

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional Ingeniería Biotechnológica



**“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL ENCAPSULAMIENTO DE
CEPAS HOMOFERMENTATIVAS EN LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO
LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO”**

Tesis presentada por el Bachiller:

Tala Orrillo, Nicole Anabel

Para optar el Título Profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor (a):

Mg. Barreda Del Carpio, Jaime

Arequipa- Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 24 de Marzo del 2023

Dictamen: 003884-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 003884, presentado por:

2014220852 - TALA ORRILLO NICOLE ANABEL

Titulado:

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL ENCAPSULAMIENTO DE CEPAS HOMOFERMENTATIVAS
EN LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**2346 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**3135 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA
DICTAMINADOR**



**3320 - ALVARADO QUIROZ KENY DAVI
DICTAMINADOR**



DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada en primer lugar a Dios y a mis padres, por ser mi soporte, ejemplo a seguir y mi principal motivo de superación, pues con su apoyo, confianza y amor incondicional, me brindaron la fuerza necesaria para lograr todos mis objetivos.

A mi hermano Sebastián por ser un pilar fundamental de mi vida, por sus consejos y palabras de aliento.

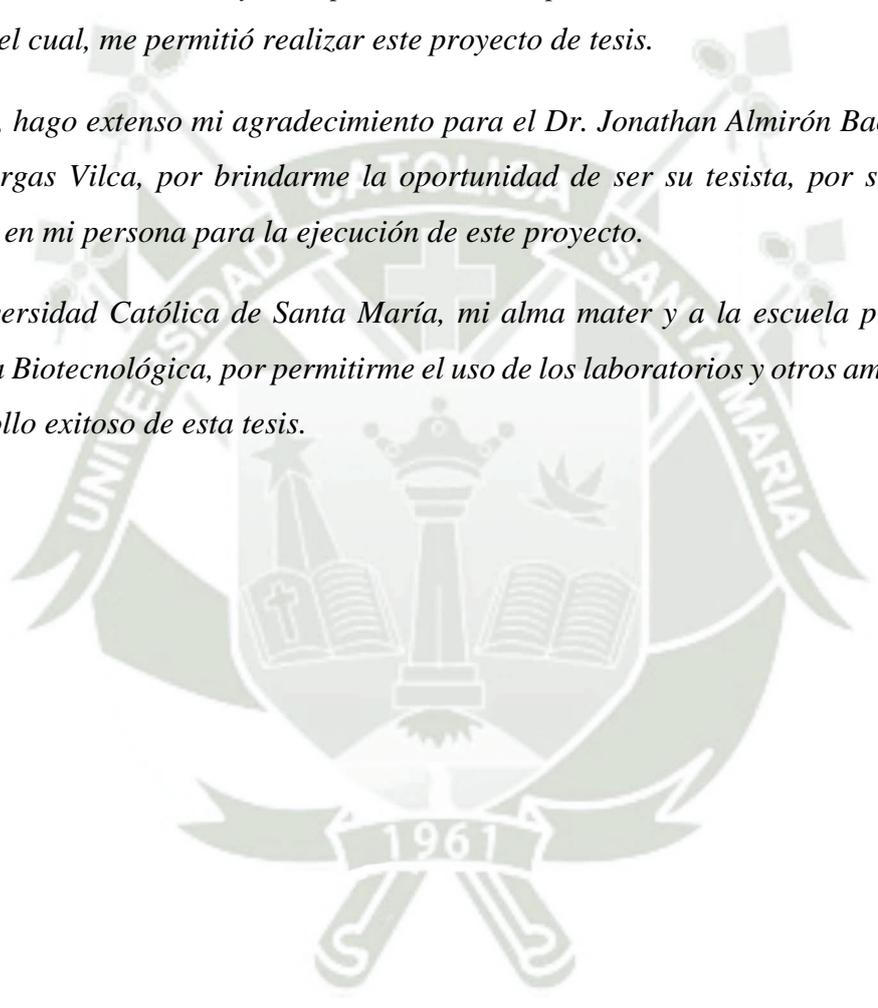
A mis abuelos, personas invaluable que significan todo para mí, y aunque algunos ya no estén a nuestro lado físicamente, los momentos vividos, sus enseñanzas, amor sin límites y comprensión perdurarán eternamente en mi mente y en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Mi completo agradecimiento al Vicerrectorado de investigación de la Universidad Católica de Santa María que brindó el financiamiento para el desarrollo del Proyecto con Resolución N°26617-R-2019 “Síntesis y efectos de las cepas homofermentativas utilizadas en la obtención del ácido láctico y su repercusión en la polimerización del ácido poliláctico”, mediante el cual, me permitió realizar este proyecto de tesis.

Asimismo, hago extenso mi agradecimiento para el Dr. Jonathan Almirón Baca y a la Mg. María Vargas Vilca, por brindarme la oportunidad de ser su tesista, por su mentoría y confianza en mi persona para la ejecución de este proyecto.

A la Universidad Católica de Santa María, mi alma mater y a la escuela profesional de Ingeniería Biotecnológica, por permitirme el uso de los laboratorios y otros ambientes, para el desarrollo exitoso de esta tesis.



RESUMEN

El lactosuero es el residuo de la industria quesera que si es vertido sin un tratamiento adecuado tiene un elevado valor de DBO siendo 1000 L de lactosuero equivalente a las aguas residuales producidas por 450 personas/día. Asimismo, considerando que casi el 90% del volumen de la leche es lactosuero, cuya composición principal es lactosa (45–50 g/L), proteínas (6–8 g/L), lípidos (4–5 g/l) y sales minerales (4–6 g/l) este podría ser reutilizado. Entre los usos que se le pueda dar, debido a su alta composición de lactosa, es como materia prima para la producción de ácido láctico, lo cual permitiría darle un valor agregado al lactosuero. El ácido láctico es un ácido orgánico que se obtiene de forma natural y que tiene múltiples usos en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y química y actualmente se viene usando como materia prima para la producción de ácido poliláctico (PLA) que es un biopolímero que lo convierte en una alternativa prometedora para la sustitución de los plásticos que derivan de petroquímicos. La producción de ácido láctico a partir de fermentaciones biológicas se realiza usando bacterias ácido lácticas (BAL) como las del género *Enterococcus* y *Lactobacillus* que según la especie pueden generar una configuración láctica D (-), L (+) o DL. Es así como, en la presente tesis se ha aislado cepas pertenecientes al *Enterococcus faecalis*, se determinó sus condiciones óptimas de crecimiento y se obtuvo ácido láctico en fermentaciones batch con lactosuero desproteínizado y sin desproteínizar, con las cepas sin y encapsuladas en perlas de alginato al 4% y 5% de cloruro de calcio. Además, se determinó las condiciones óptimas de purificación del ácido láctico. Se encontró que hay una variación entre las características físicas (densidad) y químicas (espectros de FTIR) del ácido láctico obtenido, así como en su rendimiento siendo el mayor rendimiento usando el lactosuero desproteínizado y cepas sin activar. Se determinó que el *Enterococcus faecalis* en fermentación batch con la cepa sin

activar y sin ser encapsulada, en lactosuero desproteínizado y purificado a 40°C por 1 hora (concentración de ácido láctico) obtuvo el mayor rendimiento de 16.92%, seguida de la cepa encapsulada al 5% de CaCl₂, fermentada en lactosuero desproteínizado y purificado a 45°C por 5 h para la concentración de ácido láctico con un rendimiento de purificación 8.33%.

Palabras claves: *Lactosuero, ácido láctico, Enterococcus faecalis.*



ABSTRACT

Whey is the residue from cheese industry that, if it is discharged without any treatment has a high BOD value, with 1000 L of whey being equivalent to the wastewater produced by 450 people/day. Likewise, considering that almost 90% of the volume of milk is whey whose main composition is lactose (45–50 g/L), proteins (6–8 g/L), lipids (4–5 g/L) and salts minerals (4–6 g/l) this could be reused. Among the uses that can be given to it, due to its high lactose composition, it could be used as a raw material for the production of lactic acid, which could give added value to the whey. Lactic acid is an organic acid that is obtained naturally and has multiple uses in the food, cosmetic, pharmaceutical and chemical industries and is currently being used as a raw material for the production of polylactic acid (PLA) which is a biopolymer that makes it a promising alternative to replace plastics derived from petrochemicals. The production of lactic acid from biological fermentations is carried out using lactic acid bacteria (LAB) such as those of the genus *Enterococcus* and *Lactobacillus* that, depending on the species, can generate a lactic D(-), L(+) or DL configuration. Thus, in this thesis, strains belonging to *Enterococcus faecalis* have been isolated, their optimum growth conditions were determined and lactic acid was obtained in batch fermentations with deproteinized and non-deproteinized whey, with the strains without and encapsulated in alginate beads at 4 % and 5% calcium chloride. In addition, the optimal purification conditions for lactic acid were determined. It was found that there is a variation between the physical (density) and chemical (FTIR spectra) characteristics of the lactic acid obtained, as well as in its performance, with the highest yield using the deproteinized whey and inactivated strains. It was determined that the *Enterococcus faecalis* in batch fermentation with the inactivated strain and without being encapsulated, in deproteinized whey and purified at 40°C for 1 hour (lactic acid concentration) obtained the highest yield of 16.92%,

followed by the encapsulated strain at 5% Cl_2Ca , fermented in deproteinized whey and purified at 45°C for 5 h for the concentration of lactic acid with a purification yield of 8.33%.

Keywords: *Whey, lactic acid, Enterococcus faecalis.*



ÍNDICE

<i>DEDICATORIA</i>	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
VARIABLES INDEPENDIENTES	4
VARIABLES DEPENDIENTES	4
OBJETIVOS	5
a. Objetivo general	5
b. Objetivos específicos	5
CAPÍTULO I	6
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1. LACTOSUERO	6
1.2. ÁCIDO LÁCTICO	8
1.3. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO	10
1.3.1. Factores que influyen en la fermentación microbiana	11
1.3.1.1. Temperatura de fermentación	11
1.3.1.2. pH	11
1.3.1.3. Sustrato	11
1.3.1.4. Modo de fermentación	12
1.4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	13
1.4.1. Clasificación de las BAL	13
1.4.2. Metabolismo de las BAL	14
1.4.2.1. BAL homofermentativas u homolácticas	14
1.4.2.2. BAL heterofermentativas o heterolácticas	14
1.4.3. Fermentación láctica	15
1.4.4. Características de las bacterias ácido lácticas	17
1.5. INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS	18
1.5.1. Técnicas de inmovilización	18
1.5.1.1. Extrusión	18

1.5.1.2.	Emulsificación	18
1.5.1.3.	Secado por aspersion	18
1.5.2.	Soportes para la inmovilización	19
1.6.	SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	19
1.6.1.	Formas de recuperación	19
CAPÍTULO II		22
2. MATERIALES Y MÉTODOS		22
2.1. MATERIALES E INSUMOS		22
2.1.1.	Muestras y/o unidades biológicas.	22
2.1.2.	Material de laboratorio.....	22
2.1.3.	Insumos y reactivos químicos.	22
2.1.4.	Equipos e instrumentación.	23
2.2. METODOLOGÍA.....		24
2.2.1.	Recolección de lactosuero	24
2.2.2.	Preparación del lactosuero	24
2.2.2.1.	Método 1 de desproteínización.....	24
2.2.2.2.	Método 2 de desproteínización.....	25
2.2.3.	Caracterización del lactosuero	25
2.2.4.	SELECCIÓN, ACTIVACIÓN Y ADAPTACIÓN DE CEPAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VARIABLES DE FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO 26	
2.2.4.1.	Aislamiento e identificación de cepas nativas	26
2.2.4.2.	Caracterización de cepas aisladas.....	27
2.2.4.2.1.	Caracterización microscópica.....	27
2.2.4.2.2.	Caracterización macroscópica	28
2.2.4.2.3.	Caracterización bioquímica	28
2.2.4.2.4.	Identificación molecular de las cepas	29
2.2.4.3.	Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas nativas 29	
2.2.4.4.	Curva de crecimiento.....	30
2.2.5.	FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	30
2.2.5.1.	Activación de las cepas nativas	30
2.2.5.2.	Fermentación batch con cepas libres	30

2.2.5.3.	Fermentación batch con cepas inmovilizadas en perlas de alginato	31
2.2.5.4.	Monitoreo de parámetros de la fermentación	34
2.2.5.4.1.	Caracterización del ácido láctico por análisis de Acidez (presencia de Ácido láctico).....	34
2.2.5.4.2.	Consumo de lactosa por medición de concentración de lactosa.....	35
2.2.5.4.3.	Medición de pH	35
2.2.5.4.4.	Monitoreo de crecimiento microbiano (UFC/ml): Técnica de aislamiento y recuento usando un banco de diluciones.....	35
2.2.6.	PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	36
2.2.7.	CARACTERIZACIÓN POR ENSAYO DE FTIR DEL ÁCIDO LÁCTICO PURIFICADO.....	38
CAPÍTULO III		39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		39
3.1.	CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO	39
3.2.	SELECCIÓN, ACTIVACIÓN Y ADAPTACIÓN DE CEPAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VARIABLES DE FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO	40
3.2.1.	Aislamiento e identificación de cepas	40
3.2.2.	Caracterización de cepas aisladas	40
3.2.3.	Identificación molecular de las cepas.....	42
3.2.4.	Condiciones óptimas de crecimiento.....	42
3.2.5.	Curvas de crecimiento de las cepas.....	45
3.3.	FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	46
3.3.1.	Fermentación batch con cepas libres.....	46
3.3.2.	Fermentación batch con cepas inmovilizadas	51
3.4.	PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	56
3.4.1.	Rendimiento obtenido en la purificación del ácido láctico	56
3.4.2.	Caracterización por ensayo de FTIR del ácido láctico purificado	58
CONCLUSIONES		63
RECOMENDACIONES		65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		66
ANEXOS.....		70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles usos del lactosuero artesanal según su tipo	7
Figura 2. Formas ópticas del ácido láctico (a) L-ácido láctico y (b) D-ácido láctico	9
Figura 3. Síntesis química y biotecnológica de ácido láctico	10
Figura 4. Metabolismo homofermentativa y heterofermentativa.....	15
Figura 5. Rutas metabólicas en la fermentación de glucosa por BAL	16
Figura 6. Equipo de agitador rotatorio con cámara de incubación para la fermentación del lactosuero (a) y rotavapor para la purificación de ácido láctico	24
Figura 7. Desproteínización de lactosuero por método 1	25
Figura 8. Desproteínización del lactosuero por método 2.....	25
Figura 9. Aislamiento de cepas	27
Figura 10. Coloración GRAM.....	28
Figura 11. Crecimiento a 15°C (a), 4°C (b) y (c) en la incubadora (29,32, 34, 35, 36, 37 y 45 °C).....	29
Figura 12. Crecimiento a pH 4 (a), pH 7 (b) y pH 9 (c).....	30
Figura 13. Medios de cultivo inoculadas con cepas activas y sin activar	31
Figura 14. Preparación de la solución de alginato de sodio	32
Figura 15. Inmovilización de cepas en perlas de alginato de sodio	33
Figura 16. Muestra antes de ser titulada (a) y después de ser titulada (b)	34
Figura 17. Medición de pH de las muestras	35
Figura 18. Purificación de ácido láctico.....	37
Figura 19. Lactosuero proteinizado o sin desproteínizar (a) y lactosuero desproteínizado (b)	39
Figura 20. Colonias iniciales (a) y colonias aisladas (b).....	40

Figura 21. Tinción GRAM de la cepa BI y observación en microscopio óptico a 100X (a) y prueba de catalasa negativa (b)	41
Figura 22. Fotos de las placas con la cepa sometida a distintas temperaturas	43
Figura 23. Fotos de las placas de la cepa sometida a distintas concentraciones de NaCl... 44	
Figura 24. Fotos de las placas de la cepa sometida a distintos pH.....	44
Figura 25. Curvas de crecimiento de la cepa Enterococcus faecalis a una temperatura de 32°C con medición de Densidad óptica (a) y densidad óptica normalizada (b)	45
Figura 26. Monitoreo de pH en la fermentación batch usando cepas libres previamente activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteínizado y sin desproteínizar	46
Figura 27. Monitoreo de ácido láctico en la fermentación batch usando cepas libres activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteínizado y sin desproteínizar	48
Figura 28. Monitoreo de consumo de lactosa versus producción de ácido láctico en la fermentación batch usando cepas libres activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteínizado y sin desproteínizar	49
Figura 29. Monitoreo de crecimiento microbiano en la fermentación batch usando cepas libres activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteínizado y sin desproteínizar	50
Figura 30. Monitoreo de pH en la fermentación batch usando cepas encapsuladas al 4% y 5% de CaCl ₂ en caldo sin desproteínizar (proteínizado) y desproteínizado	52
Figura 31. Monitoreo de ácido láctico en la fermentación batch usando cepas encapsuladas al 4% y 5% de CaCl ₂ en caldo sin desproteínizar (proteínizado) (a) y desproteínizado (b)53	
Figura 32. Monitoreo de consumo de lactosa versus producción de ácido láctico usando cepas encapsuladas al 4% y 5% de CaCl ₂ en caldo sin desproteínizar (proteínizado) (a) y desproteínizado (b).....	55

