El mecanismo aceptado de inhibición está relacionado con la solubilidad de las formas no disociadas dentro de la membrana citoplasmática y la insolubilidad de las formas ácidas ionizadas. Esto causa acidificación de citoplasma y el colapso de la fuerza motriz, resultando en inhibición del transporte de nutrientes. (Gonçalves, 1997)

La capacidad de los lactobacilos de tolerar bajos valores de pH más que otras bacterias ácido lácticas se origina desde sus citoplasmas con valores más básicos de pH, permitiendo altas concentraciones de ácidos no disociados a ser tolerados. Pero esto podría además ser relacionado con la alta actividad de la ATPasa responsable de la extrusión de H⁺ o con la mayor eficiencia para la excreción de ácido láctico por parte de los lactobacilos. (Gonçalves, 1997)

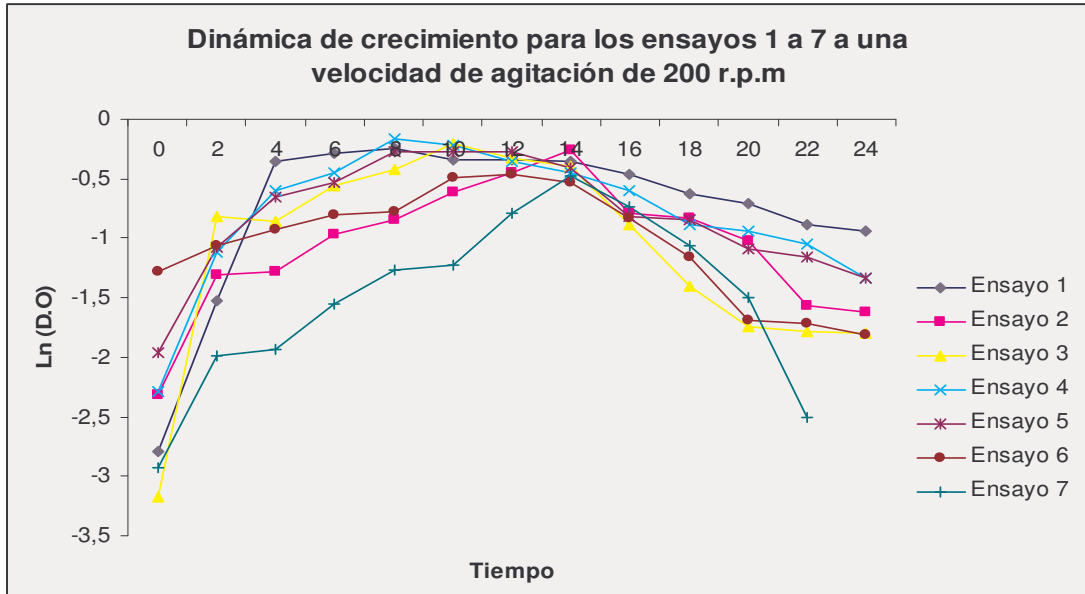
6.2.3 Análisis del comportamiento de *L. casei subsp rhamnosus* en relación con el factor velocidad de agitación durante 24 horas de fermentación

Como se puede observar en la gráfica 1, los ensayos 1 a 7 inician con la fase de crecimiento elevada dentro de las dos primeras horas de fermentación lo cual puede atribuirse a la preactivación de la bacteria. Se observa que esta fase tiene un ascenso constante hasta las de 10 a 14 horas.

La agitación favorece la disponibilidad de oxígeno en el medio y considerando el carácter anaerobio facultativo de la bacteria, este factor es de suma importancia para favorecer su crecimiento. Sin embargo, una agitación elevada induce un crecimiento rápido y exagerado así como procesos de lisis celular por la acumulación excesiva de productos en el medio.

La disminución en el crecimiento a partir de la 8 horas hasta las 24 horas puede deberse al consumo de azúcares y demás nutrientes del medio ya que en un cultivo cerrado, la concentración de nutrientes afecta la velocidad de crecimiento y la generación de productos del microorganismo, también puede deberse a la acidificación del medio debido a la producción de ácido láctico por parte de *L. casei subsp rhamnosus*. Según Urribarri et al., 2003, los productos resultantes de la fermentación producen condiciones adversas que inhiben el crecimiento del microorganismo.

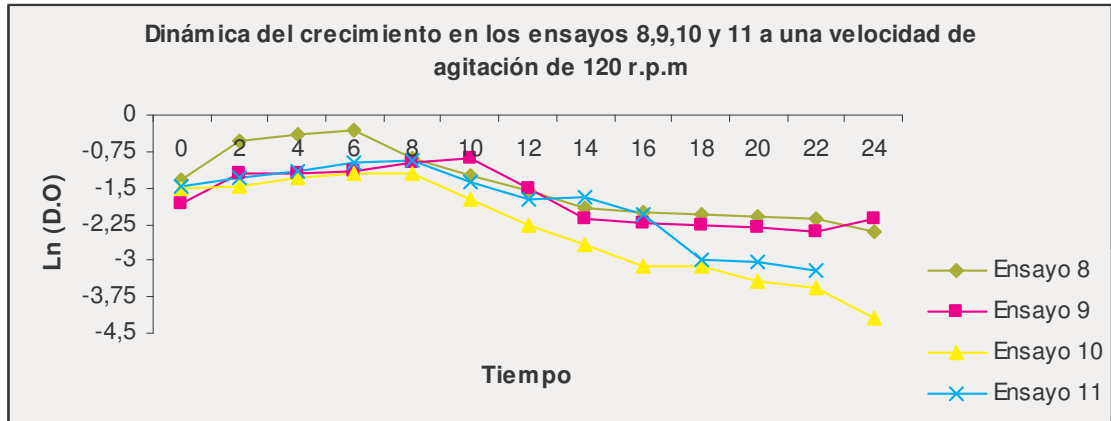
Grafica 1: Dinámica de crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* a 200 rpm



Cabe destacar la notable disminución del crecimiento de la bacteria en el ensayo 7, a partir del tiempo 14 hasta 24 horas, lo cual podría explicarse en la baja concentración del CaCO₃ en el medio y la producción de ácido láctico más alta. La acumulación de ácido láctico en el medio acelera la fase de decadencia debido a su acción directa sobre el potencial de las membranas, las desestabiliza y por lo tanto las células son susceptibles a lisis celular.

En la gráfica 2, se relacionan los ensayos 8, 9, 10 y 11, desarrollados a una velocidad de agitación de 120 r.p.m. En general, en el ensayo 8 se observó un ligero aumento del crecimiento desde el tiempo 0 al tiempo 6, periodo de crecimiento exponencial corto en comparación con los ensayos 9, 10 y 11. Se puede observar que no existe un aumento considerable de biomasa durante la fermentación dentro de las primeras horas como si ocurrió en la fermentación a 200 r.p.m. A partir del tiempo 10 aproximadamente se inicia el descenso lento en la cantidad de biomasa presente en el medio de cultivo. De acuerdo con la tabla 8 en este grupo de ensayos (8, 9, 10 y 11) se presentan algunos de los valores más altos de producción de ácido láctico (ensayo 9) y más bajos en cuanto a pH (ensayo 9 y 10). La ausencia o baja velocidad de agitación están directamente relacionadas con un tiempo de duplicación celular prolongado, sin embargo la generación de productos del metabolismo celular puede verse favorecida. Esta última condición es importante cuando se pretende la obtención de productos de la fermentación como ácidos orgánicos y antibióticos.

Grafica 2: Dinámica de crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* a 120 rpm

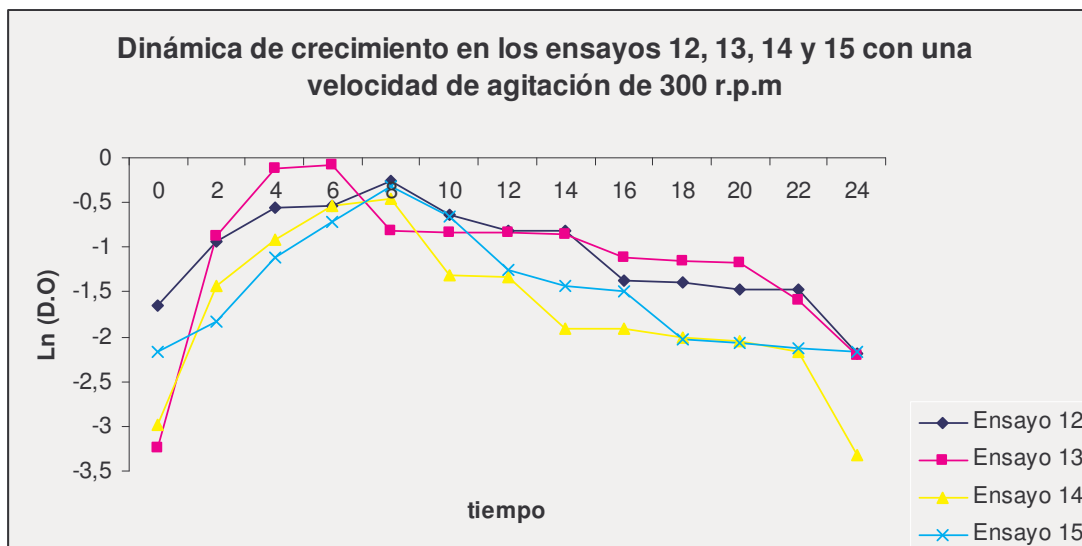


En la gráfica 3, se presentan los ensayos 12, 13, 14 y 15 realizados con una velocidad de agitación de 300 r.p.m. Donde se puede observar ausencia de fase de adaptación e ingreso inmediato a la fase de crecimiento exponencial, ya que el crecimiento aumenta desde el tiempo 0 al tiempo 8, principalmente para los ensayos 12, 14 y 15; para estos ensayos, a partir del tiempo 8-14 se presenta un ligero descenso lo que indica que la fase de adaptación de la bacteria en estos medios de cultivo es corta e ingresa rápidamente en fase de decadencia. Para el ensayo 13, el crecimiento se estabiliza en los tiempos 7 a 11 y a partir del tiempo 12 se genera una lenta fase de decadencia que perdura hasta el tiempo 24. En el ensayo 13 se presentó el mayor crecimiento entre los 15 ensayos.