Figura 33. Rendimiento obtenido en la purificación del ácido láctico usando las dos condiciones de síntesis con mayor rendimiento (P3:desproteínizado sin activar y P7:desproteínizado al 5% CaCl₂) 57

Figura 34. Muestras de ácido láctico purificadas 57

Figura 35. Espectro de FTIR de muestras 1 (P3_60°C_45 Min) y 2 (P3_40°C_1 h) 59

Figura 36. Espectro de FTIR de muestras 7 (P7_45°C_5h) y 8 (P7_40°C_5h)..... 61



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de lactosuero dulce y ácido	6
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico	9
Tabla 3. Diferentes sustratos usados en la producción de ácido láctico	12
Tabla 4. Clasificación de las BAL	14
Tabla 5. Se muestra las ventajas y desventajas de métodos de recuperación	21
Tabla 6. Características macroscópicas	28
Tabla 7. Pruebas de fermentación de las cepas sin encapsular en batch (cepas libres)	31
Tabla 8. Pruebas de fermentación de las cepas inmovilizadas	32
Tabla 9. Distintas condiciones de temperatura y tiempo de concentración	36
Tabla 10. Muestras analizadas por FTIR	38
Tabla 11. Características fisicoquímicas del lactosuero	39
Tabla 12. Características de las cepas aisladas	41
Tabla 13. Crecimiento a distintas temperaturas, a concentraciones de salinidad y a pH....	42
Tabla 14. Rendimientos en la purificación de ácido láctico según las diferentes condiciones de concentración.....	56
Tabla 15. Rendimientos en la purificación de ácido láctico según las diferentes condiciones de concentración.....	59

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXOS N° 1. ANÁLISIS DE LACTOSUERO POR MÉTODO 1 Y 2	70
ANEXOS N° 2. ANÁLISIS SECUENCIAL POR PCR.....	77
ANEXOS N° 3. DATOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO	86
ANEXOS N° 4. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS SIN ACTIVAR EN CALDO DESPROTEINIZADO	87
ANEXOS N° 5. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS SIN ACTIVAR EN CALDO PROTEINIZADO.....	88
ANEXOS N° 6. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS ACTIVADAS EN CALDO DESPROTEINIZADO	89
ANEXOS N° 7. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS ACTIVADAS EN CALDO PROTEINIZADO.....	90
ANEXOS N° 8. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS ENCAPSULADAS A UN 4% Y 5% DE CaCl ₂ EN CALDO SIN DESPROTEINIZAR O PROTEINIZADO	91
ANEXOS N° 9. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS ENCAPSULADAS A UN 4% Y 5% DE CaCl ₂ EN CALDO DESPROTEINIZADO.....	93

INTRODUCCIÓN

La inadecuada disposición del lactosuero proveniente de la industria láctea por la elaboración de los quesos ocasiona una alta contaminación de los cuerpos acuíferos debido principalmente al contenido de lactosa, el cual lo convierte en una materia prima de alto interés para su aprovechamiento. Por lo que, el sector industrial lácteo es uno de los mayores factores perjudiciales del agua, donde se estima que el 55% es usado para la elaboración de otros productos alimenticios y el 45% son desechados en ríos, lagos y aguas residuales, o en el suelo, lo que ocasiona impactantes problemas de contaminación como la afectación de la estructura del suelo física y químicamente con una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas (1). Por otro lado, cuando este es desechado en el agua, produce una reducción de la vida acuática, al agotar el oxígeno disuelto (1). Asimismo, es importante precisar que el 90% de la leche usada en la elaboración del queso es desechada como lactosuero, el cual contiene lactosa, proteínas, lípidos y sales minerales (1). Por lo tanto, gracias al significativo contenido de lactosa en el lactosuero, este residuo se convierte en una materia prima de alto interés para la producción de ácido láctico.

El ácido láctico es un ácido orgánico que se obtiene de forma natural por extracción del azúcar de la leche o de forma sintética a partir de azúcar de caña, de uva o de almidón y que presenta una amplia gama de aplicaciones, utilizado especialmente en productos alimenticios, químicos, cosméticos y farmacéuticos siendo en Estados Unidos utilizado en un 85% en la industria alimentaria y el 15% para industrias no alimenticias (2). Hoy en día, se puede apreciar un aumento en la demanda de ácido láctico como materia prima para la producción del ácido poliláctico (PLA), el cual es un biopolímero con propiedades que lo clasifican como amigable para el medio ambiente. Es una alternativa biodegradable, biocompatible y prometedora en la sustitución de los plásticos que derivan de petroquímicos.

Actualmente, en nuestro país no hay muchas investigaciones en el aprovechamiento del lactosuero y es por ello, que se ha visto la síntesis de ácido láctico a partir de este residuo, a través de una tecnología amigable con el medio ambiente. A su vez, este ácido láctico puede ser utilizado para la obtención de plásticos. Para la síntesis de ácido láctico a través de la fermentación se usa a las bacterias ácido láctica (BAL) que

son *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* capaces de consumir el lactosuero para producir el ácido láctico como resultado de la fermentación de la lactosa. Entre las cepas de *Lactobacillus* se tiene al *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, entre otros y entre las del género *Enterococcus* se tiene a *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus lactis*, *Enterococcus camelliae*, entre otros. Según la especie usada de microorganismos se puede generar una configuración ácido láctico D (-), L (+) o DL.

Para la realización de fermentación se puede usar cepas en estado libre o cepas inmovilizadas en perlas de alginato. Las cepas inmovilizadas se ha visto que incrementan la viabilidad de las cepas, además que al estar encapsuladas solo se generaría en el medio de cultivo los productos de la fermentación y al momento de purificar ya no se tendría a las cepas microbianas, por lo que, el uso de cepas inmovilizadas facilitaría la purificación del ácido láctico.

Por lo tanto, en la presente investigación, se ha propuesto la obtención de ácido láctico a través de la fermentación batch de lactosuero con cepas nativas provenientes del mismo. Asimismo, no solo se buscó obtener ácido láctico sino evaluar la influencia del uso de las cepas nativas encapsuladas en perlas de alginato y de forma libre en la obtención del ácido láctico, tanto en sus características fisicoquímicas como en el rendimiento.

HIPÓTESIS

Dado que, las técnicas de inmovilización brindan una mayor estabilidad a las funciones cinéticas de los microorganismos, es probable mejorar la producción de ácido láctico mediante el encapsulamiento de las cepas nativas.



VARIABLES INDEPENDIENTES

Variables independientes	Indicadores
Tipo de lactosuero	<ul style="list-style-type: none"> • Lactosuero desproteínizado • Lactosuero proteínizado
Disposición de las cepas	<ul style="list-style-type: none"> • Cepas libres o sin encapsular • Cepas encapsuladas
Forma de uso de cepas sin encapsular	<ul style="list-style-type: none"> • Cepas activadas • Cepas no activadas
Concentración de CaCl ₂ en cepas inmovilizadas	<ul style="list-style-type: none"> • 4% • 5%
Temperatura y tiempo de concentración en purificación de ácido láctico	<ul style="list-style-type: none"> • 60°C por 45 minutos • 40°C por 1 hora • 45°C por 5 horas • 40°C por 5 horas

VARIABLES DEPENDIENTES

Variables dependientes	Indicadores
Concentración de ácido láctico	Acidez g / L (Ac. Láctico)
Rendimiento de ácido láctico	% m/v
Color de ácido láctico	Amarillento Transparente Blanquecino
Densidad de ácido láctico	g/L
Características químicas	Caracterización funcional por FTIR

OBJETIVOS

a. Objetivo general

Evaluar la influencia del encapsulamiento de cepas homofermentativas en la obtención del ácido láctico a partir de lactosuero.

b. Objetivos específicos

- Caracterizar física y químicamente el lactosuero.
- Aislar e identificar por técnicas microbiológicas y moleculares cepas homofermentativas nativas para la producción de ácido láctico.
- Determinar las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas nativas.
- Obtener ácido láctico por fermentación del lactosuero usando cepas nativas en forma encapsulada y en suspensión.
- Caracterizar mediante espectroscopía infrarroja el ácido láctico producido por cepas nativas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. LACTOSUERO

El lactosuero es el subproducto de la elaboración del queso que está compuesto por lactosa, proteínas y minerales; el cual posee en mayor cantidad a la lactosa que puede ser usada como sustrato en la fermentación (3). Según Baldasso et al. (4) la producción mundial de suero se encuentra alrededor de 180 a 190×10^6 toneladas / año; de esta cantidad solo se procesa el 50%. A partir de este porcentaje, el suero se trata y transforma en varios alimentos y piensos. Mayormente, la mitad de esta cantidad se utiliza directamente en forma líquida, en un 30% como suero de queso en polvo, 15% como lactosa y sus subproductos y el resto como concentrados de proteína de suero de queso (5).

El suero láctico puede ser dulce y ácido cuya composición nutricional se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de lactosuero dulce y ácido

Componente	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
Sólidos totales (%)	6.5	5.2
Lactosa	4.9	4.3
Proteína	0.8	0.6
Nitrógeno no proteínico (% del total)	22	27
Ácido láctico	0.15	0.75
Cenizas	0.56	0.46
pH	6.2	4.6

Fuente: Extraído de Domínguez et al. (6).

El tipo del lactosuero depende de la preparación del queso, según Salazar et al. (3) principalmente de la eliminación de la caseína que en el caso del lactosuero dulce se produce la coagulación por la renina a un pH de 6.5. Mientras que el lactosuero ácido es producido por la acidificación o uso de ácidos orgánicos o minerales para la coagulación (7).

Debido a su elevada concentración de proteínas, gran cantidad de minerales y vitaminas posee múltiples usos comerciales como en la elaboración de “[...] etanol, ácidos orgánicos, bebidas no alcohólicas, bebidas fermentadas, biomasa, concentrados, aislados e hidrolizados de proteína, películas comestibles, medio de soporte para encapsular sustancias, producción de xantana, enzimas, separación de la lactosa para fines endulzantes en alimentos” (8). Entre otras aplicaciones como se indica en la Figura 1:

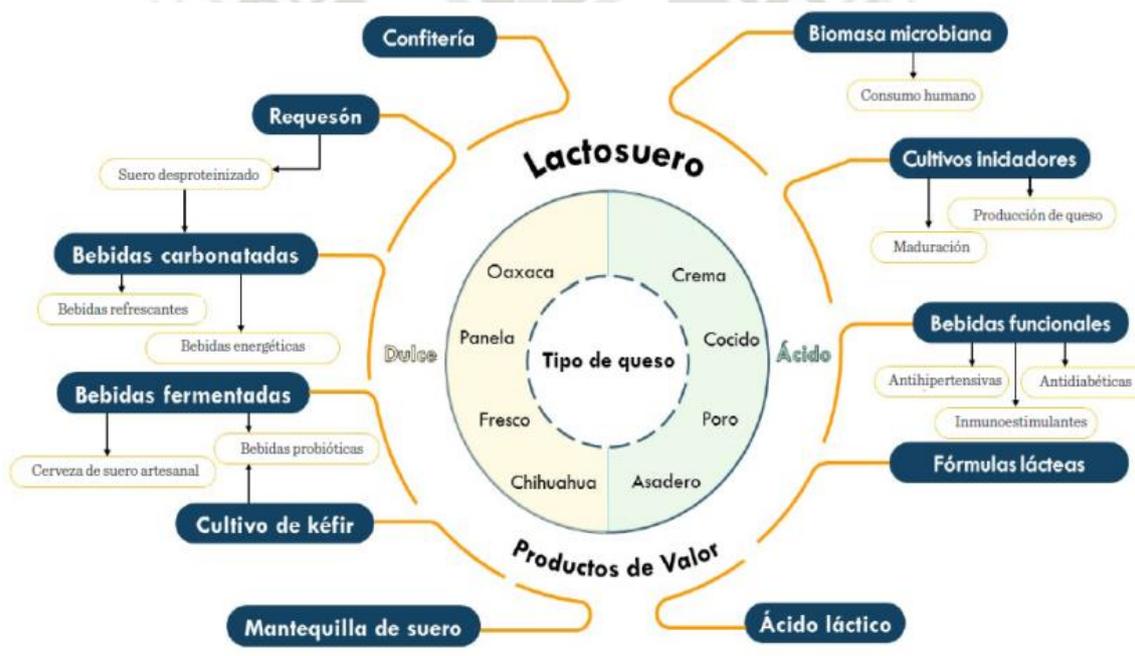


Figura 1. Posibles usos del lactosuero artesanal según su tipo

Fuente: Extraído de Mazorra-Manzano y Moreno-Hernández (9).

Como se observa en la Figura 1 uno de sus usos es para la obtención de ácido láctico a través de la biotecnología, lo cual es llevado en un proceso de fermentación láctica, comúnmente conducida en modo batch utilizando cepas homofermentativas conocidas como bacterias ácido lácticas (BAL) que son del género *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (10) a su vez suplementando el medio con fuentes de complejos

nutricionales como licor de maíz, malta o extracto de levadura. Como resultado de este proceso, podría establecerse la disminución del contenido de lactosa, produciendo principalmente ácido láctico y otros metabolitos que pueden actuar como componentes aromáticos (11). Asimismo, este lactosuero puede usarse sin haber recibido un tratamiento como la desproteínización (donde se desnaturalizan las proteínas y precipitan) y sin desproteínizar, es decir usarlo tal cual es recolectado, esto se usó para la obtención de ácido láctico y su posterior conversión a ácido poliláctico (11).

La desproteínización del lactosuero tiene como fin la eliminación de las proteínas para lo cual hay diversos métodos, entre ellos, se somete el lactosuero a un proceso de autoclavado a 121°C y 1.2 psi durante 15 minutos, para luego filtrarlo al vacío (11).

1.2. ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanoico ($\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$) es un ácido orgánico, el cual se encuentra valorado por su aplicación en diferentes industrias, tales como: alimentos, farmacéutica, química, cosmética y su potencial en la producción de polímeros biodegradables (12). Es en este rubro, que actualmente hay un aumento en la demanda de ácido láctico como materia prima para la producción del biopolímero denominado ácido poliláctico (PLA) el cual representa una alternativa muy beneficiosa, por ser biodegradable, biocompatible, amigable con el ambiente y prometedora en la sustitución de los plásticos derivados de petroquímicos (12), (13).

El ácido láctico se puede obtener por dos métodos, por síntesis química (por la hidrólisis del lactonitrilo) y por fermentación de hidratos de carbono, disponiendo de un proceso económico y fácilmente disponible (14). De acuerdo con el primer proceso, se obtiene una mezcla racémica de los ácidos lácticos, mientras que el segundo conduce a un estereoisómero de ácido láctico D (-) o L (+). Es de mayor efectividad el segundo método, puesto que, en la actualidad, el 90,0 % de la producción mundial de ácido láctico se consigue por fermentación (13).

Existen dos isómeros ópticos, el D(-) láctico y el L(+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-) (15). Cabe destacar que el isómero D(-) es nocivo para el metabolismo humano y puede generar principalmente acidosis y descalcificación (16). Sin embargo, el ácido L(+) láctico es clasificado por la FDA como una sustancia GRAS, generalmente reconocido como seguro para uso como

aditivo alimenticio (16). Se ha reportado que el isómero L(+) lo asimilan los humanos mediante la producción de la enzima L-lactato deshidrogenasa (17). Con respecto a su estado físico, las dos formas ópticamente activas como la racémica se encuentran en formas líquidas, incoloras y solubles en agua y alcohol, y no soluble en cloroformo y éter de petróleo (18). Pero en estado puro, se encuentran en estado sólido, siendo altamente higroscópicos y de punto de fusión bajo. Las formas isoméricas del ácido láctico se muestran en la Figura 2 y sus propiedades en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico

Fórmula	C ₃ H ₆ O ₃
Peso molecular	90,08
Índice de refracción	1,4414
Punto de fusión	52.8 (D), 53 (L) y 16.8 (DL)
Punto de ebullición	125-140 °C
Gravedad específica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Constante de disociación (pKa)	3.83 (D); 3.79 (L)
Viscosidad	40,33 mNsm ⁻²
Densidad a 20°C	1,249
Constante dieléctrica	22ε

Fuente: Adaptado de Serna-Cock y Rodríguez-de Stouvene (19) y de Komesu et al. (20).



Figura 2. Formas ópticas del ácido láctico (a) L-ácido láctico y (b) D-ácido láctico

Fuente: Extraído de Medina et al. (18).

Los isómeros puros tienen un mayor valor que los isómeros racémicos debido a que son usados en industrias específicas como, por ejemplo:

- L (+) ácido láctico es usado en la síntesis de ácido poliláctico L (+), en la industria alimentaria y medicina debido a que la conversión de L (+) ácido láctico se metaboliza más rápido que el D (-) ácido láctico (20).
- D (-) ácido láctico es usado para la producción de ácido poliláctico D (-) (20).

Los isómeros puros del ácido láctico pueden ser obtenidos por fermentación microbiana a partir de una fuente renovable (21) lo que muestra las ventajas sobre la síntesis química, como se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Síntesis química y biotecnológica de ácido láctico

Fuente: Extraído de Torre Pascual (21)

1.3. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO

La producción biotecnológica se lleva a cabo a través de fermentaciones microbianas que según Castro Cedeño (14) actualmente llega a un 90% de la producción de ácido láctico debido a que se realiza a bajas temperaturas y, por ende, bajo requerimiento energético y se obtiene un isómero de alta pureza. El isómero obtenido va a depender del microorganismo utilizado (16).

Para la producción biotecnológica de ácido láctico no solo he visto a partir de lactosuero sino que puede ocurrir a partir de fuentes que contengan glucosa como fibras de alfalfa, residuos de manzanas, celobiosa, glucosa, glicerol, hidrolizados lignocelulósicos, lodo de producción de papel, caña de azúcar y madera hidrolizada (20) utilizando microorganismos del género *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Peiococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc* y *Corine* que pueden producir ácido láctico L, D o DL (14).

1.3.1. Factores que influyen en la fermentación microbiana

Como todo proceso de fermentación las condiciones de operación y el tipo de sustrato y microorganismo influyen en el proceso. Entre ellos se tiene a:

1.3.1.1. Temperatura de fermentación

La temperatura de fermentación va a depender de la temperatura óptima de crecimiento microbiano del microorganismo utilizado.

1.3.1.2. pH

El valor del pH también es un factor clave para que ocurra o no la fermentación microbiana. Debido a que posee una influencia alta para la generación de ácido láctico ya que durante el proceso de fermentación ocurre una caída brusca del pH, lo cual puede afectar a la viabilidad microbiana y por ende en el rendimiento de obtención de ácido láctico. Sin embargo, este va a depender del microorganismo.

1.3.1.3. Sustrato

El sustrato influye en el rendimiento de obtención de ácido láctico y a su vez en la etapa de purificación del ácido láctico. Se suele usar azúcares puros o biomasa proveniente de alimentos o de la preparación de ellos que tienen el beneficio de tener altos rendimientos y bajo costo en la purificación; sin embargo, sus costos suelen ser elevados (21). Por lo que, es importante la búsqueda de otros tipos de sustratos que sean más económicos. Es importante precisar que las bacterias lácticas en su mayoría no metabolizan las pentosas. Asimismo, además de la fuente de carbono es importante otros requerimientos nutricionales como altas concentraciones de fuente de nitrógeno, etc. (21). Por ende, a veces se suele agregar aditivos nutricionales para proveer fuentes de

nitrógeno. En la Tabla 3 se muestra diferentes sustratos usados para la obtención de ácido láctico con diversos microorganismos.

Tabla 3. Diferentes sustratos usados en la producción de ácido láctico

Sustrato	Microorganismo	Ácido láctico (rendimiento)
Salvado de trigo y arroz	<i>Lactobacillus sp.</i>	129g/l
Mazorca de maíz	<i>Rhizopus sp. MK-96-1196</i>	90 g/l
Madera pretratada	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	48-62 g/l
Celulosa	<i>Lactobacillus coryniformis ssp. torquens</i>	0,89 g/g
Cebada	<i>Lactobacillus casei</i> NRRLB-441	0,87-0,98 g/g
Bagazo de yuca	<i>L. delbrueckii</i> NCIM 2025, <i>L. casei</i>	0,9-0,98 g/g
Trigo integral	<i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,93-0,95 g/g
Fécula de patata	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>R. arrhizoso</i>	0,87-0,97 g/g
Maíz, arroz, trigo, almidones	<i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33620	<0,70 g/g
Almidón de maíz	<i>L. amylovorus</i> NRRL B-4542	0,935 g/g
Almidón de trigo	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> ATCC 19435	0,77-1 g/g

Fuente: Extraído de Madhavan Nampoothiri et al. (12).

1.3.1.4. Modo de fermentación

La fermentación puede ser batch (discontinua), continua y semicontinuos de flujo no estacionario (flexibles, pero de más difícil análisis y operación), además que se puede usar cepas inmovilizadas o sin inmovilizar. Estas condiciones influyen también en el rendimiento, así como en la purificación del ácido láctico.

a) **Reactor Discontinuo o Batch:** No hay entrada ni salida de reactante. Además, el reactor presenta agitación, lo que significa que la composición es la misma en todos los puntos para un instante de tiempo dado. Son sencillos de operar e industrialmente son utilizados cuando se desea tratar pequeñas cantidades de sustancias.

Características: Estado no estacionario, sistema cerrado, se agregan los reactivos al inicio y se retira el producto al final.

b) **Reactor Continuo:** También conocido como reactor de mezcla completa, el cual consta de un flujo de alimentación y salida uniformes, como a su vez de una agitación perfecta. Entonces, en todos los puntos del reactor la composición y propiedades físicas del fluido son iguales. Son ideales para fines industriales cuando se requiere tratar grandes cantidades de sustancia, logrando un buen control de la calidad del producto.

Características: Estado estacionario, no hay acumulación dentro del reactor.

Bajo las condiciones previamente mencionadas, desaparece el término de dependencia con la variable tiempo. En el caso que se presenten perturbaciones que provoquen modificaciones en las condiciones de trabajo, se habla de estado transitorio.

Tipos: R. Tubular, de Lecho fijo, de Lecho fluidizado y de Tanque agitado.

c) **Reactor Tubular Flujo Pistón:** El flujo de fluido es ordenado, donde ningún elemento sobrepase o se mezcle con cualquier otro, antes o después. No hay presencia de mezcla en la dirección de flujo (dirección axial) y, por ende, todos los elementos de fluido tienen el mismo tiempo de residencia dentro del reactor. Se puede usar con o sin cepas inmovilizadas (22).

1.4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los microorganismos más usados para la producción de ácido láctico son las Bacterias Ácido Lácticas (BAL); sin embargo, también hay estudios con el uso de hongos filamentosos del género *Rhizopus* (20). La selección entre ellos depende del tipo de sustrato a usar en la fermentación (20).

1.4.1. Clasificación de las BAL

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se clasifican como se muestra en la Tabla 4, siendo las cepas más conocidas las mostradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Clasificación de las BAL

PHYLUM	<i>Firmicutes</i>	<i>Actinobacteria</i>
CLASE	<i>Bacilli</i>	-
ORDEN	<i>Lactobacillales</i>	Bifidobacteriales
FAMILIAS	6 FAMILIAS	-
GÉNEROS	40 géneros: <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Weissella</i>	<i>Bifidobacterium</i>

Fuente: Adaptado de Sánchez (23).

1.4.2. Metabolismo de las BAL

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se clasifican en dos grupos según su metabolismo: homofermentativo y heterofermentativo (24).

1.4.2.1. BAL homofermentativas u homolácticas

Las cepas homofermentativas producen exclusivamente ácido láctico a partir de glucosa (24) a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (glicólisis), donde se produce dos moléculas de ácido láctico por una molécula de glucosa (20), (23). Este tipo es el más usado ya que genera el mayor rendimiento (0.90 g/g) y su purificación más sencilla (20). Esta vía es usada por las familias *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae* (excepto por algunas especies del género *Lactobacillus*), siendo la enzima responsable de la vía, la fructosa 1,6- difosfato aldolasa (23).

1.4.2.2. BAL heterofermentativas o heterolácticas

Las cepas heterofermentativas producen ácido láctico con otros subproductos como etanol y CO₂ a partir de glucosa (24) a través de la vía fosfoacetolasa (6 – fosfogluconato) para fermentar una molécula de glucosa y convertirla a una molécula de ácido láctico, una molécula de CO₂ y una molécula de etanol/acetato. La enzima clave de esta vía es la

fosfoacetolasa (23). Esta vía es usada por la familia *Leuconostocaceae* y varias especies del género *Lactobacillus*. Entre ellos se tiene:

- BAL heterofermentativas obligatorios como *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. parabuchneri*, y *L. reuteri* (23).
- BAL heterofermentativas facultativos son *L. alimentarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentosus*, y *Lactobacillus xylosus* (23).

En la Figura 4 se muestra las rutas metabólicas de las cepas homofermentativas y heterofermentativas.

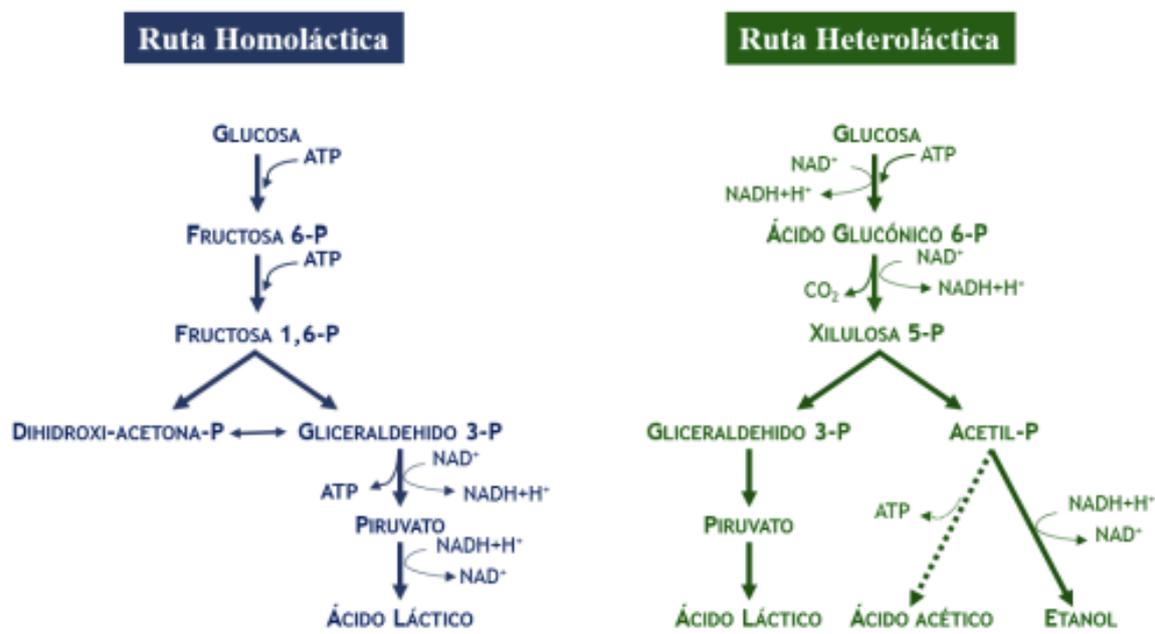


Figura 4. Metabolismo homofermentativo y heterofermentativo

Fuente: Extraído de Sánchez (23).

1.4.3. Fermentación láctica

En la fermentación láctica usan como sustrato a la glucosa y otras hexosas para su transformación a ácido láctico en condiciones anaerobias. Dicho proceso se lleva a cabo por medio de una reacción catalizada por una deshidrogenasa láctica ligada a dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD). Para lo cual se reduce el piruvato a lactato y no se forma gas y se genera 2 moléculas de adenosín trifosfato (ATP) por hexosa, y estos 2 ATP se

consumen en la formación de hexosa-difosfato a partir de la glucosa y, por otra parte, se producen consecuentemente 4 ATP. Este tipo de fermentación se lleva a cabo en el citoplasma celular. A través de la glucólisis, se obtienen dos moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa. Las vías utilizadas para la asimilación de hexosas y pentosas en ácido láctico son la de Embden-Meyerhof (EMP) y la de pentosa fosfoacetolasa (PK), en la Figura 5 se detalla las vías metabólicas.

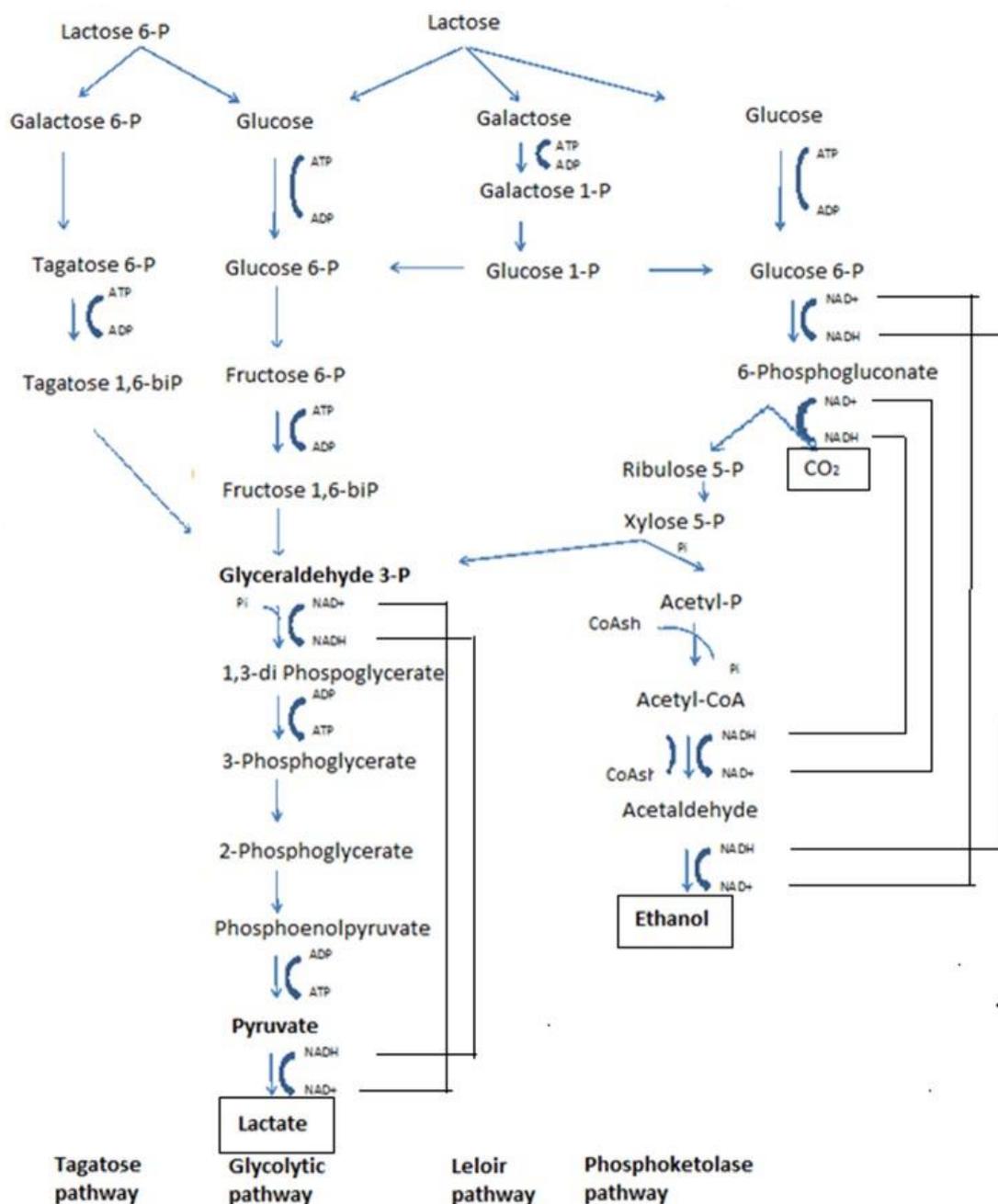


Figura 5. Rutas metabólicas en la fermentación de glucosa por BAL

Fuente: Extraído de Bintsis (25).

Los BAL también pueden metabolizar disacáridos como la lactosa, maltosa y sacarosa a través de las hidrolasas endocelulares, para lo cual en un inicio para la asimilación de la lactosa por parte de los microorganismos puede seguir una de las 4 vías mostradas en la Figura 5 (25).

1.4.4. Características de las bacterias ácido lácticas

Son Gram positivas, con cocos y/o cocobacilos, catalasa negativos y suelen ser aerotolerantes, es decir pueden ser anaerobios estrictos o microaeróbicas, ácido tolerantes y no formadores de esporas (25), (26). Como producto del metabolismo están asociadas a la producción de ácidos orgánicos, polioles, exopolisacáridos y componentes antimicrobianos (25).

Los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* son los más estudiados en la producción, de ellos la cepa más abundante son los del género *Lactobacillus* y las BAL en su mayoría tienen alta tolerancia a pH ácidos (menores de 5,0), lo que brinda una ventaja competitiva sobre otras bacterias; la temperatura óptima de crecimiento está en un rango de 20°C a 40°C y varía entre géneros.

Los *Enterococcus* son bacterias gram positivas, cocos y anaeróbicas facultativas (24) que se agrupa en cadenas cortas, pares o cocos individuales y es considerado uno de los productores de ácido láctico y son homofermentativas, el cual ha sido aislado de diferentes fuentes humanas, animales y alimentos fermentados (25), (27). Los *Enterococcus* inclusive generan bacteriocinas o péptidos antimicrobianos y se ha visto que también poseen propiedades de inmunomodulación (27). Sin embargo, también está asociada a infecciones oportunistas como en el sistema nervioso central, en el tracto urinario, endocarditis y abdomen, pero no poseen factores fuertes virulentos o toxinas por lo que su uso a veces es limitado para la industria alimentaria (25), (27). Respecto a la producción de ácido láctico, el *Enterococcus faecalis* AG5 se ha demostrado su uso para la producción de ácido láctico (27). Además del *Enterococcus lactis*, *Enterococcus camelliae* y *Weissella paramesenteroides* (28).