El comportamiento del microorganismo en este grupo de ensayos es el resultado de la velocidad de agitación de 300 r.p.m. Este factor genera una alta disponibilidad de oxígeno en el medio y favorece temporalmente el crecimiento microbiano. Sin embargo, el efecto adverso de la agitación sobre el crecimiento en el tiempo es claro en todos los ensayos a partir del tiempo 14.

Con los datos obtenidos se puede evidenciar que a mayor agitación mayor crecimiento sin embargo, el periodo de la fase de crecimiento exponencial es corto. Esto responde a que la agitación excesiva puede producir lisis celular e incrementar la temperatura, lo que ocasiona un descenso en la viabilidad celular rápidamente (Ertola R., Yantorno O. y Mignone C. 2005).

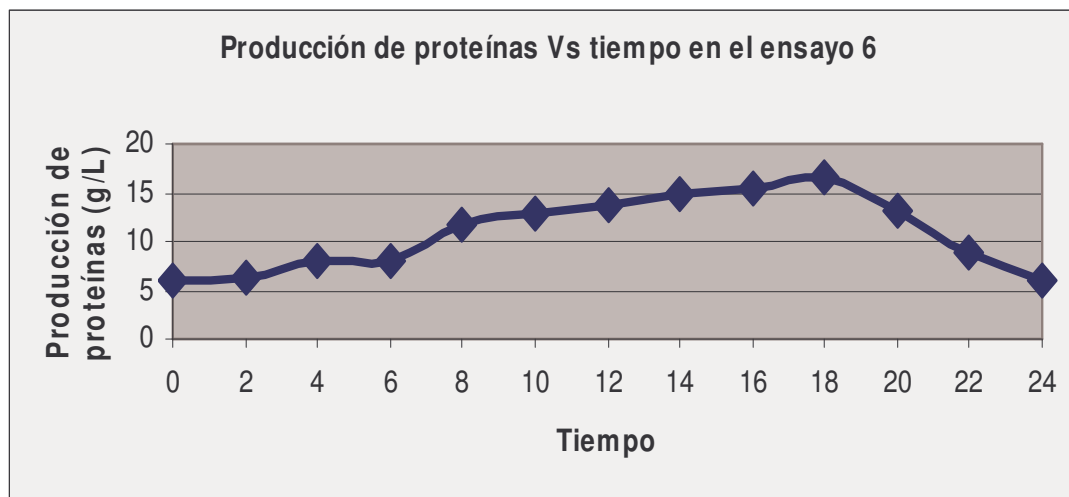
Grafica 3: Dinámica de crecimiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* a 300 rpm



6.2.4 Evaluación de parámetros de fermentación

En cuanto a la producción de proteínas, se obtuvo un máximo de 16,55g/L al tiempo 18 en el ensayo 6 (ver gráfica 4), siendo inferior al reportado por Ruales et al 2007, al evaluar el crecimiento de este microorganismo en un sustrato a base de suero de leche pero utilizando como fuente de carbono la glucosa que fue de 30,51 g/L. Este resultado puede deberse a que la sacarosa es un disacárido y por lo tanto es costoso para el metabolismo del microorganismo. A diferencia de la glucosa que es un monosacárido fácil de metabolizar.

Grafica 4. Producción de proteínas por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el ensayo 6.



Por otro lado la esterilización en autoclave del medio de cultivo, previo a la fermentación podría haber permitido la reacción de Maillard que tiene lugar entre los grupos carbonilos de los azúcares con los grupos amino de proteínas, aminoácidos, etc. Y consiguiente formación de productos de condensación con lo cual se inactivan significativas cantidades de carbohidratos y nitrógeno amínico (Ertola R., Yantorno O. y Mignone C., 2005). La naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre los componentes de un medio, durante la esterilización por calor, depende no solamente de la naturaleza de los componentes sino también de la temperatura, duración del calentamiento, pH del medio y de la agitación.

Uribarrí, et al., 2004, al someter el suero de leche a 115°C durante 20 minutos, encontraron que se observa un ligero incremento en la concentración de lactosa y fósforo, mientras que el porcentaje de nitrógeno y proteínas disminuyeron en un 42,86% y 43,28%, respectivamente.

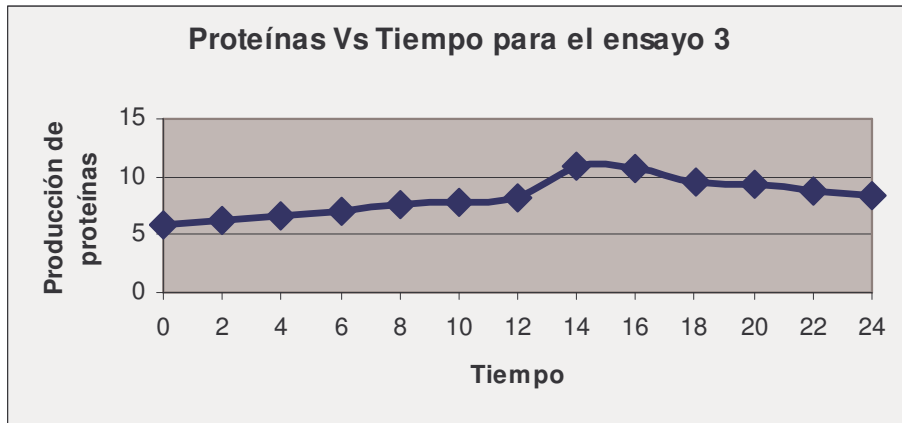
Además, según Kunji et al 1996, muchas cepas de bacterias ácido lácticas son deficientes en la síntesis de uno o más aminoácidos, lo cual incrementa los requerimientos para un balanceado medio de cultivo para la producción de proteínas.

La producción de proteínas se incrementó desde el tiempo 0 hasta el tiempo 6, y en los ensayos 3 y 14 (ver graficas 5 y 6) hasta el tiempo 9 y 8 respectivamente, ambos presentan en la composición del medio de cultivo el factor suero en la concentración óptima reportada por Ruales et al., 2007.

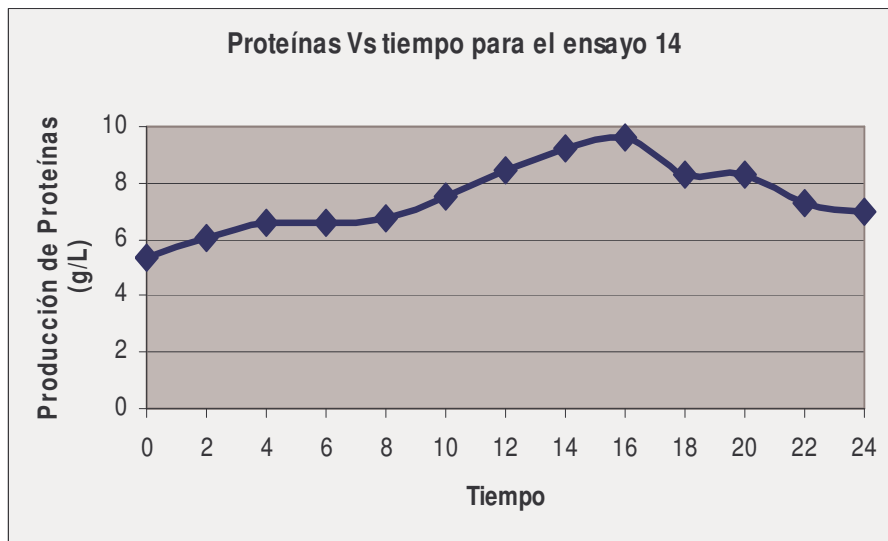
En el grupo de ensayos correspondiente a los puntos centrales, la producción de biomasa se correlaciona con la producción de proteínas, lo cual refleja el

aprovechamiento de los nutrientes y condiciones del medio por parte del microorganismo.

Grafica 5. Producción de proteínas por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el ensayo 3.

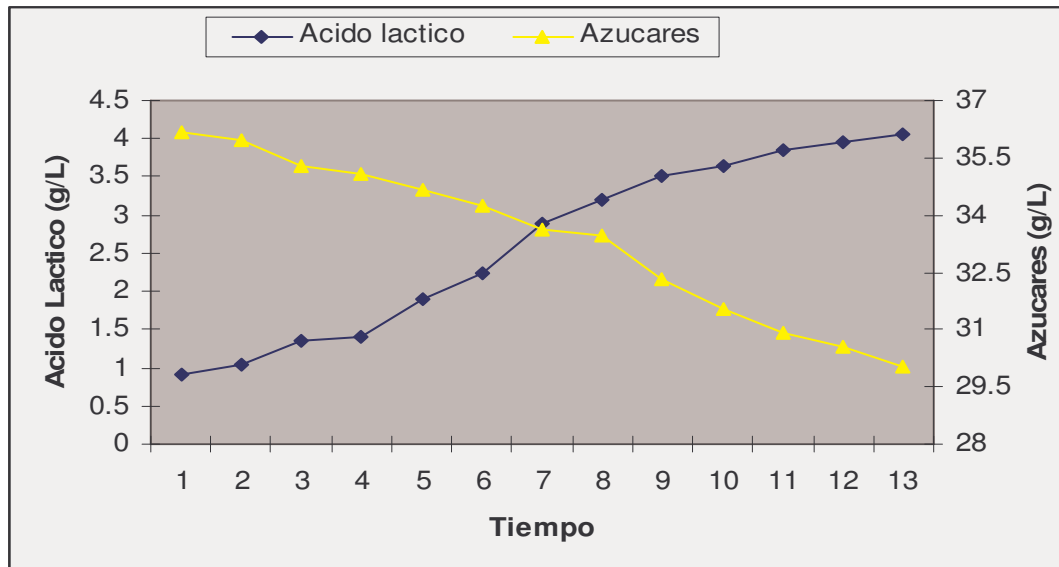


Grafica 6. Producción de proteínas por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el ensayo 14.



En los ensayos 1, 3, 12, 13 se observa que la producción de proteínas se da en puntos en donde la producción de biomasa no es la más alta y se presenta una diferencia aproximada de 4 horas entre el punto máximo de cada uno de los valores. Esto puede deberse a la composición y combinación de factores en cada uno de los medios de cultivo.

Grafica 7. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, en el ensayo 2.



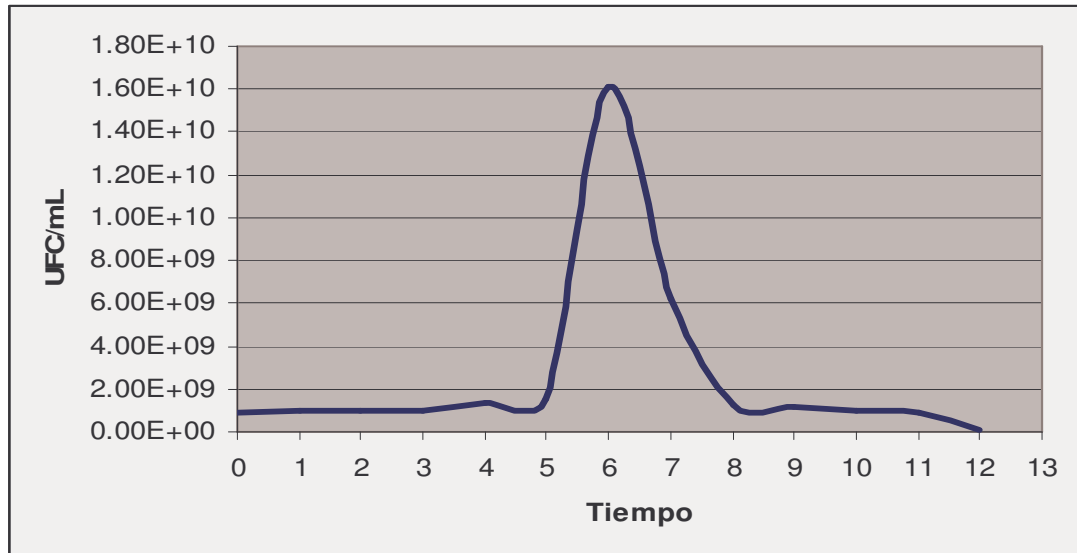
En cuanto a la producción de ácido láctico y consumo de azúcares, se encontró que el ensayo 2, con 2,3 g/L de ácido láctico y 2,71 g/L de proteínas presentó la mayor eficiencia en el consumo de sustrato y obtención de producto. Se destaca que la mayor producción de ácido láctico se hace más notable en los tiempos 7 a 9, continuando con un ascenso hasta el final de la fermentación en el tiempo 13. (Ver grafica 7).

En este ensayo no se obtuvo una producción alta de proteínas (5,98g/L) y se presenta una producción de biomasa dentro del promedio del resto de ensayos (0,673g/L)

Según Vasala et al, 2005, la presencia de péptidos digeribles mejoran la producción de ácido láctico en el suero de leche, además la producción de ácido láctico está correlacionada con la cantidad de biomasa, siempre y cuando la concentración se encuentra bajo el nivel inhibitorio. Esto implica que el crecimiento de los lactobacilos incrementa la tasa de producción de ácido láctico.

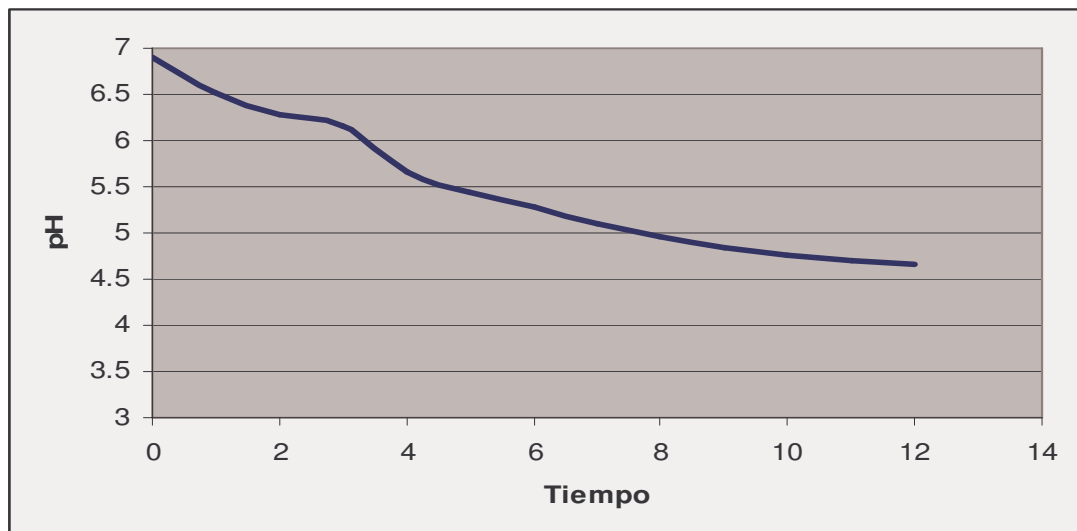
En la gráfica 8, se puede observar que las UFC de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* presentan un crecimiento constante hasta el tiempo 5, después del cual se produce un crecimiento rápido entre los tiempos 6 y 7 y posteriormente se presenta una caída rápida en el recuento de UFC.

Grafica 8. Recuento de Unidades Formadoras de Colonias de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, ensayo 2.



El pH obtenido en el ensayo 2 es de 5,1 (ver grafico 9) uno de los más bajos de todos los ensayos y este se obtuvo en el tiempo 7, tiempo en el cual se produce la caída de la curva de crecimiento.

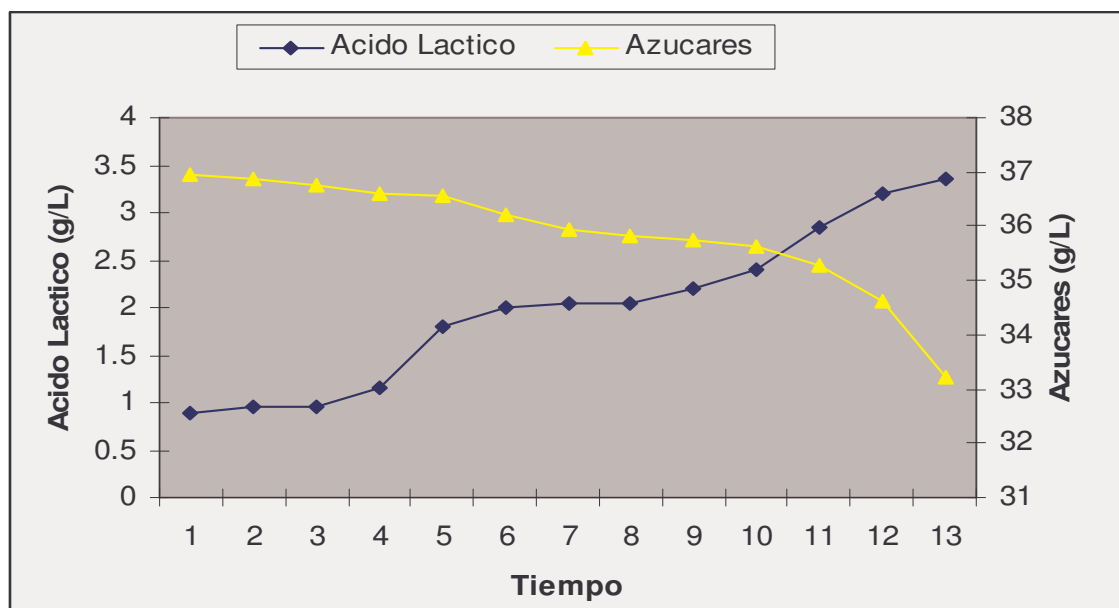
Grafica 9. Cambios de pH de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, ensayo 2



Una posible explicación al comportamiento de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* en el ensayo 2 puede ser la falta de control del pH, ya que es sabido que los productos de las fermentaciones promueven condiciones adversas que inhiben las funciones de los microorganismos. (Uribarrí et al, 2006).

El ensayo que presentó la menor producción de ácido láctico fue el 8 con 6,53, una producción de ácido láctico de 0,25g/L y un consumo de azúcares de 0,36 g/L, unos de los valores más bajos de entre los ensayos.

Grafica 10. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares por *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, ensayo 8.



Esta baja producción de ácido láctico a un pH favorable para el crecimiento bacteriano puede deberse a la relativa poca producción de biomasa, probablemente influenciada por la combinación entre factores de agitación, carbonato de calcio y concentración de suero de leche.