Según Yuan et al. (29) entre las cepas homofermentativas, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* pueden producir L- ácido láctico ópticamente puro y también puede ser producido por algunos *Lactobacillus* y *Pediococcus*, pero varía según las especies.

1.5. INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

La inmovilización de microorganismos es considerada como uno de los procedimientos para incrementar la retención y densidad celular en los biorreactores, además se reduce la fase de latencia microbiana, hay una tolerancia a altas concentraciones de azúcar, mejora el control del pH y generaría una mayor productividad, ya que se facilitarían también los procesos de purificación (24).

Para la inmovilización de BAL, se ha usado alginato de sodio y cloruro de calcio, amina polietileno y plásticos, que han actuado como un soporte para la producción de ácido láctico, que puede ser usado en fermentaciones batch por más de 126 días para el caso del *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus hirae* (24).

1.5.1. Técnicas de inmovilización

Para la formación de perlas conteniendo a las cepas inmovilizadas puede darse por una transformación química o física siendo los métodos más usados:

1.5.1.1. Extrusión

Se prepara una solución hidrocoloide donde se añade al microorganismo y lleva a una bureta o jeringas para que se formen gotas y sean vertidas a una solución endurecedora y es considerado simple y de bajo costo (30). Según Simental Valle “La forma y el tamaño de la esfera dependen del diámetro de la aguja, de la distancia de la caída y de las propiedades de la dispersión” (30, p. 8).

1.5.1.2. Emulsificación

Comprende mezclar dos fases, una conformada por la mezcla de células microbianas (fase dispersa) y otra solución polimérica en un aceite (fase continua) y para que se llegue a mezclar se usa un surfactante y agitación (30). Para que la fase dispersa gelifique se adiciona un agente coacervante (que es un compuesto donde no se disuelve el polímero o sal).

1.5.1.3. Secado por aspersion

Consiste en que la solución o emulsión se somete a aspersion usando un atomizador a temperaturas altas que permitan que el solvente usado se evapore. Este llega a influir en

la viabilidad y funcionalidad de los probióticos ya que puede afectar a la pared celular o el mismo ADN o ARN celular (30).

1.5.2. Soportes para la inmovilización

Entre los soportes se tiene a:

- Polímeros naturales como polisacáridos (celulosa, almidón, agar-agar, agarosa, alginato, entre otros); y las proteínas fibrosas como el colágeno, queratina, entre otros (30).
- Polímeros sintéticos: Amberlita y DEAE celulosa (30).
- Materiales inorgánicos: Cerámica, zeolitas, vidrio y sílice (30).

Con respecto a los soportes se tiene al alginato, cuyas ventajas son:

- Fácil manipulación
- No toxicidad
- Bajo costo

Entre las desventajas del alginato son:

- Es inestable cuando está en contacto con queladores de calcio (fosfato, lactato, citrato, iones de sodio y magnesio (30).
- Susceptibles a ambientes ácidos (30).

Como agentes endurecedores de las perlas de alginato de sodio que no sean tóxicos para los microorganismos se usa al cloruro de calcio (30).

1.6. SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Con respecto a la producción del ácido láctico, este puede presentarse en varios grados comerciales, y cabe destacar que los de mayor pureza requieren que el medio de fermentación tenga sustratos bien purificados para lograr la reducción de los niveles de impurezas que puedan encontrarse durante la recuperación.

La purificación es un paso muy importante debido a que se debe separar de los componentes que contenga el caldo de fermentación (31).

1.6.1. Formas de recuperación

Entre las metodologías para la separación y purificación del ácido láctico son:

1.6.1.1. Precipitación

Consiste en agregar en exceso hidróxido o carbonato de calcio en el caldo de fermentación para que el pH este entre 5 y 6, generándose el lactato de calcio que luego al agregar H_2SO_4 precipita como sulfato de calcio para luego ser filtrado y obtener el ácido láctico (31).

1.6.1.2. Destilación

La destilación por evaporación es una alternativa para compuestos termolábiles como el ácido láctico; sin embargo, se ha visto que la destilación reactiva parece más prometedora para obtener un ácido láctico con alto rendimiento y pureza (31).

1.6.1.3. Extracción con solventes

Llamada extracción líquido-líquido que consiste en la diferencia de solubilidad al usar un solvente donde se van a formar dos fases donde la sustancia de interés es soluble en el solvente seleccionado donde se requiere que el solvente sea selectivo, químicamente estable, no tóxico, no viscoso y que pueda recuperarse fácilmente (31). Entre los solventes usados para el ácido láctico se tiene el éter dietílico, acetato de etilo, hexanol, alcohol isoamílico y furfural; sin embargo, si se usa al isobutil cetona, hexano, decano y dodecano no son idóneos por su viscosidad (31).

1.6.1.4. Adsorción

Para el proceso de adsorción, es requerida la regeneración de resinas de intercambio iónico con una vida útil de 5 a 10 años de los adsorbentes y filtración adicional.

1.6.1.5. Procesos con membranas

Consiste en la transferencia de solutos a través de una barrera física permeable que separa dos fases, se basa en el fenómeno de difusión y en diferencias de concentración, presión y temperatura (31). Se tiene a la microfiltración, ultrafiltración, electrodiálisis y ósmosis inversa y suele ser costoso (15).

1.6.1.6. Cromatografía de Intercambio Iónico

La cromatografía es barata, de alta selectividad y fácil de operar y de ellos se tiene la de intercambio iónico que posee corto tiempo de operación y alto rendimiento para ello es importante seleccionar el tipo de resina (31).

En la Tabla 5 se muestra las ventajas y desventajas de los métodos de recuperación.

Tabla 5. Se muestra las ventajas y desventajas de métodos de recuperación

Metodología de recuperación	Ventajas	Desventajas
Precipitación	Fácil de aplicación a nivel industrial. De fácil operación.	Alto consumo de H ₂ SO ₄ . Generación de yeso. Bajo porcentaje de pureza.
Destilación molecular	Alto porcentaje de pureza. No usa solventes. No requieren etapas adicionales de purificación.	Difícil llevarlo a nivel industrial. Requiere vacío.
Destilación reactiva	Se obtiene una alta pureza. Tiene bajo consumo energético.	Proceso complejo. Puede haber problemas de corrosión y de separación.
Extracción por solvente	No genera yeso. No hay riesgo de descomposición térmica.	Se debe recuperar el solvente. Pureza no elevada.
Separación por membranas	Selectividad alta. Es flexible para su escalamiento industrial.	Es costosa Mantenimiento de membranas es difícil. Problemas de polarización.
Cromatografía de intercambio iónico	Alta resolución. Se puede usar diferentes valores de pH y perfiles de elución.	Muestras deben estar desalinizadas antes del proceso.

Fuente: Extraído de Guaque y Gómez (31).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES E INSUMOS

2.1.1. Muestras y/o unidades biológicas

- Cepas nativas
- Lactosuero proveniente de la empresa “LÁCTEOS VAQUILAC S.A.C”

2.1.2. Material de laboratorio

- Asa de kohle
- Baguetas
- Bureta
- Cámara anaeróbica
- Celdas de cuarzo
- Embudo de decantación
- Láminas portaobjetos
- Matraz
- Mechero
- Micropipeta
- Pastilla magnética
- Pipetas
- Pinzas de laboratorio
- Placas Petri
- Probeta
- Propipetas
- Soporte universal
- Tubos Falcon
- Vasos precipitados

2.1.3. Insumos y reactivos químicos

- Agar MRS
- Alginato de sodio

- Aceite de inmersión
- Alcohol isopropílico
- Bateria de tinción GRAM (Cristal violeta, Lugol, acetona y safranina)
- Caldo MRS
- Carbonato de calcio
- Cloruro de calcio
- Éter dietílico
- Extracto de levadura
- Fenoltaleína (solución)
- Filtro de membrana #42
- Fosfato de amonio
- Papel filtro #18
- Papel filtro lento
- Parafilm
- Solución de NaOH 0.1 N
- Suero fisiológico
- Tubos de ensayo

2.1.4. Equipos e instrumentación

- Agitador magnético con calefacción
- Agitador orbital rotatorio (shaker)
- Autoclave
- Baño maría
- Brixómetro
- Bomba al vacío
- Centrifugadora Gemmy Industrial Corporation modelo PLC-05
- Cocina eléctrica
- Espectrofotómetro marca Thermo Fisher Scientific modelo GENESYS™ 180
UVVis
- Espectrómetro Infrarrojo
- Estufa marca Bruder
- Incubadora marca WITEG modelo DH.WIG03050

- Microscopio óptico
- pH metro
- Refrigeradora
- Rotavapor

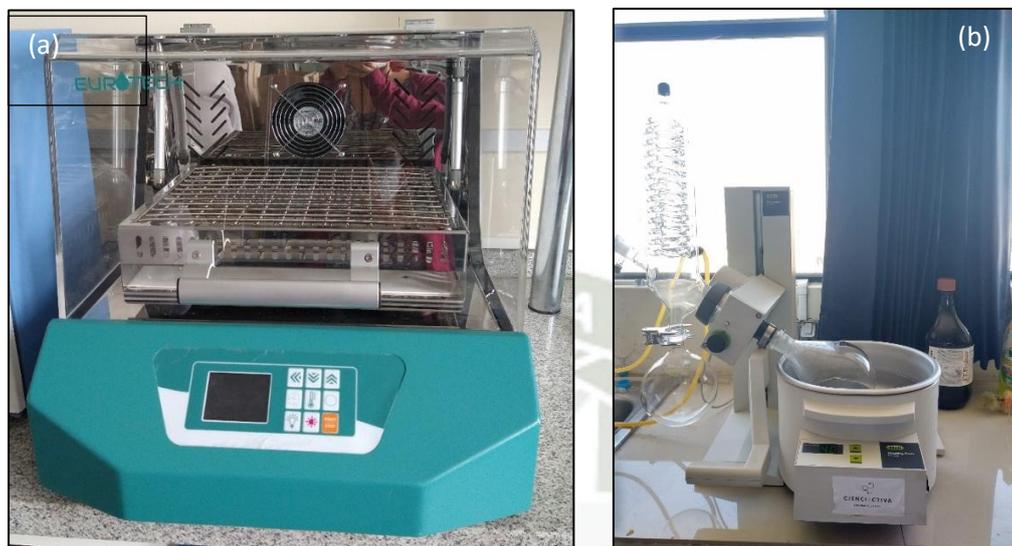


Figura 6. Equipo de agitador rotatorio con cámara de incubación para la fermentación del lactosuero (a) y rotavapor para la purificación de ácido láctico (b)

Fuente: Elaboración propia

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. Recolección de lactosuero

Las muestras de lactosuero fueron recolectadas de una empresa láctea denominada “LÁCTEOS VAQUILAC S.A.C” localizada en la ciudad de Arequipa de dónde se adquirió el lactosuero para todas las actividades desarrolladas en la presente tesis.

2.2.2. Preparación del lactosuero

Para las pruebas de fermentación, se propuso usar lactosuero sin tratamiento (lactosuero proteinizado) y lactosuero con tratamiento (desproteínizado). Por lo tanto, para la desproteínización de las muestras se realizó lo siguiente:

2.2.2.1. Método 1 de desproteínización

Se sometió al lactosuero a un tratamiento térmico a una temperatura de 90 °C durante 20 min, para luego ser enfriado a 20 °C para proceder a un pre filtrado, centrifugado y filtrado al vacío. El lactosuero desproteínizado fue caracterizado (Figura 7).

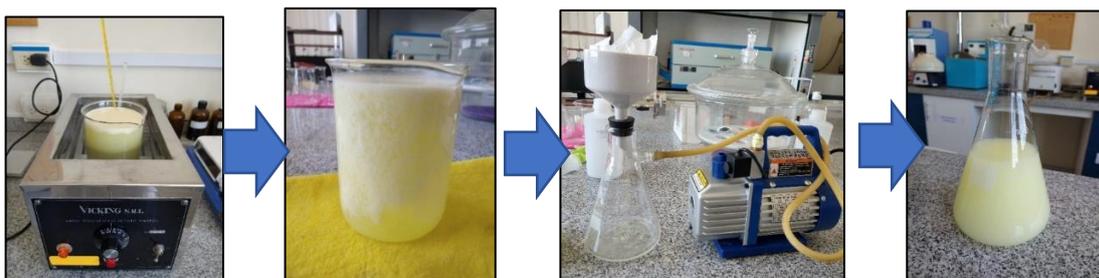


Figura 7. Desproteínización de lactosuero por método 1
Fuente: Elaboración propia

2.2.2.2. Método 2 de desproteínización

El suero se llevó al autoclave a 121 °C y 15 PSI de presión, posteriormente se llevó a un tamiz. Una vez eliminada la mayor cantidad de proteína tamizada, se llevó el suero a una centrífuga a 4500 rpm por 10 minutos para facilitar los procesos de filtración al vacío (Figura 8).

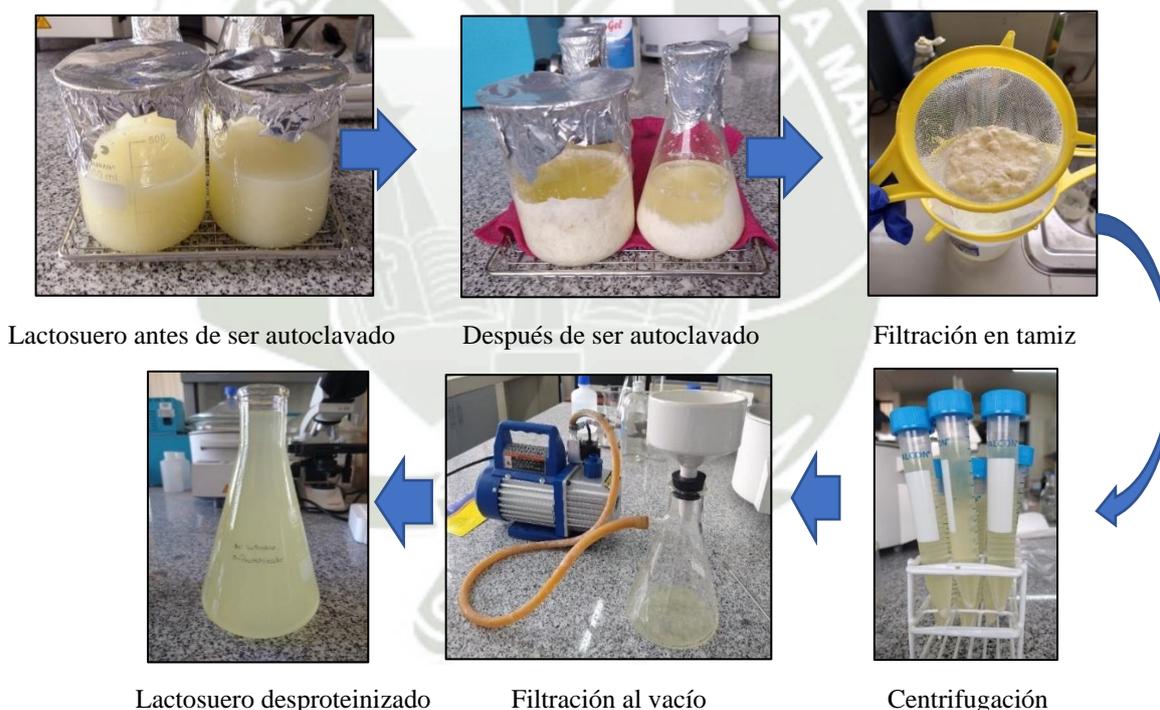


Figura 8. Desproteínización del lactosuero por método 2

Fuente: Elaboración propia

2.2.3. Caracterización del lactosuero

El lactosuero recolectado fue caracterizado físico-químicamente antes de ser tratado por el MÉTODO 1 (lactosuero proteinizado), para lo cual se llevó 1.1 L de muestra al laboratorio BHIOS S.R.L., donde se realizó el análisis de acidez (Norma Técnica Peruana 202.116:2008. Leche y productos lácteos. Leche cruda. Determinación de acidez de la

leche. Método volumétrico), cenizas (AOAC Official Method 945.46. método gravimétrico), grasas (Norma Técnica Peruana 202.126:1998. Método de Roesse), proteínas (BHIOS-FQ-016. Determinación de proteína en leche y productos lácteos) y lactosa (Medidor ultrasónico).

Posteriormente, después de que la muestra de lactosuero fue desproteinizada por el MÉTODO 2 donde se buscó reducir o eliminar a las proteínas, se llevó 50 ml de lactosuero desproteinizado según el proceso indicado en el inciso 2.2.2. al Laboratorio de Calidad de la UCSM donde se determinó las proteínas por el Método Kjeldahl, A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13th Edition, 1984.