Tabla 8. Datos de Balance de masas & rendimientos para los ensayos 1 a 15 con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*

ENSAYO	Sustrato C-mol/L	Biomasa C-mol/L	Producto C-mol/L	Yp/s %	Yx/s %	μ_{max}	μ
1	0.0516	0.027	0.0033	6.4	52	0,872	0,41
2	0.091	0.026	0.025	27	29	0,247	0,12
3	0.038	0.028	0.0033	21	73	0,575	0,28
4	0.043	0.029	0.0056	13	67	0,49	0,24
5	0.04	0.024	0.0086	22	60	0,251	0,12
6	0.0047	0.013	0.0089	19	28	0,133	0,07
7	0.074	0.022	0.013	18	30	0,303	0,14
8	0.018	0.029	0.0028	10	62	0,313	0,15
9	0.052	0.01	0.024	46	19	0,153	0,07

10	0.043	0.0028	0.011	26	6	0,079	0,04
11	0.066	0.0061	0.011	16	9.2	0,134	0,07
12	0.042	0.022	0.0094	22.3	52.3	0,318	0,16
13	0.066	0.034	0.0078	12	51.5	0,901	0,44
14	0.053	0.022	0.014	26	42	0,594	0,28
15	0.04	0.024	0.0072	18	60	0,483	0,24

La mayor velocidad específica de crecimiento se observa en el ensayo 13, y el mejor rendimiento biomasa -sustrato se presenta en el ensayo 3.

De los ensayos realizado el 9 fue el que obtuvo el mejor resultado para rendimiento de producto por sustrato consumido (46%), ver tabla 8, este dato se puede comparar con la investigación de Ruales *et.al* en la que reporta un Yp/s de 38% para el sustrato miel de panela-suero de leche, indicando una menor producción en este medio, lo que puede deberse a la alta concentración de azúcares disponibles de la miel de panela lo cual podría causar una inhibición en la síntesis de este metabolito.

ETAPA III DISEÑO EXPERIMENTAL PRELIMINAR

6.3.1 Diseño experimental preeliminar. Se trabajo un diseño experimental preliminar como se muestra a continuación:

Tabla 9. Descripción del diseño experimental preliminar

Resumen del Diseño.

 Clases de Diseño: Superficie de respuesta
 Nombre de Diseño: Diseño Box-Behnken

Base de Diseño

 Número de factores experimentales: 3 Número de bloques: 1
 Número de residuos 5
 Número de ejecuciones: 15 Error Grados de libertad: 5
 Aleatorizado: Si

Factores	Pequeño	Grande	Unidades
Factor suero	-1.0	1.0	g
Factor carbonato	-1.0	1.0	g
Factor agitación	-1.0	1.0	rpm

Respuestas Unidades

Var biomasa	C-mol/L
Acido láctico	g/L
Consumo de sustrato	g/L
proteínas	g/L
pH	

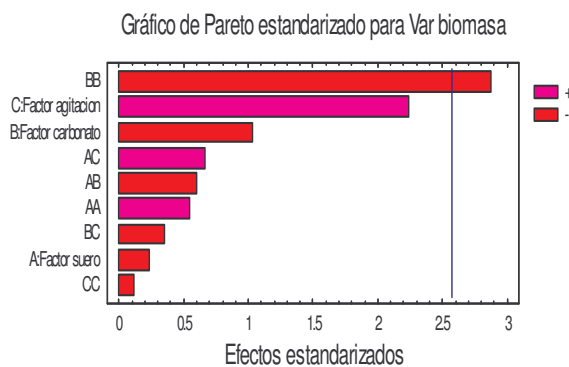
Después de realizar el análisis estadístico con el programa Statgraphics CD-ROM, Programa estadístico, versión 5.0, 2000 plus se obtuvo los siguientes resultados:

- Análisis de varianza para la respuesta biomasa

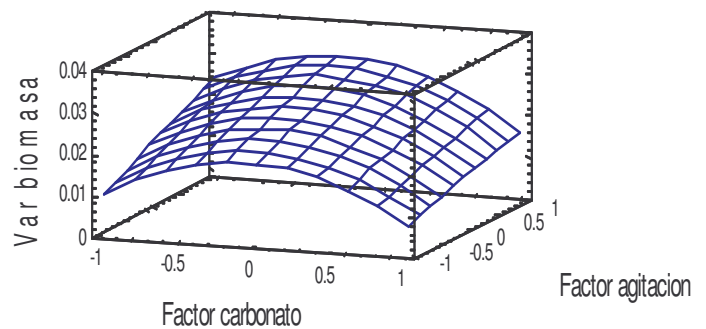
En el Análisis de varianza para la biomasa (c-mol/L), el R-cuadrado indica que en el diseño se explica en un 76.07% de variabilidad para la respuesta biomasa. El R-ajustado para los grados de libertad es 33.0181%, lo cual indica que las variables tiene efecto sobre la respuesta. Se observo que el efecto de las variable carbonato de calcio no es significativo pero su efecto cuadrático si lo es ($p= 0.0347 < 0.05$), por lo que se deduce que este factor es significativo lo cual se justifica con ayuda del principio estadístico denominado parsimonia , los factores agitación y suero de leche y las interacciones entre agitación-suero; agitación-carbonato de calcio; Suero-carbonato de calcio presentan valores de P mayores a 0.05, lo cual mostró un efecto poco significativo en la variable respuesta. (Ver grafica 11)

Grafica 11. Diagramas de Pareto y Superficie de Respuestas para Variable biomasa

a) Diagrama de Pareto



b) Diagrama de superficie de respuestas



Según el análisis de superficie (grafica 11) y teniendo en cuenta que la combinación BC (Carbonato de calcio-Agitación) presenta un valor superior a 0.05 y no muestra efectos significativos sobre la respuesta, fueron graficados ya que individualmente presentan valores cercanos a p-valor 0.05. Según este grafico se puede observar que la mejor repuesta se da en la combinación de niveles intermedios de carbonato de calcio (14gr) y niveles altos de agitación (300 rpm).

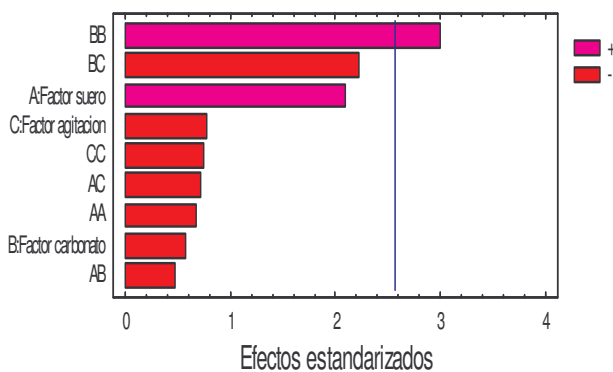
Esta combinación de factores la presentó el ensayo 13 y se correlaciona con la mayor producción de biomasa (ensayo13).

- Análisis de varianza para la respuesta Acido láctico

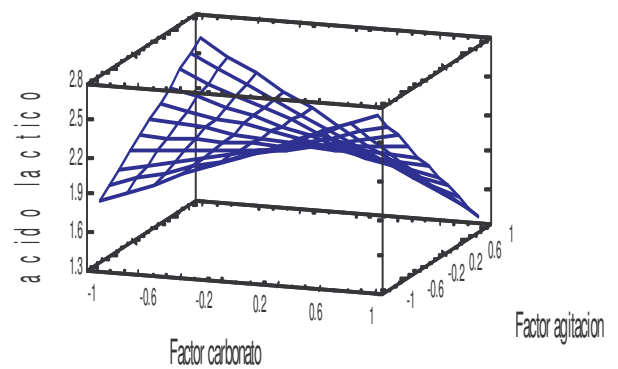
En el Análisis de varianza el acido láctico (g/L), el R-cuadrado indica que en el diseño se explica en un 81.2475% de variabilidad para la respuesta Acido láctico. El R-ajustado para los grados de libertad es 47.493%, En este caso, 1 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95.0% de nivel de confianza. Se observa que el efecto del carbonato de calcio al cuadrado presenta un valor de p menor a 0.05 (0.0300), lo que indica el efecto significativo sobre la variable respuesta mientras que los demás factores y su combinaciones presentan valore de P mayores a 0.05, lo cual muestra un efecto poco significativo en la variable respuesta. Esto puede deberse a que el carbonato de calcio puede ser utilizado como aditivos indirectos para la industria alimenticia ya que posee bajo contenido de electrolitos y presenta un efecto estabilizador del pH, el cual según Sánchez *et.al* 2007 los valores de pH cercanos a 5 favorecen la producción de Acido láctico.

Grafica 12. Diagramas de Pareto y Superficie de Respuestas para variable Acido láctico

a) Diagrama de Pareto



b) Diagrama de superficie de respuestas

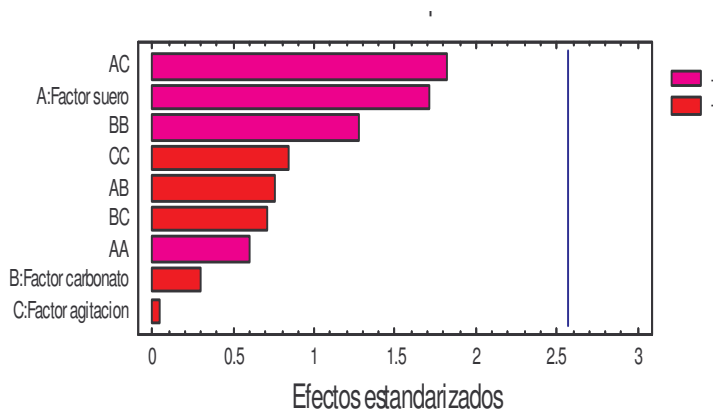


Aunque la combinación BC presenta un valor P superior a 0.05 es la combinación donde este se acercaba mas a 0.05 (0.0766), se observa que en esta interacción la mayor producción de acido láctico se encuentra en la combinaciones de los niveles alto y bajo (21gr y 120 rpm), respectivamente para las variables leche en polvo y carbonato de calcio. Ver grafica 12.

- Análisis de varianza para consumo de sustrato

En el Análisis de varianza para el consumo de sustrato, el R-cuadrado indica que en el diseño se explica en un 67.2969% de variabilidad para la respuesta consumo de sustrato. El R-ajustado para los grados de libertad es 8.43%, lo cual indica que las variables no tienen ningún efecto sobre la respuesta. Lo que se puede atribuir que la técnica utilizada (Dubois 1954) para evaluar esta respuesta se basa en la cuantificación de azúcares totales en el medio y para todos los ensayos la cantidad de sacarosa fue constante por lo cual puede considerarse como una variable independiente de los factores.