2.2.4. SELECCIÓN, ACTIVACIÓN Y ADAPTACIÓN DE CEPAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VARIABLES DE FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO

2.2.4.1. Aislamiento e identificación de cepas nativas

Se aisló cepas homofermentativas a partir del lactosuero recolectado. Se usó el medio MRS agar, bajo condiciones de microaerobiosis, en un pH de 6.4 ± 0.2 a 29°C por 48 horas en la estufa marca Witeg modelo WIG-50, serie: 1001349193A001. Se preparó el medio, autoclavó, plaqueó en placas y se sembró por agotamiento usando como inóculo la muestra de lactosuero. Debido a que las bacterias son anaeróbicas facultativas, se usó la cámara anaeróbica de incubación donde se colocó las placas sembradas y el blanco, luego se colocó una vela encendida y se cerró con la tapa hermética, se esperó a que la vela se apague, lo que indica que ya se consumió el oxígeno dentro de la cámara anaeróbica. Posteriormente, se llevó a la incubadora a 29°C durante 48 horas.

De las placas petri con las siembras respectivas se observó presencia de colonias grandes y blancas y posteriormente se encontraron colonias pequeñas y blancas. Por lo que, se realizaron más réplicas de cada una de las colonias para aislarlas, además se realizó la tinción de Gram para confirmar la presencia de una sola cepa. En la Figura 9 se observa el procedimiento seguido para el aislamiento de cepas bacterianas.

Para su identificación se realizó las pruebas microscópicas (tinción Gram), macroscópicas (colonias en medio), bioquímicas (catalasa) y molecular.

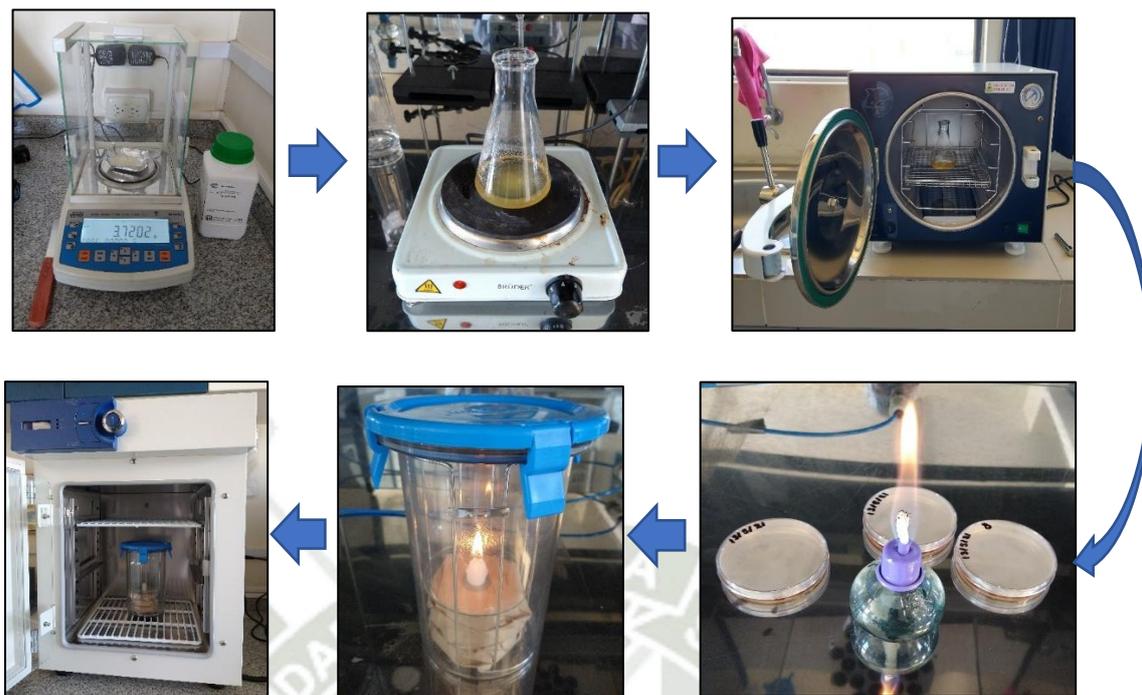


Figura 9. Aislamiento de cepas

Fuente: Elaboración propia

2.2.4.2. Caracterización de cepas aisladas

Se realizó las pruebas correspondientes para su identificación, tanto microscópicas (tinción Gram), macroscópicas (colonias en medio), bioquímicas (catalasa) y molecular.

2.2.4.2.1. Caracterización microscópica

Para la tinción GRAM, se realizó lo siguiente:

Se fijó la muestra en un portaobjetos donde se agregó una gota de agua destilada y luego se retiró una muestra de las colonias aisladas, se esparció y se colocó cuidadosamente encima de la llama para que se fije y esperó a que la muestra esté seca en el portaobjetos.

Luego se vertió cristal violeta sobre el portaobjetos con la cepa fijada y se dejó actuar por 1 minuto, luego se vertió agua corriente para quitar el colorante de la placa residual, se agregó lugol y se dejó actuar por 1 minuto. Se enjuagó con agua corriente y se decoloró con el alcohol-acetona por 30 segundos y enjuagó con agua corriente, finalmente se agregó gotas de safranina y dejó actuar por 1 minuto (Figura 10). Se esperó a que la placa seque al aire y se observó en el microscopio a 100X con aceite de inmersión.

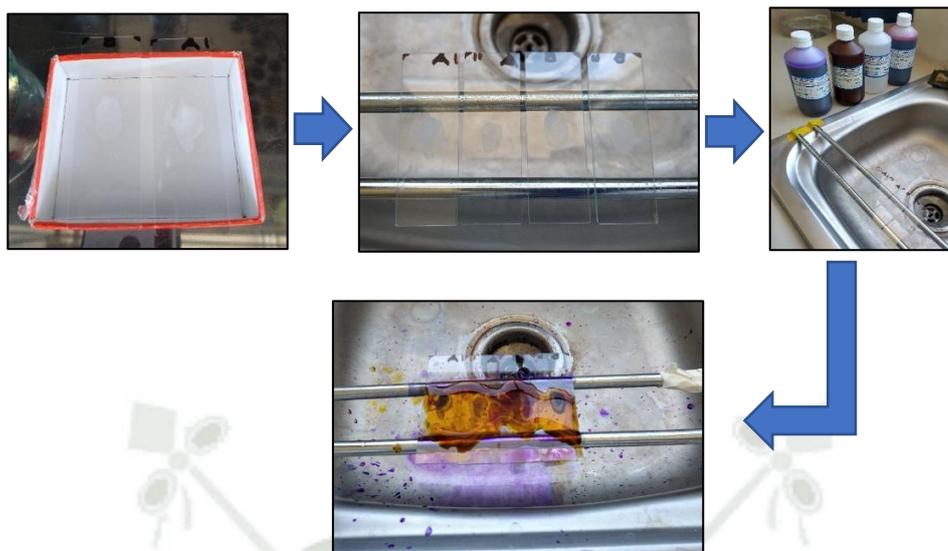


Figura 10. Coloración GRAM

Fuente: Elaboración propia

2.2.4.2.2. Caracterización macroscópica

Después del crecimiento bacteriano en el medio MRS se observó las características morfológicas a las 48 horas de incubación (Tabla 6).

Tabla 6. Características macroscópicas

ITEM	Característica
Pigmentación	Blanca, amarilla, naranja y otros.
Tamaño	Diámetro (mm)
Forma	Puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, con forma de huso.
Elevación	Plana, elevada, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada.
Margen	Entero, lobulado, ondulado, lacerado, filamentoso, enrulado.
Textura	Viscosa, membranosa, quebradiza y otras.

Fuente: Elaboración propia

2.2.4.2.3. Caracterización bioquímica

Después de tener las colonias aisladas, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas de catalasa, se usó el peróxido de hidrógeno al 3%. En un portaobjetos limpio se colocó una colonia pura de la cepa con ayuda del asa de siembra y luego se agregó con gotero o pipeta pasteur una gota de H₂O₂ al 3% sobre el microorganismo y se observó si se generó burbujas o no.

2.2.4.2.4. Identificación molecular de las cepas

La muestra aislada sembrada en una placa petri fue llevada al laboratorio ADN Uchumayo, en la ciudad de Arequipa para su identificación molecular por PCR, donde se extrajo el ADN Genómico de las muestras, y se amplificó los genes marcadores de taxonomía mediante la tecnología de la PCR siendo el RNAr16S para bacteria, los amplicones fueron secuenciados mediante el método de Sanger y las secuencias revisadas se compararon con la base de datos de NCBI usando el software BLAST ® » blastn suite.

2.2.4.3. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas nativas

Se evaluaron las condiciones de temperatura, pH e inhibición de crecimiento por aumento de la concentración salina (NaCl).

- Temperatura: Se trabajó con las siguientes temperaturas: 4, 8, 20, 25, 29,32, 34, 35, 36, 37 y 45 °C. Se observó el crecimiento a las 24 y 48 horas de incubación (Figura 11).
- pH: Se evaluó tres valores de pH (4, 7, y 9) que permitieron determinar si las bacterias son acidófilas, neutrófilas o alcalófilas (Figura 12). Se utilizó el medio MRS y con el uso de buffers se adecuó los valores de pH del medio (ácido cítrico 0.1 M e hidróxido de sodio 0.2 M).
- Tolerancia a la salinidad: Se trabajó con NaCl para determinar la tolerancia a la salinidad a una concentración inicial de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 % hasta que se observó la inhibición del crecimiento.



Figura 11. Crecimiento a 15°C (a), 4°C (b) y (c) en la incubadora (29,32, 34, 35, 36, 37 y 45 °C)

Fuente: Elaboración propia

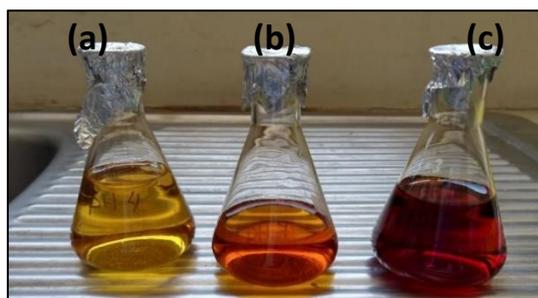


Figura 12. Crecimiento a pH 4 (a), pH 7 (b) y pH 9 (c)

Fuente: Elaboración propia

2.2.4.4. Curva de crecimiento

Para la realización de la curva de crecimiento se preparó 80 ml de caldo MRS, el cual fue autoclavado. Previamente se esterilizó en la estufa a 180°C por 30 minutos las pipetas de 10 ml que fueron usados para retirar 2 ml de muestra en una celda y medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm. Después de esterilizado los matraces conteniendo el caldo MRS y haberse esperado a que se enfríe se sembró las cepas aisladas y no se sembró nada en el blanco. Se llevó al agitador orbital a 120 rpm a temperatura ambiente y a las temperaturas óptimas de crecimiento y se midió la absorbancia cada hora.

2.2.5. FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

2.2.5.1. Activación de las cepas nativas

Las cepas nativas se activaron en caldo MRS por 24 horas a la temperatura óptima. Este cultivo se utilizó como inóculo para las posteriores fermentaciones.

2.2.5.2. Fermentación batch con cepas libres

El lactosuero (desproteínizado o proteinizado) fue suplementado con extracto de levadura 0.5% p/v, fosfato de amonio 0.9676 % p/v, neutralizante (carbonato de calcio 5 g/l) para un volumen final de 120 ml de lactosuero y se llevó a baño maría a 65°C por 10 minutos. Se consideró un blanco. Del caldo realizado para la activación de las cepas nativas, se extrajo un 10% del volumen de fermentación para su inoculación cuando el medio se encuentre a temperatura ambiente. Asimismo, se realizó la fermentación con cepas no activadas, para lo cual, en el medio de cultivo preparado y cuando se encuentre

a temperatura ambiente, se adicionó 3 azadas de las colonias. Se realizó por triplicado los ensayos (Figura 13).

- **Parámetros de fermentación:**

- Temperatura: 32°C
- Tiempo: 7 días
- Concentración de inoculación: 10%
- Agitación: 120 rpm



Figura 13. Medios de cultivo inoculadas con cepas activas y sin activar

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 7 se muestra las condiciones propuestas de fermentación.

Tabla 7. Pruebas de fermentación de las cepas sin encapsular en batch (cepas libres)

PRUEBA N°	CEPA	Sin activar	Activadas en medio MRS	Medio	
				Lactosuero desproteínizado + Extracto levadura + fosfato amonio + carbonato calcio	Lactosuero proteínizado + Extracto levadura + fosfato amonio + carbonato calcio
1	BI	x	-	-	x
2	BI	x	-	x	-
3	BI	-	x	-	x
4	BI	-	x	x	-

Fuente: Elaboración propia

2.2.5.3. Fermentación batch con cepas inmovilizadas en perlas de alginato

Para la realización de la fermentación con cepas inmovilizadas, se preparó previamente las perlas de alginato donde se encapsularon o inmovilizaron las cepas BAL. Para el medio de cultivo a utilizar, se empleó solamente lactosuero desproteínizado y sin desproteínizar, ya que, al agregar los suplementos, se observó que la estabilidad de las perlas disminuía fuertemente. Los ensayos se realizaron por triplicado y en la Tabla 8 se muestra las condiciones propuestas de fermentación.

Tabla 8. Pruebas de fermentación de las cepas inmovilizadas

PRUEBA N°	CEPA	Cloruro de Calcio (%)	Tiempo de estabilización (h)	Alginato de sodio (%)	MEDIO	
					Lactosuero desproteínizado	Lactosuero proteínizado
1	BI	5	1	3	X	-
2	BI	5	1	3	-	x
3	BI	4	1	3	X	-
4	BI	4	1	3	-	x

Fuente: Elaboración propia

En los siguientes pasos se detalla la preparación de las perlas de alginato y la inmovilización de las cepas en ellas:

a. Activación de las cepas:

Las cepas se cultivaron en caldo MRS a 32°C por 24 horas y a 120 rpm. De la suspensión de bacterias en el caldo MRS, se tomó un volumen para ser llevada a la centrífuga, con la finalidad de concentrar las bacterias a 4500 rpm durante 20 minutos. El pellet obtenido se lavó por triplicado con solución salina y luego se agregó 1 ml de solución salina para formar un concentrado de biomasa.

b. Preparación de la solución de alginato de sodio:

Se disolvió el alginato de sodio en agua destilada a la concentración indicada en la Tabla 8 y con ayuda de una bagueta. Con la finalidad de que la solución sea homogénea, luego se filtró al vacío colocando una gasa (Figura 14).



Figura 14. Preparación de la solución de alginato de sodio

Fuente: Elaboración propia

c. Mezcla de la solución de alginato con las cepas:

En 30 ml de la solución de alginato de sodio y en agitación constante a 120 rpm se coloca 1 ml del concentrado hasta que la solución se vea homogénea (Figura 15).