Grafica 13. Diagrama de Pareto para variable Consumo de Sustrato

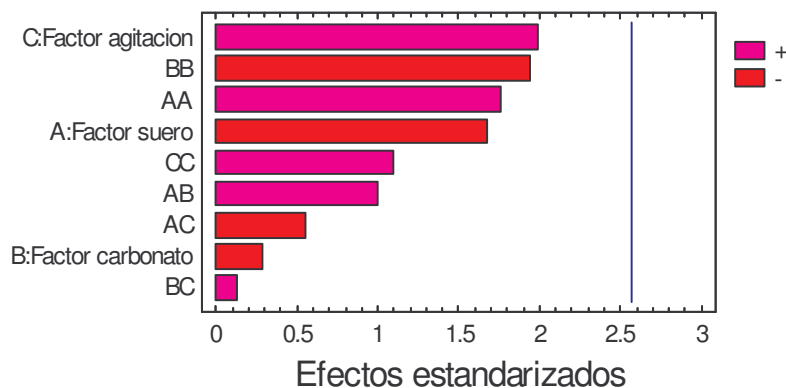


- Análisis de varianza para variable pH

Según el análisis de varianza (ANOVA) el R-cuadrado explica el 77.0913% de la variabilidad de pH. El estadístico R-cuadrado ajustado a los grados de libertad, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 35.8555%.

Se observó que el efecto de las variables (Suero de leche, Carbonato de Calcio y agitación) y las interacciones de ellas presentan valores de P mayores a 0,05 lo cual mostro un efecto poco significativo en la variable pH.

Grafico 14. Diagrama de Pareto para variable pH



El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 54.918% de la variabilidad en proteínas. El estadístico R-cuadrado ajustado, para los grados de libertad es 35.8555%.

El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es inferior a 0.05, hay indicios de una posible correlación de serie.

Los p-valores para las variables y sus combinaciones presentan valores superiores al 0.05 lo que indica que no tienen ningún efecto significativo sobre la variable respuesta.

- Análisis de varianza para variable Producción de Proteínas

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 54.918% de la variabilidad en proteínas. El estadístico R-cuadrado ajustado, para los grados de libertad es 0.0%.

El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es inferior a 0.05, hay indicios de una posible correlación de serie.

Los p-valores para las variables y sus combinaciones presentan valores superiores al 0.05 lo que indica que no tienen ningún efecto significativo sobre la variable respuesta

Grafico 15. Diagrama de Pareto para variable producción de proteínas

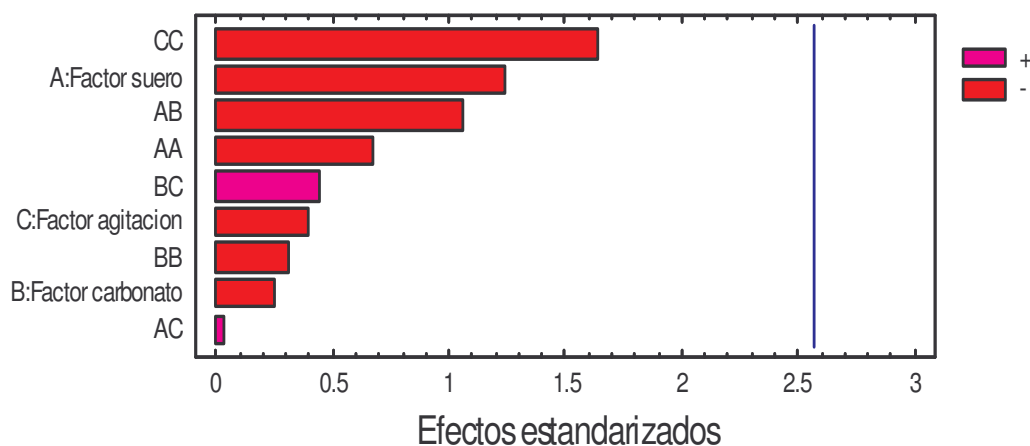


Tabla 10. Resultados de análisis de DBO5 realizados a ensayos seleccionados

Análisis	Muestra	Unidades	Resultados	Porcentaje de remoción
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5)	Inicial	mg/L O ₂	73500	
	1	mg/L O ₂	72000	2%
	9	mg/L O ₂	69000	6%
	13	mg/L O ₂	66000	10%

Los resultados obtenidos mediante la determinación de DBO₅, ver tabla 10, muestran una degradación bioquímica progresiva de la materia orgánica presente en el fermento láctico, que se manifiesta mediante la oxidación de los compuestos inorgánicos como sulfuros, ión ferroso, etc, y también el utilizado para oxidar compuestos reductores de N₂. Esta prueba se utilizó también para determinar los requerimientos relativos de O₂ de las bacterias presentes en el fermento láctico, en este caso *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*.

Al realizar los análisis de DBO y DQO al fermento inicial, que presentaba los factores en valor central, indican que este presenta una DBO superior al reportado en la bibliografía, ya que en este estudio se obtuvo un valor de 73500mg/L O₂. Esta diferencia puede deberse a que el medio de cultivo aparte del suero de leche también contenía sacarosa, que es otra sustancia que aporta materia orgánica al medio.

El efluente líquido de la industria láctea presenta como principales contaminantes aceites y grasas, sólidos suspendidos, DQO, DBO y nitrógeno amoniacal (Kjeldahl). El azúcar constituyente de la leche denominada lactosa es uno de los principales aportantes de DBO en los procesos productivos. Las emisiones líquidas aportan nutrientes (fósforo y nitrógeno), lo cual obliga a evaluar su impacto sobre los cuerpos superficiales.

Los principales procesos contaminantes son los procesos de producción de quesos, cremas y mantequilla, el proceso de lavado de torres de secado y las soluciones de limpieza alcalina. Se estima que el suero generado en la elaboración de quesos tiene una DBO5 del orden de 40.000 - 50.000 mg/l. (Lannane et al, 2005)

Considerando que el poder contaminante de un habitante es de 70 g por día de DBO, y tomando como ejemplo un efluente que tenga 35 g l⁻¹ de DBO como el suero de queso, con un volumen diario de ese efluente en una fábrica de queso de 1.000.000 litros, decimos que el grado de contaminación equivale a una población de 500.000 habitantes, lo que da una idea muy clara de la magnitud de la contaminación ambiental que puede producir una sola fábrica si no se utiliza ese efluente.

Tabla 11. Resultados de análisis de DQO realizados a ensayos seleccionados

Análisis	Muestra	Unidades	Resultados	Porcentaje de remoción
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Inicial	mg/L O ₂	194000	
	Ensayo 1	mg/L O ₂	182350	6%
	Ensayo 9	mg/L O ₂	119000	39%
	Ensayo 13	mg/L O ₂	163400	16%

Según Rosa et al, 2008, el suero de leche presenta una DQO de promedio de 5000 mg de O₂/L, lo cual es un valor inferior al obtenido en este estudio, lo que puede deberse a la sacarosa presente en el medio de fermentación.

En este estudio, ver tabla 11, se observa que los valores de DQO son mayores que los obtenidos para DBO, posiblemente esto se deba a que algunos compuestos orgánicos no son oxidados fácilmente por los microorganismos y a la formación de biomasa microbiana. (Atlas, 2002).

Generalmente para el tratamiento de efluentes y la degradación de materia orgánica presente en ellos se emplea un pool de bacterias que en conjunto se encargan de realizar la remoción de contaminantes, ya que una población única de microorganismos no podría realizarla de manera totalmente eficiente. Según Carrillo 2002 sugiere la utilización de una mezcla de levaduras capaces de

consumir lactosa y otras de consumir los subproductos generados por la actividad metabólica de las primeras, obteniéndose reducciones muy altas en la demanda química de oxígeno, que no son alcanzables con la utilización de monocultivos.

Las poblaciones microbianas empleadas para el tratamiento de efluentes son usualmente una mezcla muy compleja de diferentes géneros y especies de bacterias, hongos y protozoarios. (Ertola et al, 2005).

En general, en la tabla 11, se puede observar que como la remoción de materia orgánica no es la óptima y aún después del tratamiento del lactosuero con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* se encuentran cantidades considerables de materia orgánica en el medio, es necesario buscar una alternativa que involucre el aprovechamiento del total del lactosuero en la elaboración y/o obtención de otros productos.

Según Ertola et al 2005, el aprovechamiento o la valorización más conveniente de un efluente por vía microbiana depende del producto a ser obtenido o más precisamente de las aplicaciones y aceptación por parte del mercado de ese producto. Por acción de los microorganismos sobre la materia orgánica puede obtenerse:

- a. Energía a partir de residuos sólidos o líquidos, como es el caso del metano,
- b. Fertilizantes o condicionadores del suelo, a partir de residuos sólidos,
- c. Alimentos de tipo no convencional, como proteínas unicelulares, y
- d. Metabolitos específicos, como alcohol, ácido láctico, enzimas, etc.

7. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los datos obtenidos se puede concluir que a mayor agitación mayor crecimiento sin embargo, el periodo de la fase de crecimiento exponencial es mas corto.
- La bacteria *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* presentó una rápida adaptación al medio de cultivo suero de leche-sacarosa
- Los valores de μ_{max} por lo general en la mayoría de ensayos se alcanzan en el tiempo 4 (8 hrs.), determinándose a esta hora como el tiempo de cosecha.
- Al comparar los resultados obtenidos por Ruales, V et.al 2007 utilizando suero de leche y miel de panela como sustrato, con los de esta investigación se observa que al cambiar la fuente de carbono por sacarosa hay mayor rendimiento de producción de ácido láctico de 34% a 43% respectivamente.
- Las mejores condiciones para la producción de biomasa se obtienen en valores intermedios de carbonato de calcio (14gr) y niveles altos de agitación (300 rpm)
- La mayor producción de proteínas se obtuvo en el ensayo 6, que se fermentó bajo los valores intermedios de los factores evaluados
- El porcentaje de remoción de materia orgánica utilizando *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*, es relativamente bajo a diferencia de estudios que utilizan cultivos mixtos.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que evalúen el comportamiento de *Lactobacillus casei ssp rhamnosus* en el medio de cultivo suero de leche, frente a otros microorganismos de interés industrial empleados en la elaboración de bebidas fermentadas, tales como bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* y otras especies del género *Lactobacillus*, para el desarrollo de cultivos iniciadores.
- Realizar estudios sobre remoción de materia orgánica empleando un pool de bacterias que sean capaces de degradar los diferentes compuestos del suero de leche.

9. LITERATURA CITADA

ALMEIDA., K.; BONASSI., I.; ROÇA., R. Características Físicas e Químicas de Bebidas Lácteas Fermentadas e Preparadas com Soro de Queijo Minas Frescal. En: Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 21(2): 187-192, maio-ago. 2001.

AMORES., R.; CALVO., A.; MAESTRE., J.; MARTINEZ., D. Probióticos. En: Revista Española de Quimioterapia. Vol. 17 (No.2) (2004); p. 131-139.

ANZALDUA-MORALES. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial ACRIBIA, S.A., España. 1994.

ATLAS, R.M. BARTHA, R. Ecología Microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Educación, S.A., Madrid, 2002.

BERRY., A. FRANCO., C. ZHANG., W. MIDDELBERG., A. Growth and Lactic Acid Production in Batch Culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a Defined Medium. En: Biotechnology Letters. Vol. 21, (1999); p. 163–167.

BERTERRECHE., J. Aspectos Nutraceúticos y Funcionales en Productos Lácteos. Aula de Productos Lácteos. Arte Perú. 2005.

CARRILLO, J. Tratamiento y Reutilización del Suero de Leche". Revista Conversus, No. 10. Abril 2002. IPN. México

CENTRO DE PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA DE NICARAGUA, CPMLN. Estudio de pre-factibilidad para la instalación de una planta procesadora de bebidas para infantes a base de lactosuero. Junio del 2004.

DUBOIS, M; GILLES,K; HAMILTON, P; REBERS, A & SMITH, F. Colorimetric Method of Determination of Sugars and Related Substances. Division of Biochemistry, University of Minesota, St, paul Min. 1954

ERTOLA R.; YANTORNO O y MIGNONE C. Monografía de Microbiología Industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Capítulos 1, 2, 4, 5 y 10. 2005.

ESTELA W; RYCHERA M; MELZOCH K; QUILLAMA E & EGOAVIL E. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. Rev. peru. biol. 14(2): 271-275 , 2007. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM

FULLER., R.. Probiotics in Man and Animals. A Review. En: The Journal of Applied Bacteriology. Vol. 66, (1989); p. 365–371.

GIRAFFA., G. Studying the Dynamics of Microbial Populations During Food Fermentation. En: FEMS Microbiology Reviews. Vol. 28, (2004); p. 251–260.

GONÇALVES., L. RAMOS., A. ALMEIDA., J. XAVIER Á. CARRONDO., M. Elucidation of the Mechanism of Lactic Acid Growth Inhibition and Production in Batch Cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. En: Applied Microbiology Biotechnology. Vol. 48, (1997); p. 346-350.

GONZALEZ., M. B.; GOMEZ, T. Manual Probióticos. En: Resdyn. Vol. 2, No. 3 (jul - sep. 2001).

GUERRERO F. M., GUZMAN S., YANDAR. N. Capacidad inhibitoria de un sustrato fermentado con *L. acidophilus* aislado de tracto intestinal humano, sobre el enteropatógeno *Vibrio cholerae* 01 Ogawa, in vitro. Tesis de Biología. Universidad de Nariño. 2002

GUYOT., J. CALDERON., M. MORLON., J. Effect of pH Control on Lactic Acid Fermentation of Starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. En: Journal of Applied Microbiology. Vol. 88, (2000); p. 176–182

HEKMAT.,S.; REID., G. Survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in Milk. En: International Journal of Food Science and Technology. Vol. 42, (2007); p. 615–619.

HOSONO, A.; OTANI, H.; YASUI, H and WATANUKI, M. Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. En: Animal Science Journal. Vol. 73 (2002); p. 241–256

INDA., A. Libro de Quesería Industrial. Organización de estados Americanos OEA. 2000.

JELEN., P.; Le MAGUER., M. Feasibility Evaluation of Cheese Whey Processing in Small Plants. En: Journal of Dairy Science. Vol. 59, No. 7, (1976); p. 1342 – 1352.

KOLARS, M.; SAVAIANO,K. Mundo Alimentario Mayo/Junio 2006.

KUNJI, E.; MIERAU, I.; HÖGTIN, A.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. En: Antonie van Leeuwenhoek. Vol. 70 (1996); p.187–221.

LANANNE, A. CARSEN, A. LORENZO, D. PERDOMO, A. Proyecto piloto de producción más limpia y reducción de la contaminación por efluentes industriales Desarrollo de casos demostrativos en Uruguay. Freplata, 2005.

MADIGAN., M. et al. Biología de los Microorganismos. Madrid, España. Prentice Hall Iberia. 1999. P. 718-722.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL, Y ANDI. Guía Ambiental de la Industria Láctea. (2007); p. 17.

MONTES C., A.; SANTACRUZ B., A.; SAÑUDO D., J. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* Sobre el Crecimiento de un Aislado de *Helicobacter pylori*. Tesis de grado. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Biología. 2003.

OLIVEIRA, M.; SODINI,I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. En: International Dairy Journal. Vol. 11 (2001); p. 935–942

OLMOS-DICHARA, O.; AMPE, F.; URIBELARREA, J.; PAREILLEUX, A.; and GOMA, G. Growth and Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in Batch and Membrane Bioreactor: Influence of Yeast Extract and Tryptone Enrichment. En: Biotechnology Letters. Vol 19, (1997), No 8; p. 709–714

ØSTLIE, H.; TREIMO, J.; NARVHUS, J. Effect of temperature on growth and Metabolism of probiotic bacteria in milk. En: International Dairy Journal. Vol. 15 (2005); p. 989–997

PAZOS, M. Alvaro Jairo. Protección Intestinal contra patógenos específicos a través de Sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. Santiago de Cali, 2000, Tesis (Magister en Microbiología). Universidad del Valle. Departamento de Microbiología.

PIVARNIK., L.; SENEAL., A.; RAND., A. Hydrolytic and transgalactosylic activities of commercial -galactosidase (lactase) in food processing". En: Advances Food Nutrition. Vol. 38 (1995); p.1-1021.

REID., G. The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 65 (1999); p. 3763–3766.

ROLFE RD. The Role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. Journal of nutrition, 2000 Feb;130(2S Suppl):396S-402S

ROSA, M. PERALTA, J. GILLI, D. BOSCO M. Cinética de la Biodegradación de un Efluente Lácteo. Aplicación de Técnicas de Análisis de Datos para la Comparación de Modelos. En: Información Tecnológica Vol. - 19 N°4 - 2008 11

ROSS., R.; DESMOND., C.; FITZGERALD., G and STANTON., C. A Review: Overcoming the Technological Hurdles in the Development of Probiotic Foods. En: Journal of Applied Microbiology. Vol. 98 (2005); p. 1410–1417.

ROY,D;GOULET,J;LEY DU,A; Continuous Production of Lactic Acid from Whey Permeate by Free and Calcium Alginate Entrapped *Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Science Vol. 70, No. 3, 1987

RUALES G., B.; VALLEJO C., V. Producción de Biomasa de *Lactobacillus casei ssp rhamnosus* Empleando Diferentes Tipos de Sustrato. Tesis de grado. Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. 2007.

SANCHEZ N; RAMIREZ, D; ZAPATA, A. Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato. Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica. ISSN 0121-4004 Volumen 14 número 2, año 2007. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 27-34

SERRATO J; CAICEDO L: Efecto de la concentración del material inerte en un biocatalizador de alginato de calcio en células inmovilizadas sobre la fermentación láctica. Revista de ingeniería e investigaciones (58). Vol. 25 No 2 Agosto de 2005 78-82

SHAH, N.P.; Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. En: Journal of Dairy Science. vol. 83 (2000); p. 894–907.

SILVEIRA R.; MONEREO M., S.; MOLINA B., B. Alimentos Funcionales y Nutrición Óptima ¿Cerca o Lejos? En: Revista Española de Salud Pública. Vol. 77 (2003); p. 317-331.

VARGAS E., GOMEZ C.; PARRA M.; ROMERO M. Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (primera parte). Universidad de Los Andes. Facultad de Ingeniería. P. 166 – 176. 2006.

VASALA., A.; PANULA., J.; NEUBAUER., P. Efficient Lactic Acid Production From High Salt Containing Dairy by-products by *Lactobacillus salivarius ssp. salicinus* with Pre-treatment by Proteolytic Microorganisms. En: Journal of Biotechnolog. Vol. 117 (2005); p. 421–431.

WILLETT., H.P. Microbiología: Metabolismo Energético. 18ed. Buenos Aires, Argentina. (1989); p. 54-58.

ZALL., R.R. Trends in whey fractionation and utilization: a global perspective. En:Journal Dairy Science. Vol. 67 (1984); p. 2621-2628.

ZIARNO., M. The Influence of Cholesterol and Biomass Concentration on the Uptake of Cholesterol by *lactobacillus* From MRS Broth. En: Acta Scientific Polonia., Technol. Aliment. Vol. 6 (2) (2007); p. 29-40

ANEXOS

Anexo A. Método de Recuento en Placa.

Fundamento: Suministra información de las células viables y su comportamiento en el tiempo, expresado en número de UFC/ml de fermento láctico.

Medios:

- Agua de peptona al 0,1%
- Agar MRS comercial

Procedimiento:

- Diluir 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0.1% y realizar una serie de diluciones decimales, empezando de la dilución 10^{-1} a 10^{-6} en los tiempos 0, 1, 2; de la dilución 10^{-1} a 10^{-7} en los tiempos 3,4; de la dilución 10^{-1} a 10^{-8} en los tiempos 5,6; de la dilución 10^{-1} a 10^{-9} en los tiempos 7,8; de la dilución 10^{-1} a 10^{-10} en los tiempos 9, 12.

- Se siembran las tres últimas diluciones de cada tiempo en cajas de petri con agar MRS comercial (Merck). Se siembran por duplicado y en superficie con 0.1 ml de las diferentes diluciones. Para lograr una mejor homogeneización se realiza un extendido con rastrillo de vidrio en forma radial y circular paralelamente teniendo en cuenta de retirar todas las perlas cada vez que se siembra el inóculo de cada dilución. Se lleva a incubación por 24 horas a 37 °C.

- Se toman en cuenta los cultivos con diluciones que presenten entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC). Se hace un promedio, se multiplica por la dilución y por 10 para reportar el volumen por ml del fermento láctico.

Anexo B. Determinación de Consumo de Azúcares Totales. Método de Antrona o Dubois.

Fundamento: La reacción de Antrona constituye la base de un método conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexourónicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La solución azul-verdosa muestra una absorción máxima a 625 nm.

Reactivos:

- Antrona
- Acido sulfúrico 10% y 96%
- Glucosa grado reactivo

La vidriería para las dosificaciones como para las diluciones deben estar previamente lavadas con H₂SO₄ al 10%, se dejan en remojo los tubos con el mismo ácido por 24 horas, luego se desocupan y se dejan invertidos para su secado por lo menos 3 horas.

Curva Estándar:

Preparación del reactivo de Antrona: Se debe disolver 200 mg de Antrona en 100 ml de H₂SO₄ al 96%.

Conservar en el erlenmeyer de 200ml cubierto con papel aluminio. Antes de agregar la Antrona se coloca un magneto y se lleva a agitación por 5 minutos.

Solución Madre: Se disuelven 0.1 g de glucosa en un balón volumétrico de 200ml, hasta completar su volumen con agua destilada y estéril. De esta solución se toman 10 ml y se completa hasta 100 ml en un balón volumétrico (100 ml).

Dilución Patrón: Se establece una curva estándar de 0 a 50 mg/L. Después de efectuar una dilución de 1/10 de la solución madre (50mg/L), depositar en una serie de tubos 0-0.25 - 0.50 - 0.75 -1.0 -1.25-1.50-1.75 -2.0 -2.5 ml de la solución madre y completar a 2.5 ml con agua destilada.

El procedimiento a realizar se describe a continuación:

Tanto la curva estándar como las muestras a dosificar sufren el mismo tratamiento, más la dosificación de azúcares totales es realizada sobre 2.5 ml de muestra convenientemente diluida conservados en baño de hielo.

Para las muestras de azúcares se hacen diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , en agua destilada, filtrada y estéril para correr D.O. (La densidad óptica debe estar entre 0 y 1, si se pasa se debe diluir).

El blanco se prepara con 2.5 ml de agua destilada más 5 ml del reactivo de Antrona.

Al agregar la Antrona no debe haber mucha variación de tiempo.

- Con un agitador de tubos mezclar hasta homogenizar la solución.
 - Llevar a ebullición durante 10 minutos.
 - Enfriar dentro de un baño de hielo, esperar 5 minutos y llevar al agitador de tubos.
 - Agitar y aflojar las tapas de los tubos (sin destaparlos), esperar 5 minutos para eliminar las burbujas de aire.
- Leer a 625 nm contra blanco.

Anexo C. Determinación de Proteínas totales. Método de Lowry Modificado.

Fundamento: Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo color azul, (debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína). La intensidad del color depende del número de aminoácidos presentes y

enlaces peptídicos y cambiará según la clase de proteína; la solución azul muestra una absorbancia máxima a 750 nm . Rango de linealidad entre 0-300 mg/L.

Reactivos:

Solución A: Diluir 0.5 g de tartrato de sodio y potasio, 25 g de carbonato de sodio, 125 ml de hidróxido de sodio 1 N en 125 ml de agua destilada.

Solución B: Diluir 2 g de tartrato de sodio y potasio, 1 g de sulfato de cobre en 10 ml de hidróxido de sodio 1 N.

Solución C: Preparar una solución de agua destilada y reactivo de Folin-Ciocalteu en proporción 14:1 (Preparar al momento de usar).

Solución estándar de Seroalbúmina bovina: Disolver 15 mg en 50 ml de agua destilada, el resto se almacena en congelador (Concentración final 300 mg/L).

Curva Estándar

Establecer una curva estándar de 0 a 300 mg/L. Dentro de una serie de tubos de ensayo o balones aforados de 0-1-2-4-7-5-8 y 10 ml de solución de seroalbúmina bovina y completar a 10 ml con agua destilada.

Procedimiento

- Ajustar 1 ml de patrones de la curva estándar y muestras por duplicado.
- Adicionar 0.5 ml de NaOH 2 N a todos los tubos.
- Colocar en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos.
- Reposar en baño de agua fría.
- Adicionar 0.5 ml de H₂SO₄ 2.6 N.
- Adicionar 0.9 ml de solución A.
- Llevar por 10 minutos a baño María a 50° C.
- Reposar en baño de agua fría.
- Adicionar 0.1 ml de solución B.
- Colocar por 10 minutos en la oscuridad.
- Preparar la solución C y adicionar 3 ml:

Reactivo de Folin-Ciocalteu para 50 ml en balón aforado:

14 ml	1 ml Reactivo
50 ml	X

$50/14 = 3.57$ ml de reactivo de Folin-Ciocalteu

- Llevar 10 minutos a baño María a 50°C.
- Reposar en baño de agua fría.
- Leer absorbancia a 750nm y a tras lu

Anexo D. Determinación de producción de ácido láctico.

Reactivos:

- NaOH en escamas
- Agua destilada y desionizada.

Procedimiento:

Preparar una solución de 1000ml de NaOH 0,1N pesando 4 g de NaOH en escamas en un balón aforado de 1000ml y completar con el agua destilada hasta aforar. Invertir el balón aforado varias veces hasta que se disuelva el NaOH completamente.

Realizar la prueba de acidez titulable de la siguiente manera: Llenar la bureta con la solución de NaOH 0,1N. En un vaso de fondo blanco poner 9ml de la muestra y adicionarle de 3 a 5 gotas de una solución alcohólica de fenolftaleína al 1%, agita e inmediatamente deja caer gota a gota la solución de hidróxido, mientras continúa agitando el vaso. Cuando el color de la muestra cambia a rosado tenue y este color permanece durante unos pocos segundos es momento de detener el goteo. La cantidad en porcentaje de ácido láctico producido se calcula con la siguiente fórmula:

% Acido láctico= $\frac{\text{ml gastados} \times \text{normalidad de NaOH} \times \text{masa molar ácido láctico}}{\text{Cantidad de muestra en ml} \times 10}$

$$\text{Acido láctico (g/L)} = \left(\frac{V1 \times N}{V2} \right) \times K \times 1000$$

V1= ml gastados

V2= cantidad de muestra en ml

K= peso equivalente del ácido láctico (0,045g/meq)

N= normalidad del NaOH (0,1 meq/ml)

El tiempo de cosecha se determina al encontrarse la mayor producción de proteínas, formación de biomasa y cuando el crecimiento exponencial comience a detenerse.

Anexo E. Determinación de pH

Fundamento: Se basa en que el electrodo del pHmetro contiene una disolución ácida encerrada en una membrana de vidrio especial que permite la migración de los iones H_3O^+ . Si la disolución desconocida tiene un pH diferente a la disolución dentro del electrodo, se establece una diferencia de potencial, la cual se registra en la escala de pH que presenta el equipo.

Procedimiento:

Tomar 5ml de muestra a evaluar y depositarlos en un beaker de 25ml, introducir el electrodo del pHmetro en la muestra, esperar a que el equipo realice la medición, leer el resultado presentado en la pantalla del equipo. Después de realizar la medición y antes de realizar la siguiente, se debe lavar el electrodo con agua destilada.

Anexo F. Determinación de Demanda Bioquímica de Oxígeno

Fundamento: La D.B.O. representa la cantidad de oxígeno consumido por los gérmenes aerobios para asegurar la descomposición dentro de condiciones bien especificadas de las materias orgánicas contenidas en el agua a analizar. El fundamento del método, consiste en medir la cantidad de O₂ disuelto en un medio de incubación al comienzo y al final de un período de 5 días, durante el cual la muestra es mantenida al abrigo del aire, a 20° C, y en la oscuridad para inhibir la eventual formación de O₂ por las algas.

Materiales:

1. Frascos para incubar las muestras: Se aconseja de una capacidad de 250 ml. aproximadamente, forma cilíndrica de aproximadamente un diámetro externo de 6,5 cm. con tapón esmerilado y cierre hidráulico, para evitar la entrada de aire durante la incubación.

2. Estufa de aire: Con temperatura constante a 20°C.

3. Soluciones

3.1. Agua de dilución: Con las siguientes características.

- Su D.B.O. 5 no debe ser mayor de 0,2 mg/l.
- Su O.D. debe ser a saturación (teóricamente 9,17 mgs/l.) prácticamente entre 8 y 9 mgs/l.
- Su Temperatura, aproximadamente 20° C.
- No debe contener nitritos, ni hierro, ni cobre, ni otras sustancias que inhiban el crecimiento biológico, como cloro, por ej.
- Su PH, como el contenido en sales minerales, debe ser el óptimo para el desarrollo biológico.