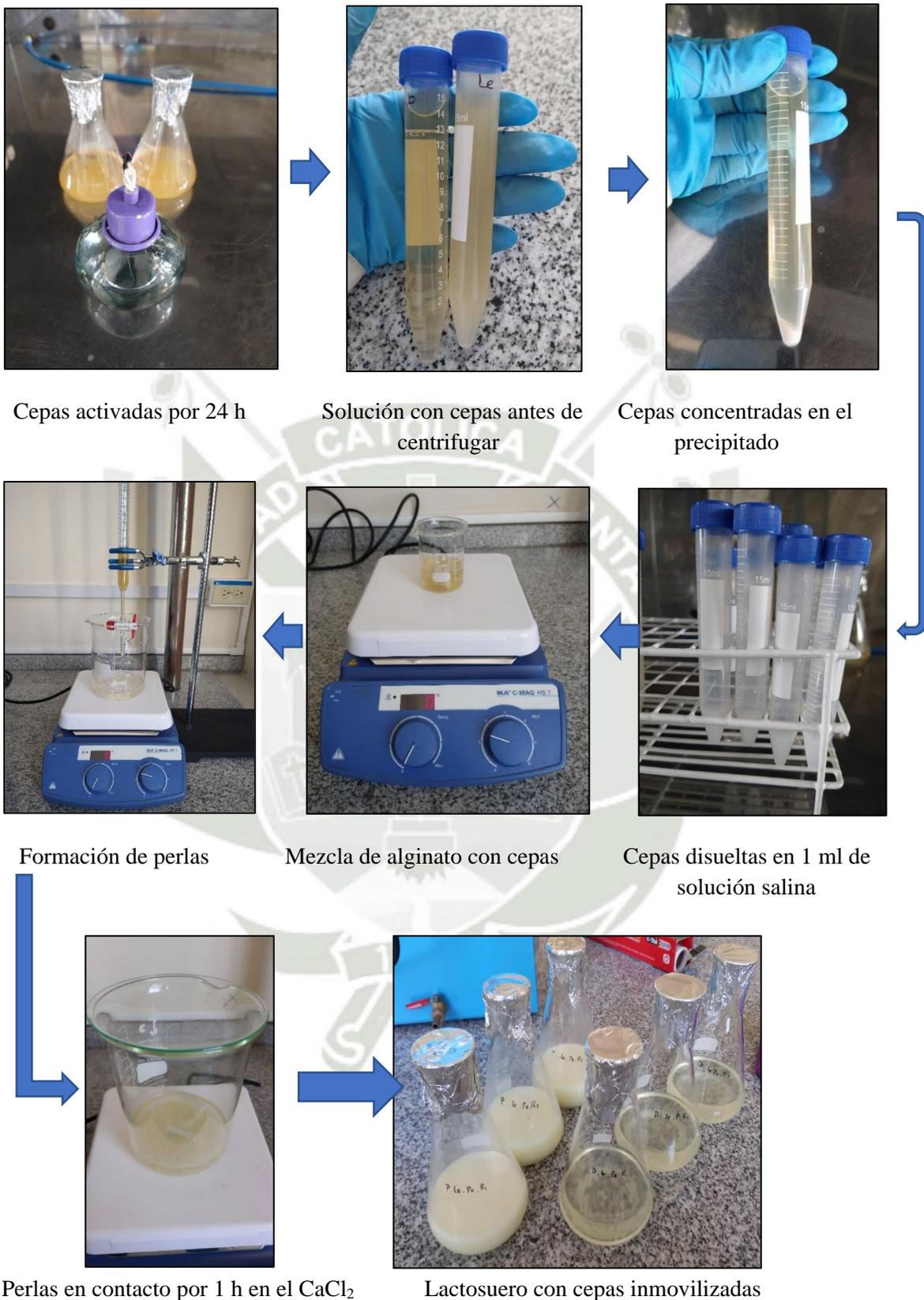


Figura 15. Inmovilización de cepas en perlas de alginato de sodio

Fuente: Elaboración propia

d. Formación de las perlas de alginato:

Se preparó la solución de cloruro de calcio a la concentración indicada en la Tabla 8 y se coloca 100 ml en un vaso precipitado en un agitador magnético a 120 rpm. En una bureta se vertió la mezcla preparada previamente y se dejó caer gota a gota en el beaker con la solución de cloruro de calcio. Terminada de pasar toda la mezcla a través de la jeringa se dejó en contacto durante 1 h para su estabilización. Finalmente, las perlas se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso de iones de calcio antes de su uso, para lo cual se recupera el cloruro de calcio, vaciándolo a un recipiente y usando un embudo, se retiene a las perlas de alginato (Figura 15).

2.2.5.4. Monitoreo de parámetros de la fermentación

El monitoreo se realizó diariamente y se midieron los parámetros a continuación.

2.2.5.4.1. Caracterización del ácido láctico por análisis de Acidez (presencia de Ácido láctico)

Se preparó la solución 0.1 N de hidróxido de sodio. Se tomó un volumen conocido de la muestra en fermentación y se colocó en tubos eppendorf cónicos de 15 ml. Posteriormente se pesó un vaso de precipitado completamente seco y limpio en una balanza analítica y se registró el valor. Se colocó en el beaker la cantidad de muestra y se pesó nuevamente; luego se añadió 2 a 3 gotas de solución indicadora de fenolftaleína y se homogenizó. La muestra fue titulada con una solución 0,1 N de hidróxido de sodio hasta observar el cambio de color a rosado persistente durante al menos 30 segundos (Figura 16). Se anotó en la bureta el volumen de solución empleada, registró el valor y se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \text{ ácido láctico}\right) = 0.090 \times \frac{V \text{ solución NaOH (ml)} \times [\text{NaOH}] * 1000}{\text{Volumen muestra (ml)}} \quad (1)$$



Figura 16. Muestra antes de ser titulada (a) y después de ser titulada (b)

Fuente: Elaboración propia

2.2.5.4.2. Consumo de lactosa por medición de concentración de lactosa

Se usó el método de refractometría que consiste en la medición de grados Brix que es equivalente a 1 g de soluto en 100 g de solución. Para lo cual se tomó 1 ml del medio de fermentación y se centrifugó a 4500 rpm por 10 minutos con la finalidad de eliminar los sólidos y hacer precipitar a las cepas. Se recuperó la solución suspendida y tomó unas gotas de la solución y colocó en el refractómetro para ser medida.

2.2.5.4.3. Medición de pH

Se midió el pH para lo cual se tomó 10 ml de la muestra y se midió el pH de la solución en un pH metro (Figura 17).



Figura 17. Medición de pH de las muestras

Fuente: Elaboración propia

2.2.5.4.4. Monitoreo de crecimiento microbiano (UFC/ml): Técnica de aislamiento y recuento usando un banco de diluciones

Para el monitoreo del crecimiento microbiano se usó la técnica de aislamiento y recuento usando un banco de diluciones. Es una técnica que consiste en obtener una suspensión de la mezcla de microorganismos y hacer diluciones seriadas que se vierten en una placa petri hasta conseguir colonias aisladas. Para ello se tomó una muestra del cultivo mixto, y depositó 1 ml en el primer tubo con 9 ml de suero fisiológico (dilución 10^{-1}) para luego agitar el tubo. En un segundo tubo se transfirió de la primera dilución 0,1 ml al siguiente tubo con 9 ml de suero fisiológico (10^{-2}), y así sucesivamente. Esto se realizó en frente del mechero en condiciones de asepsia.

Del tubo con dilución 10^{-3} o 10^{-4} , con una pipeta estéril se inoculó 0,1 ml en una placa con agar MRS y se extendió la muestra sobre la superficie con el asa de vidrio. Se

llevó a la incubadora a 32 °C por 48 horas para luego realizar el conteo. Para el recuento de las colonias se usó la ecuación (2).

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \text{ o } \frac{\text{UFC}}{\text{g}} = \text{N}^\circ \text{ colonias contadas} \times \left(\frac{1}{\text{Factor dilución}} \right) \times \left(\frac{1}{\text{Volumen de inóculo}} \right) \quad (2)$$

2.2.6. PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Terminada la fermentación se procedió a realizar la centrifugación en tubos falcon de 15 ml durante 20 min a 4500 rpm. Una vez terminada la centrifugación, el sobrenadante obtenido fue filtrado dos veces, la primera por medio de un papel filtro Whatman 42 con la ayuda de un embudo de porcelana y un Erlenmeyer de 500 ml con desprendimiento lateral para poder generar un vacío conectándolo a la bomba de vacío. La segunda por microfiltración al vacío usando un filtro de membrana de 47 mm.

Luego de terminar la microfiltración, la solución fue llevada al rotavapor a las condiciones indicadas en la Tabla 9 a una velocidad de rotación de 95 rpm. Para determinar las horas, se realizó una batería de experimentos variando la temperatura y tiempo de concentración de ácido láctico con las muestras que obtuvieron un mayor desempeño:

Tabla 9. Distintas condiciones de temperatura y tiempo de concentración

Temperatura de concentración (°C)	Tiempo
40	1 hora
40	5 horas
45	5 horas
60	45 minutos

Fuente: Elaboración propia

Después de realizar la concentración del ácido láctico se procedió a realizar la extracción del ácido láctico utilizando un embudo de decantación de 500 ml, donde se adicionó el volumen de muestra y de solvente (éter dietílico) en una relación 1:1, y se agitó vigorosamente y se dejó en reposo hasta que se diferencien las dos fases. Se separan las dos fases obtenidas siendo la superior llevada al rotavapor a presión atmosférica y a una temperatura de 40°C para evaporar el éter dietílico y de esta manera concentrar y purificar el ácido láctico (Figura 18). Este proceso se realizó para los sistemas de fermentación previamente desarrollados con los que se obtuvo los mejores rendimientos de obtención de ácido láctico.

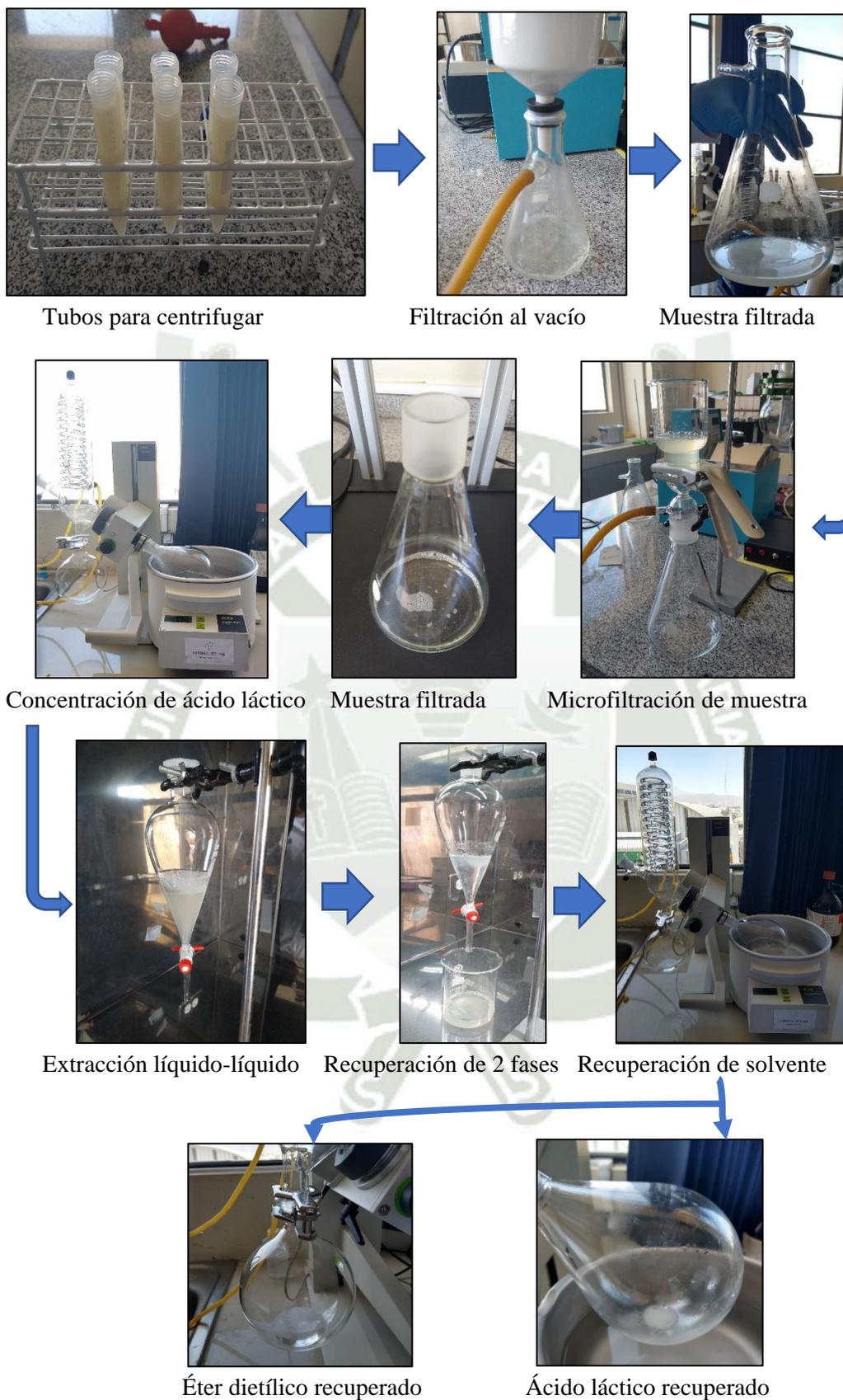


Figura 18. Purificación de ácido láctico

Fuente: Elaboración propia

2.2.7. CARACTERIZACIÓN POR ENSAYO DE FTIR DEL ÁCIDO LÁCTICO PURIFICADO

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de química de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa donde se realizó el análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR) de aquellas muestras con el mayor rendimiento según norma ASTM E1252-98 (2021) “Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra for Qualitative Analysis”, con un rango de número de onda desde 650 cm^{-1} hasta 4000 cm^{-1} y accesorio de reflectancia total atenuada universal. Las muestras llevadas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Muestras analizadas por FTIR

FTIR MUESTRA CÓDIGO	MUESTRAS	Condiciones
MUESTRA 1	Desproteínizado Sin activar BAL	P3_60°C por 45 Minutos
MUESTRA 2		P3_40°C por 1 hora
MUESTRA 7	Desproteínizado_BAL_encapsulado _ 5% cloruro calcio	P7_45°C por 5 horas
MUESTRA 8		P7_40°C por 5horas

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL LACTOSUERO

En la Tabla 11 se muestra las características del lactosuero recolectado.

Tabla 11. Características fisicoquímicas del lactosuero

Parámetros	MÉTODO 1		MÉTODO 2	
	LP	LD	LP	LD
Acidez (%)	0.45	0.38	-	-
Cenizas (%)	0.50	0.52	-	-
Lactosa (%)	3.41	3.57	-	-
Proteínas (%)	0.81	0.89	0.31	0.04
Grasas (%)	0.85	0.38	-	-
pH	5.00	4.60	4.97	4.84

Nota: LD: lactosuero desproteínizado, LP: lactosuero proteinizado.

Fuente: Elaboración propia



Figura 19. Lactosuero proteinizado o sin desproteínizar (a) y lactosuero desproteínizado (b)

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la Tabla 11 la desproteínización ocasiona un cambio en las características fisicoquímicas del lactosuero, principalmente en la concentración de proteínas y grasas. Asimismo, se observa que con el método 2 de desproteínización se obtiene una mayor reducción de las proteínas. Estas características fisicoquímicas van a depender de las condiciones de síntesis del queso.

Asimismo, el lactosuero sin desproteínizar o proteínizado (inicial) puede ser clasificado como suero dulce o ácido según sus valores de acidez y de lactosa, siendo suero dulce si su acidez es ≤ 0.16 y con valores de lactosa entre 4.40 - 5.00, mientras que es suero ácido cuando su acidez es ≥ 0.35 y con un valor de lactosa ≤ 4.30 (2), por lo que, según esta información, el lactosuero usado en el presente proyecto es ácido y según Mazorra-Manzano et al. (9) el lactosuero ácido posee una mayor cantidad de ácido láctico. Por lo que, esta fuente es propicia para obtener un mayor rendimiento de ácido láctico. Además, se observa que el suero desproteínizado incrementa su valor de lactosa lo cual también fue obtenido en el trabajo de investigación de Rojas et al. (13) que usaron como método de desproteínización el autoclavado del lactosuero.

3.2. SELECCIÓN, ACTIVACIÓN Y ADAPTACIÓN DE CEPAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VARIABLES DE FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO

3.2.1. Aislamiento e identificación de cepas

En la Figura 20 se muestra las colonias iniciales y las colonias aisladas a partir del lactosuero. De los dos microorganismos se aisló la cepa correspondiente a cocos como se muestra en la Figura 21.

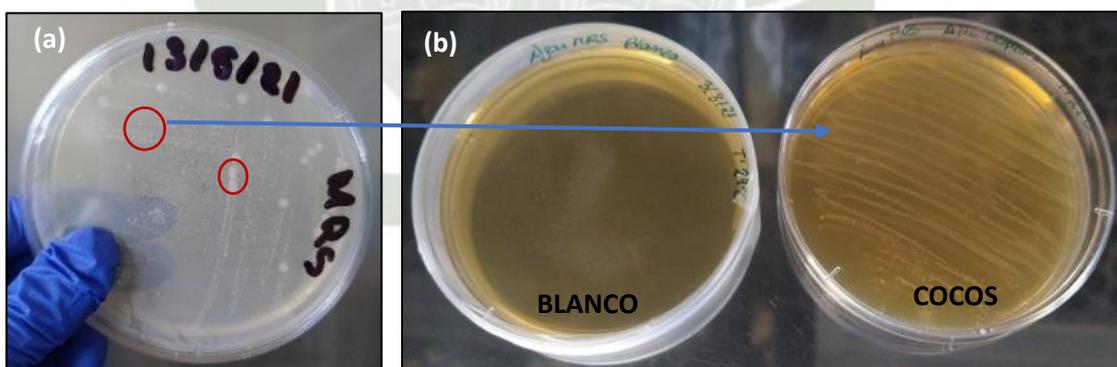


Figura 20. Colonias iniciales (a) y colonias aisladas (b)

Fuente: Elaboración propia

3.2.2. Caracterización de cepas aisladas

En la Tabla 12 se muestra las características morfológicas y bioquímicas de la cepa aislada. Se observa que es catalasa negativa y cocos lo cual coincide con el género de los *Enterococcus* (27), (28).