Se prepara a partir de agua bidestilada sobre vidrio, saturándola de oxígeno y haciendo burbujear en su interior una corriente de aire purificada. Se conserva a 20° C en la estufa de aire (3.1.2.), practicándose la determinación del O.D. antes de usarla, y se le agregan los elementos nutritivos, agitando suavemente y evitando su aireación.

3.2.2. Solución Reguladora de fosfatos:

El grs. de $\text{P O}_4 \text{ H}_2 \text{ K}$, en 500 ml. de H_2O bidestilada, agregar Na OH N hasta obtener un pH de 7,2. (aproximadamente 175 ml. de solución N de NaOH . Cuando se ha ajustado el pH, se agregan 1,5 grs. de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ y se lleva a 1 litro.

3.2.3. Solución 0,1 M de Cloruro de calcio:
18,3 grs. de $\text{Cl}_2 \text{ Ca. } 4\text{H}_2\text{O}$, en 1 litro de agua bidestilada.

3.2.4. Solución 0,04 M de $\text{SO}_4 \text{ Mg}$:
9,9 grs. de $\text{SO}_4 \text{ Mg. } 7 \text{ H}_2 \text{ O}$, en 1 litro de agua bidestilada.

3.2.5. Solución 0,001 M. de Cloruro férrico:
0,27 grs. de $\text{Cl}_3 \text{ Fe. } 6 \text{ H}_2\text{O}$, en 1 litro de agua bidestilada.

Con estas soluciones se prepara el agua de dilución (3.2.1.), en la siguiente proporción:

(3.2.2.) Solución reguladora de fosfatos	1,25 ml.
(3.2.3.) Solución de $\text{Cl}_2 \text{ Ca. } 0,1 \text{ M}$	2,50 ml.
(3.2.4.) Solución de $\text{SO}_4 \text{ Mg. } 0,04 \text{ N}$	2,50 ml.
(3.2.5.) Solución de $\text{Cl}_3 \text{ Fe. } 0,001 \text{ N}$	0,50 ml.
(3.2.1.) H_2O de dilución	1000,00 ml.

3.3. Tratamiento previo a la muestra.

La muestra en que habrá de efectuarse la D.B.O., debe ser sometida previamente a un tratamiento para reducir al máximo las posibilidades de error que, en este método, son comunes.

3.3.1. Ajuste del pH:

El pH tiene una marcada importancia en el desarrollo biológico, tanto si éste es muy bajo o en cambio, sus valores son altos. Si el pH es inferior a 5,5, debe agregarse $\text{CO}_3 \text{ Na}_2$ 0,2 M hasta viraje del azul de bromotimol. Si el pH es mayor a 8,5, se debe agregar HC_1 0,2 M hasta viraje del rojo de cresol. Es conveniente realizar la corrección en una alícuota de la muestra y luego corregir la misma sin uso del indicador (Cuando la dilución que se va a utilizar es muy grande, la acción reguladora del agua de dilución puede hacer innecesario el ajuste del pH).

3.3.2. Siembra:

Todo el éxito de la determinación está señalado en la presencia de bacterias y de plancton.

Debe entonces realizarse una siembra, la que puede efectuarse empleando líquido cloacal, agua de río o de canal, en el agua de dilución (3.2.1.).

3.4. Dilución:

Si el grado de contaminación es muy grande, el consumo de O_2 será superior a la máxima a la máxima capacidad de saturación, que como hemos dicho es de 9,17 mgs/1, de modo que es necesario efectuar diluciones, que pueden ser variables, y que según el "Standard Methods" aconseja:

- Líquidos residuales industriales conc.: 0,1 - 1 %
- Líquido cloacal "bruto" o sedimentado: 1 - 5 %
- Efluentes oxidados: 5 - 25%
- Aguas de ríos contaminadas: 25 - 100%

La naturaleza compleja y variable de estos líquidos, impide aplicar en forma estricta los valores anterior. Cuando se carece de experiencia o se trabaja con muestras desconocidas, el método más seguro consiste en efectuar varias diluciones que cubran una amplia escala de valores de D.B.O. Personalmente creo en los mejores resultados efectuando previamente una D.Q.O., para orientarse dentro de qué valor oscila el contenido de materia orgánica.

Técnica de la dilución:

Se prepara una solución Stock, con la que se llenan los frascos para la incubación. Ejemplificaremos una dilución al 10%.

Tomamos una probeta graduada de 1 litro de capacidad, a la que llenamos parcialmente con agua de dilución (3.2.1.) ya sembrada con la pileta sumergida en ésta, se dejan caer 100 ml. de muestra, subiendo y bajando la pipeta para una buena homogenización. Se completa a 1 litro con el agua de dilución. No agitar. Mezclar bien con un agitador en forma de émbolo. Esta se hace subir y bajar dentro del líquido cuidando que al ascender no sobrepase la superficie del mismo, y arrastre burbujas de aire. Con esta dilución, se procede a llenar frascos de incubación, 1 ó más, si se desea efectuar la determinación por duplicado o triplicado. Debe reservarse 1 muestra para determinar, en forma inmediata, el valor del O.D., llamado en esta oportunidad Oxígeno Disuelto inicial (O.D.i.). Las muestras deben incubarse durante 5 días a 20° C y al abrigo de la luz. La incubación debe efectuarse en la estufa de aire provista de termostatos (3.1.2.)

Como el agua de dilución consume oxígeno mientras dura la incubación (D.B.O.), se hace necesario incubar un frasco con agua de dilución provista de la solución reguladora de fosfatos, medios nutritivos, pero sin la siembra de gérmenes.

Mecanismo de los cálculos.

La D.B.O., así designada corrientemente, implica la medida de la Demanda de Oxígeno de la muestra que ha sufrido un incubado en el período de 5 días, en estufa de aire a temperatura constante de 20° C y mantenida en la oscuridad. Se expresa en mgs. de oxígeno por litro de muestra.

Para realizar los cálculos, es necesario determinar O.D. a = mgs/ l. de Oxígeno Disuelto en la muestra diluída después de la incubación.

d = porcentaje de la muestra (en volumen) que contiene la dilución.

$$D.B.O.5 \text{ (mgs/l.)} = \left(O.D. a \frac{100 - d}{100} - O.D. f \right) \frac{100}{d}$$

resolviendo:

$$D.B.O.5 \text{ (mgs/l.)} = O.D. \cdot a \frac{100 - d}{d} - O.D.f \frac{100}{d}$$

Anexo G. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (D.Q.O.)

Fundamento:

La muestra se somete a un calentamiento con reflujo en presencia ácido sulfúrico y una cantidad conocida de dicromato potásico. El exceso de dicromato se valora con sal ferrosa. La cantidad de materia oxidable es proporcional al dicromato potásico consumido. La interferencia de los cloruros se evita con la adición de sulfato mercúrico.

Toma de muestra y preservación:

Tomar 100 ml de muestra en un recipiente de vidrio. Añadir a continuación 0,1-0,2 ml de H₂SO₄ concentrado. Realizar la determinación dentro de las 24 horas siguientes. Conservar en frigorífico. Antes de realizar la determinación, dejar decantar y tomar la muestra para la misma en la zona central del recipiente.

Reactivos:

Solución de sulfato de plata. Disolver 6,6 g de Ag₂SO₄ cristalizado en H₂SO₄ (concentrado) hasta enrasar a 1 litro.

Solución de hierro (II) 0,025N. Disolver 9,8 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O en 20 ml

de H₂SO₄ concentrado y diluir a 1 litro con agua destilada.

Solución de dicromato potásico 0,025N. Disolver 1,2259 g de K₂Cr₂O₇, previamente desecado a 110 °C, en agua destilada y enrasar a 1 litro.

Solución de ferroína. Disolver 1,485 g de 1,10-fenantrolina monohidratada y 0,695

g de FeSO₄ · 7H₂O en agua destilada y diluir hasta 100 ml.

Sulfato mercúrico sólido.

Material:

Material de vidrio tratado con permanganato potásico y ácido sulfúrico, y posteriormente con agua destilada hasta eliminación total de la acidez. Engrasar los esmerilados del refrigerante y matraz con 1 ó 2 gotas de ácido sulfúrico.

Valoración de la solución de hierro (II)

Introducir 25 ml exactamente medidos, de solución de $K_2Cr_2O_7$ 0,025N en un matraz erlenmeyer de 500 ml, y diluir con agua destilada hasta 100 ml.

Añadir 75 ml de H_2SO_4 ($d = 1.84$) y dejar enfriar.

Añadir 5-6 gotas de solución de ferroína.

Valorar con la solución 0,025N de Fe (II) hasta viraje del indicador a rojo violáceo.

Calcular la normalidad exacta de la solución:

Determinación de la D.Q.O.

Pipetear 50 ml de muestra, o una alícuota convenientemente diluida de la misma, en un matraz erlenmeyer de 500 ml.

Añadir 1 g de sulfato mercúrico y 5 ml de solución de sulfato de plata. Calentar, si es necesario, hasta disolución.

Añadir 25 ml de solución de dicromato potásico 0,025N y después 70 ml de solución de sulfato de plata, lentamente y con agitación.

Calentar a ebullición durante dos horas bajo refrigerante a reflujo adaptado al matraz.

Dejar enfriar y valorar con la solución de hierro (II) 0,025N, utilizando ferroína como indicador (5-6 gotas).

Realizar paralelamente una determinación blanco tomando 50 ml de agua destilada y realizando las mismas operaciones que para la muestra.

Calcular la D.Q.O., en mg de oxígeno por litro, de la siguiente manera:

Siendo:

V_0 = volumen de Fe (II) gastado para el blanco.

V_m = volumen de Fe (II) gastado para la muestra.

N = normalidad de la solución de Fe (II).

V = volumen de muestra (50 ml).