Tabla 12. Características de las cepas aisladas

Características	BI
Pigmentación	Blanca
Tamaño	0.1 – 1 mm
Forma	Circular
Elevación	Plana
Margen	Entero
Textura	Viscosa
GRAM	+
Catalasa	-
Microorganismo	Cocos

Fuente: Elaboración propia

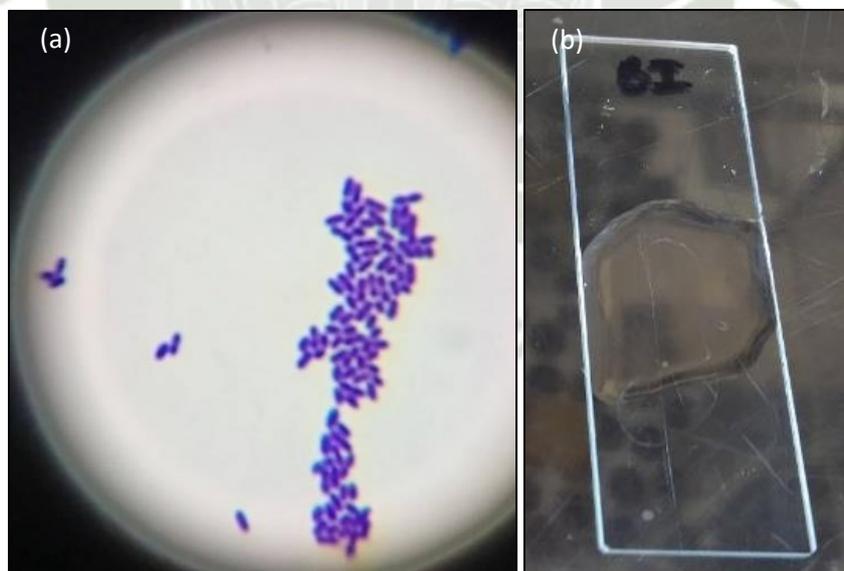


Figura 21. Tinción GRAM de la cepa BI y observación en microscopio óptico a 100X (a) y prueba de catalasa negativa (b)

Fuente: Elaboración propia.

3.2.3. Identificación molecular de las cepas

La muestra de la bacteria analizada presenta un 100% de similitud con el gen rRNA16S de *Enterococcus faecalis* y el análisis filogenético indica que es *Enterococcus faecalis*. Los análisis realizados se encuentran en ANEXOS 1.

3.2.4. Condiciones óptimas de crecimiento

En la Tabla 13 se muestra las condiciones de crecimiento de la cepa *Enterococcus faecalis* a distintas temperaturas, a concentraciones de salinidad y a pH. Se determinó las temperaturas óptimas de crecimiento siendo para la cepa de *Enterococcus faecalis* a 32°C, asimismo, es neutrófila y alcalófila (Figura 22), y la tolerancia a la salinidad es hasta 4%.

Tabla 13. Crecimiento a distintas temperaturas, a concentraciones de salinidad y a pH

Crecimiento a temperatura			Resistencia a la salinidad			Crecimiento a pH		
Temperatura (°C)	Cepa	Blanco	Salinidad (%)	Cepa	Blanco	pH	Cepa	Blanco
4	-	-	1	+++	-	4	-	-
8	-	-	2	+++	-	7	+++	-
T. ambiente (21°C)	++	-	4	+++	-	9	+++	-
25	++	-	6	-	-			
28	++	-	8	-	-			
29	++	-	10	-	-			
32	+++	-	11	-	-			
34	++	-	12	-	-			
35	++	-	13	-	-			
36	-+	-						
37	-	-						
45	-	-						

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

Código	Crecimiento
-	No hay crecimiento
-+	Poco crecimiento
+-	Ligero crecimiento
+	Crecimiento
++	Crecimiento regular
+++	Buen crecimiento

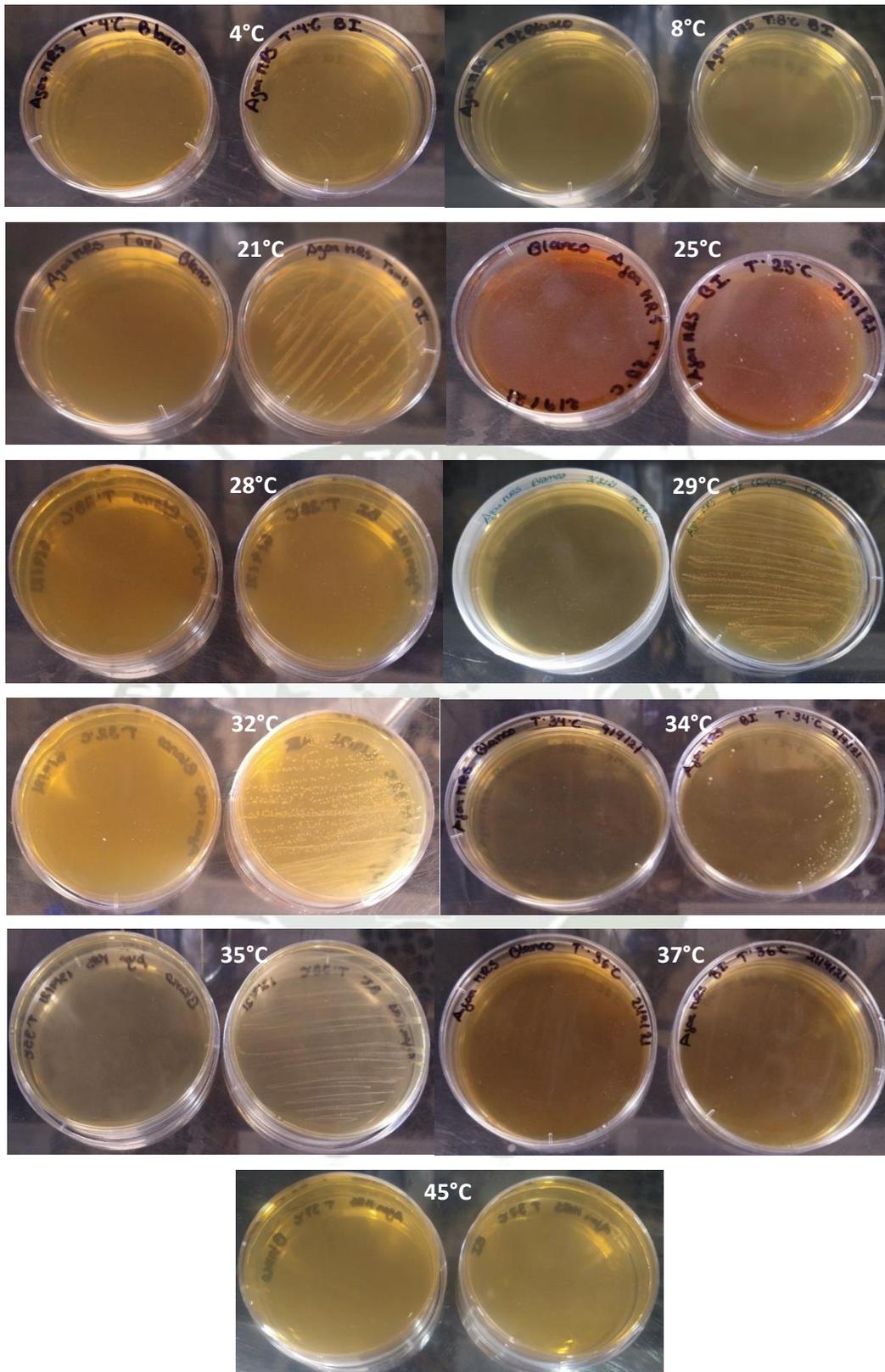


Figura 22. Fotos de las placas con la cepa sometida a distintas temperaturas

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 23 se muestra claramente como la cepa *Enterococcus faecalis* varía su crecimiento a distintas temperaturas y en la Figura 24 se observa su crecimiento a distintas concentraciones de salinidad (NaCl), siendo tolerante hasta un 4%; esto varía con otras especies de *Enterococcus* donde se ha observado un crecimiento hasta 6.5% NaCl (27), (26).

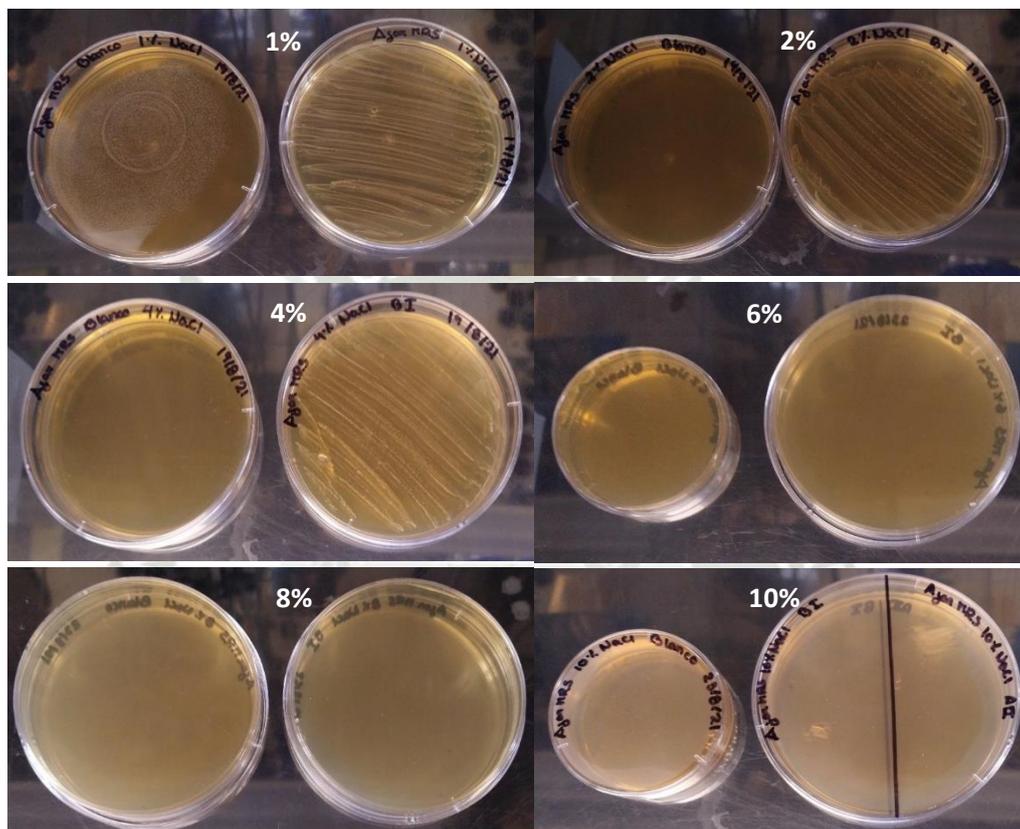


Figura 23. Fotos de las placas de la cepa sometida a distintas concentraciones de NaCl (%)

Fuente: Elaboración propia

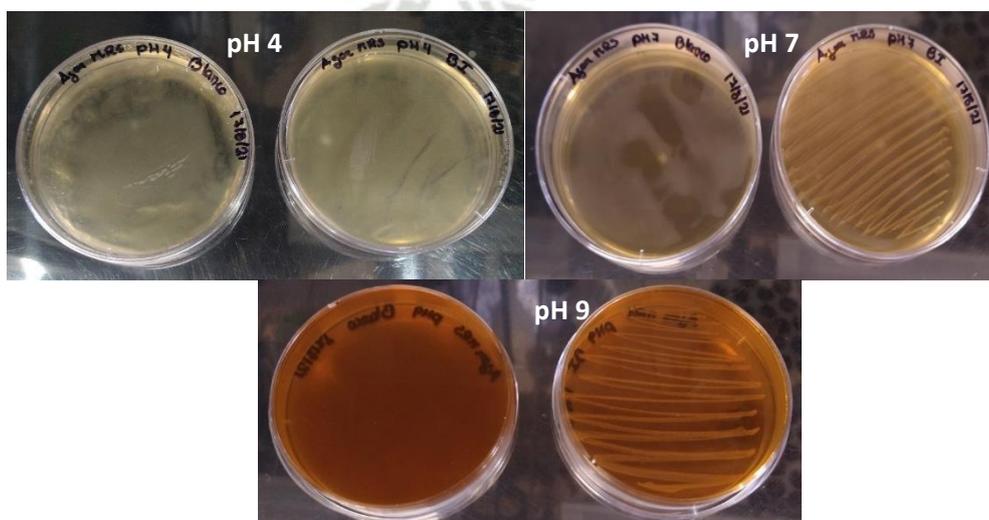


Figura 24. Fotos de las placas de la cepa sometida a distintos pH

Fuente: Elaboración propia

3.2.5. Curvas de crecimiento de las cepas

En la Figura 25 se observa la curva de crecimiento de la cepa *Enterococcus faecalis* y en ANEXOS 2 se adjuntan los datos correspondientes. Según la curva de crecimiento obtenidas la cepa *Enterococcus faecalis* entra a fase de latencia hasta las 4 horas para luego entrar a fase exponencial de alrededor de 21 horas (de 4 a 25 horas). Posteriormente, ingresó a fase estacionaria hasta las 50 horas y finalmente llegar a la fase de decaimiento. En la curva de crecimiento logarítmica se observa mejor las etapas de la curva de crecimiento (Figura 25, b).

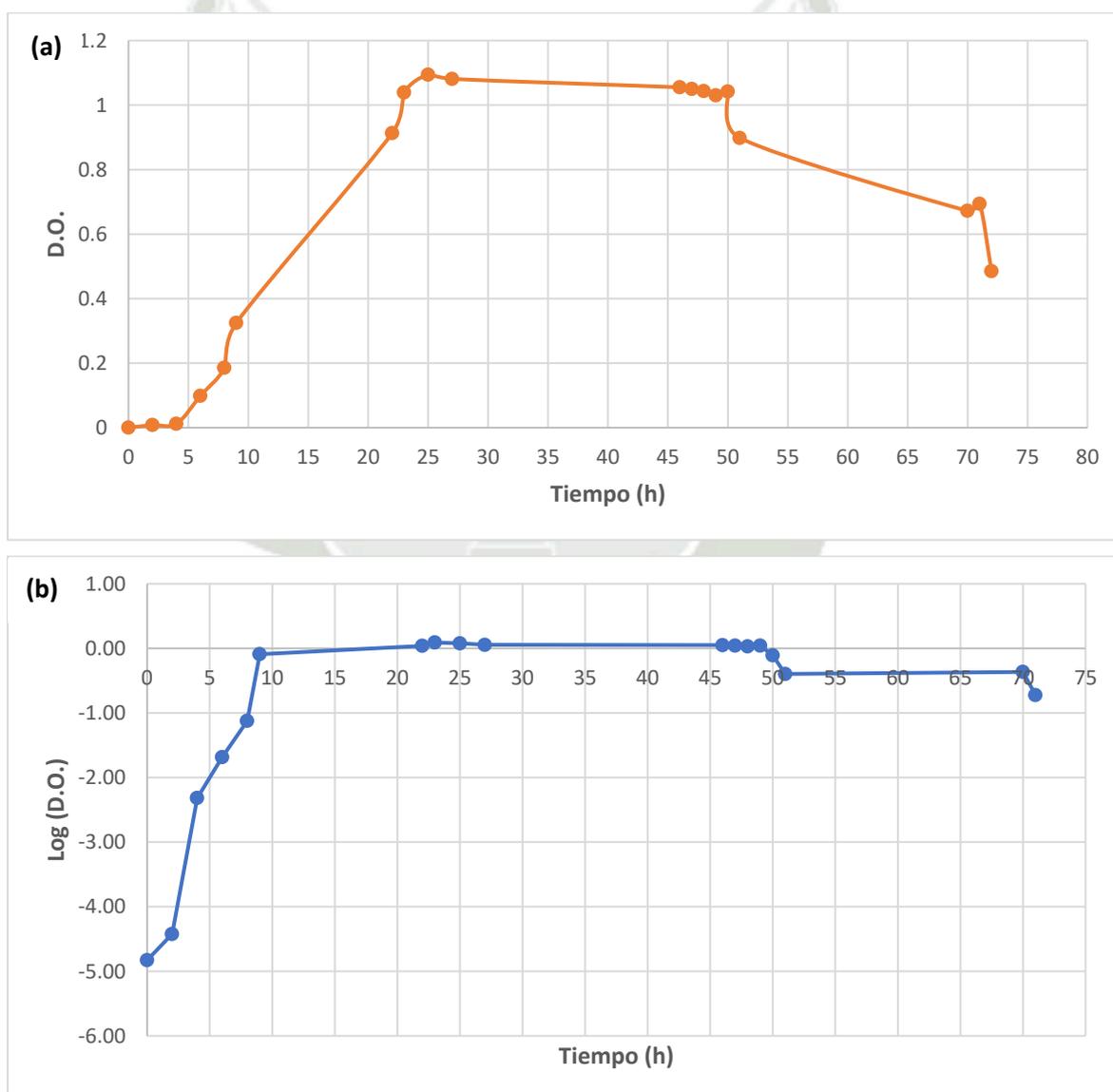


Figura 25. Curvas de crecimiento de la cepa *Enterococcus faecalis* a una temperatura de 32°C con medición de Densidad óptica (a) y densidad óptica normalizada (b)

Fuente: Elaboración propia

3.3. FERMENTACIÓN DEL LACTOSUERO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

3.3.1. Fermentación batch con cepas libres

Como parte de la fermentación batch usando cepas libres se realizó el monitoreo del pH, el cual es mostrado en la Figura 26 tanto para las cepas activadas en caldo MRS previamente durante 24 h en caldo MRS (a) y cepas sin activar (b) para su fermentación en caldo proteinizado y desproteinizado. Los datos correspondientes se muestran en ANEXOS 3 (en caldo desproteinizado sin activar), ANEXOS 4 (en caldo proteinizado sin activar), ANEXOS 5 (en caldo desproteinizado cepas activadas), ANEXOS 4 (en caldo proteinizado cepas activadas).

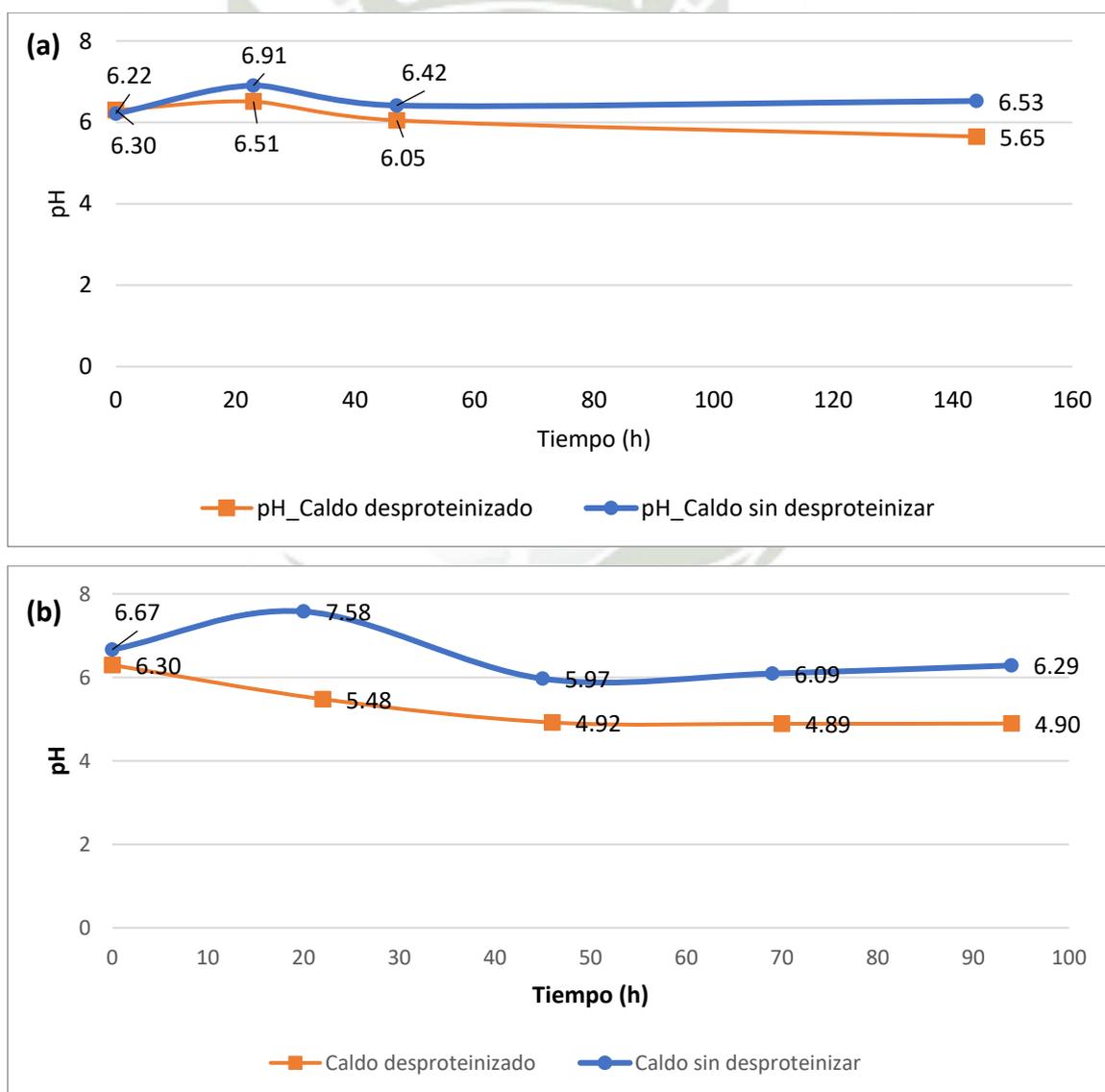


Figura 26. Monitoreo de pH en la fermentación batch usando cepas libres previamente activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteinizado y sin desproteinizar

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en las Figuras 26 (a y b) se observan como en ambos casos el pH varía y se ha visto que tanto para el pH y como en el caso de las cepas activadas en un inicio tienen una tendencia similar al usar lactosuero desproteínizado y proteínizado; sin embargo, a partir de las 48 horas ocurre una variación. En el caso del caldo con lactosuero proteínizado, el pH tiende a neutralizarse mientras que con el lactosuero desproteínizado, el valor tiende a acidificarse llegando a 5.65 ± 1.34 , esto probablemente a que el proceso de desproteínización genera una ligera disminución del pH.

Con respecto al usar cepas sin activar, si se ve una diferencia notoria en el valor de pH al usar un lactosuero desproteínizado y proteínizado en el caldo. En el caldo proteínizado se observa un decaimiento en el valor de pH hasta 5 y luego sigue subiendo ligeramente. Mientras que con el caldo con suero desproteínizado el pH sigue bajando, pero llegando a un valor mínimo de 6.30 ± 0.03 .

En ambas gráficas este valor de pH llega a un valor alrededor de 6 debido a que se le ha agregado otros aditivos para dar un mayor soporte nutricional a la cepa bacteriana.

En la Figura 27 (a y b) se muestra la medición de la acidez que viene a ser una medición indirecta del ácido láctico, que equivale a obtener g de ácido láctico por litro de caldo de fermentación. Tanto para las cepas activadas (a) y sin activar (b), cuando ocurre una disminución del pH ocurre una mayor generación de ácido láctico mientras que cuando el pH empieza a ascender se genera una disminución en la producción de ácido láctico. Este comportamiento se observa claramente ya que el valor máximo de ácido láctico obtenido es de 13.09 ± 1.54 g/L, que ocurre a partir de las 48 horas de fermentación usando cepas sin activar con el valor de pH más bajo (4.90 ± 0.16) en el caldo con el lactosuero desproteínizado.

Si se observa la acidez usando cepas activadas en caldo con lactosuero proteínizado, quien tendría a ser ligeramente más alcalino, es el que tiene la menor generación de ácido láctico lo que es similar al usar cepas no activadas, por lo que, el pH se ve que es un factor importante para permitir o no la generación de ácido láctico.

Este comportamiento del *Enterococcus faecalis* varía respecto a otros trabajos ya que se ha visto que a pH de 4 ocurre la menor generación de ácido láctico; mientras que a pH de 5 se incrementa y sube a su máximo a un pH de 6 y 7, y a pH de 8 disminuye (28). Este comportamiento diferente se observa también en cuanto a las horas de fermentación, siendo la máxima generación a 24 h con 44.34 g/L, pero a un pH de 6 (28).

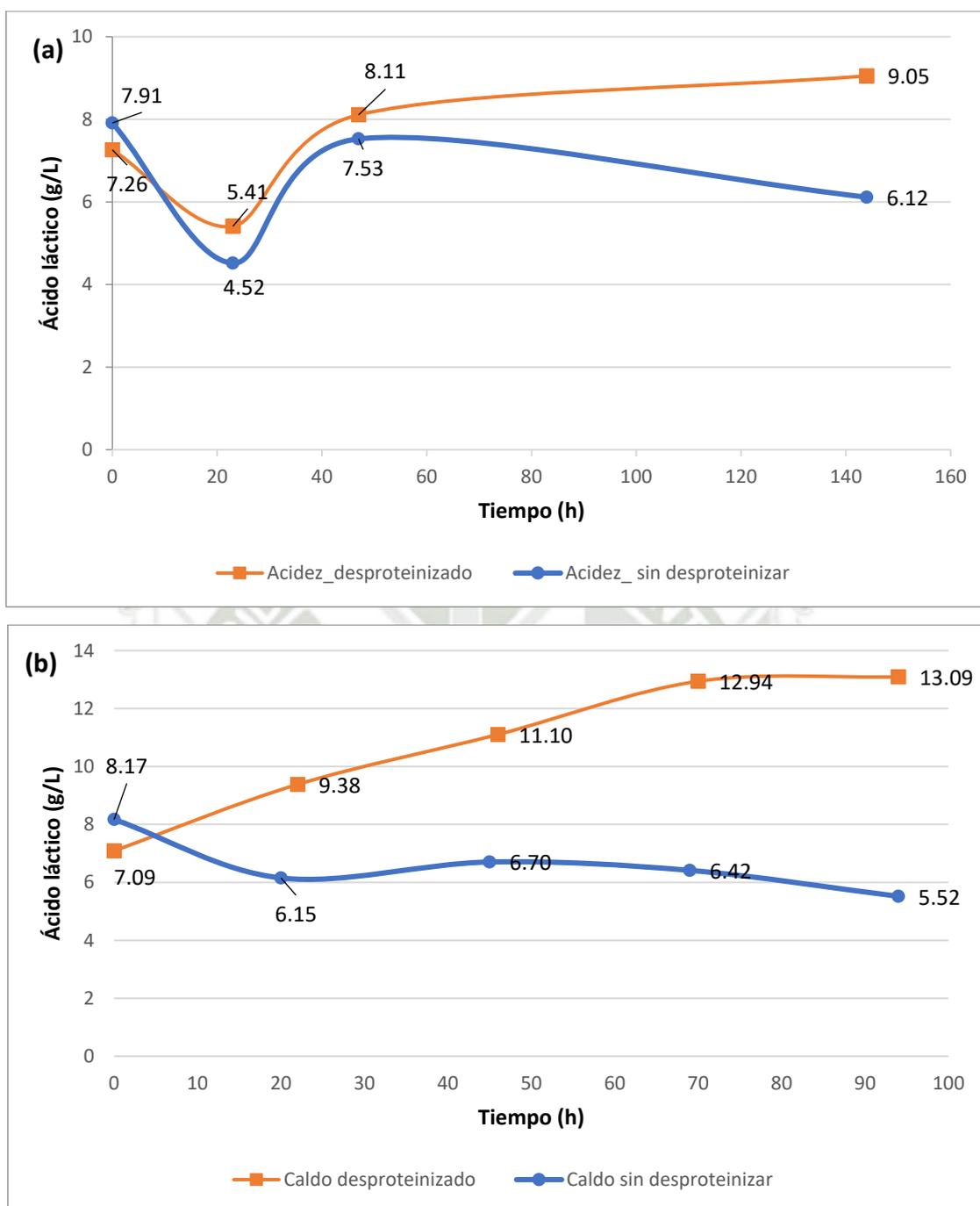


Figura 27. Monitoreo de ácido láctico en la fermentación batch usando cepas libres activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteínizado y sin desproteínizar

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 28 (a y b) se muestra el consumo de lactosa versus la producción de ácido láctico observándose en ambos casos que al haber una disminución de la concentración de lactosa ocurre un incremento en la generación de acidez.

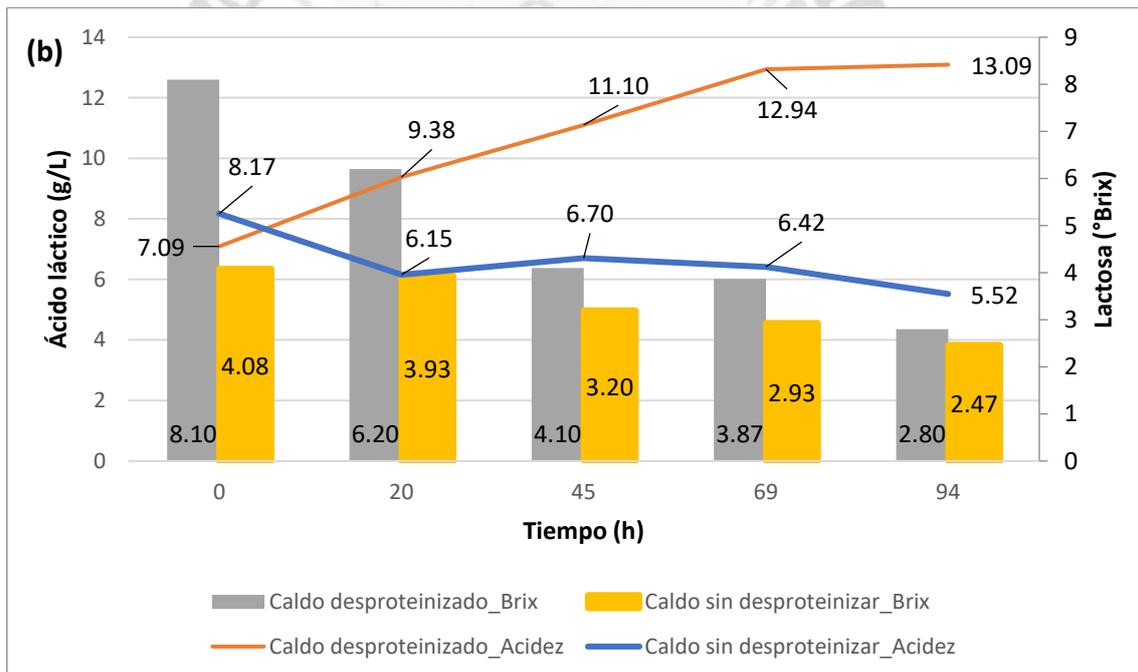
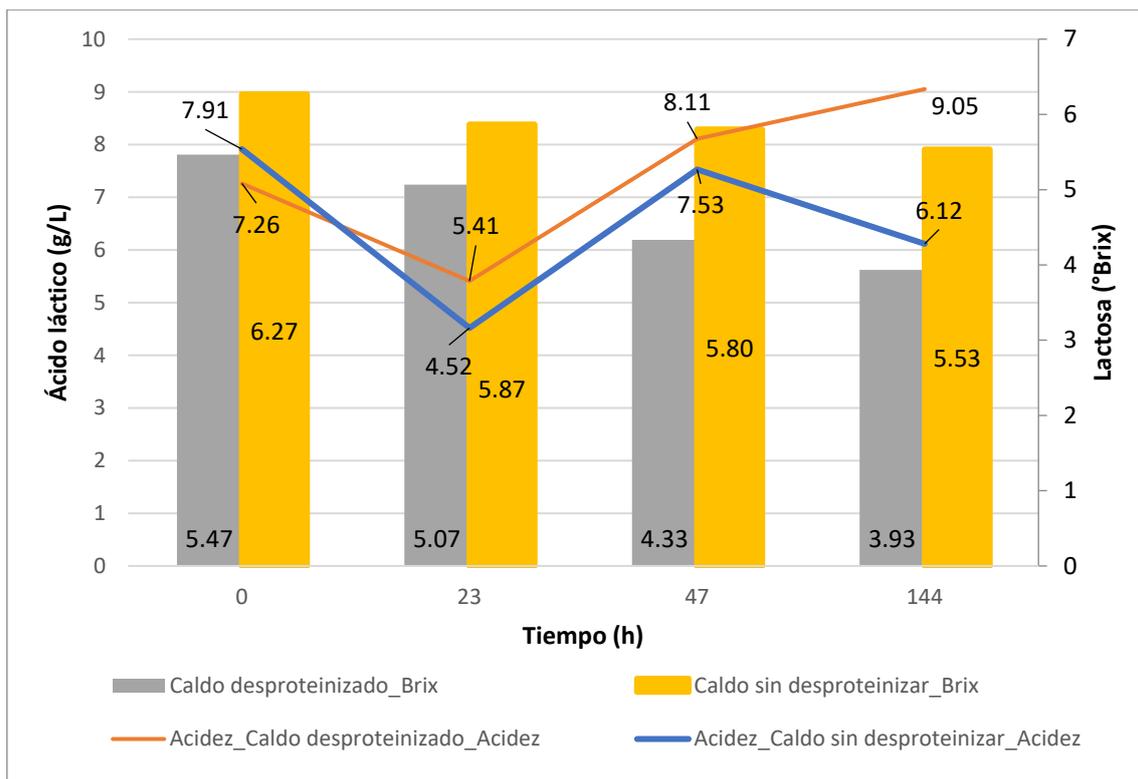


Figura 28. Monitoreo de consumo de lactosa versus producción de ácido láctico en la fermentación batch usando cepas libres activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteínizado y sin desproteínizar

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 28 (b) que es cepa sin activar, se observa cómo hay una mayor reducción de la concentración de lactosa llegando hasta 2.80 ± 0.0 °Brix con una acidez de 13.09 ± 1.54 g/L de ácido láctico partiendo de 8.10 ± 0.0 °Brix en el caldo con

lactosuero desproteínizado; mientras que con el lactosuero proteínizado a pesar de que hay una disminución del lactosa, no hay una generación de ácido láctico, esto debido al pH del medio que se encuentra en el rango neutrófilo lo que se ha visto que desfavorece la producción de ácido láctico.

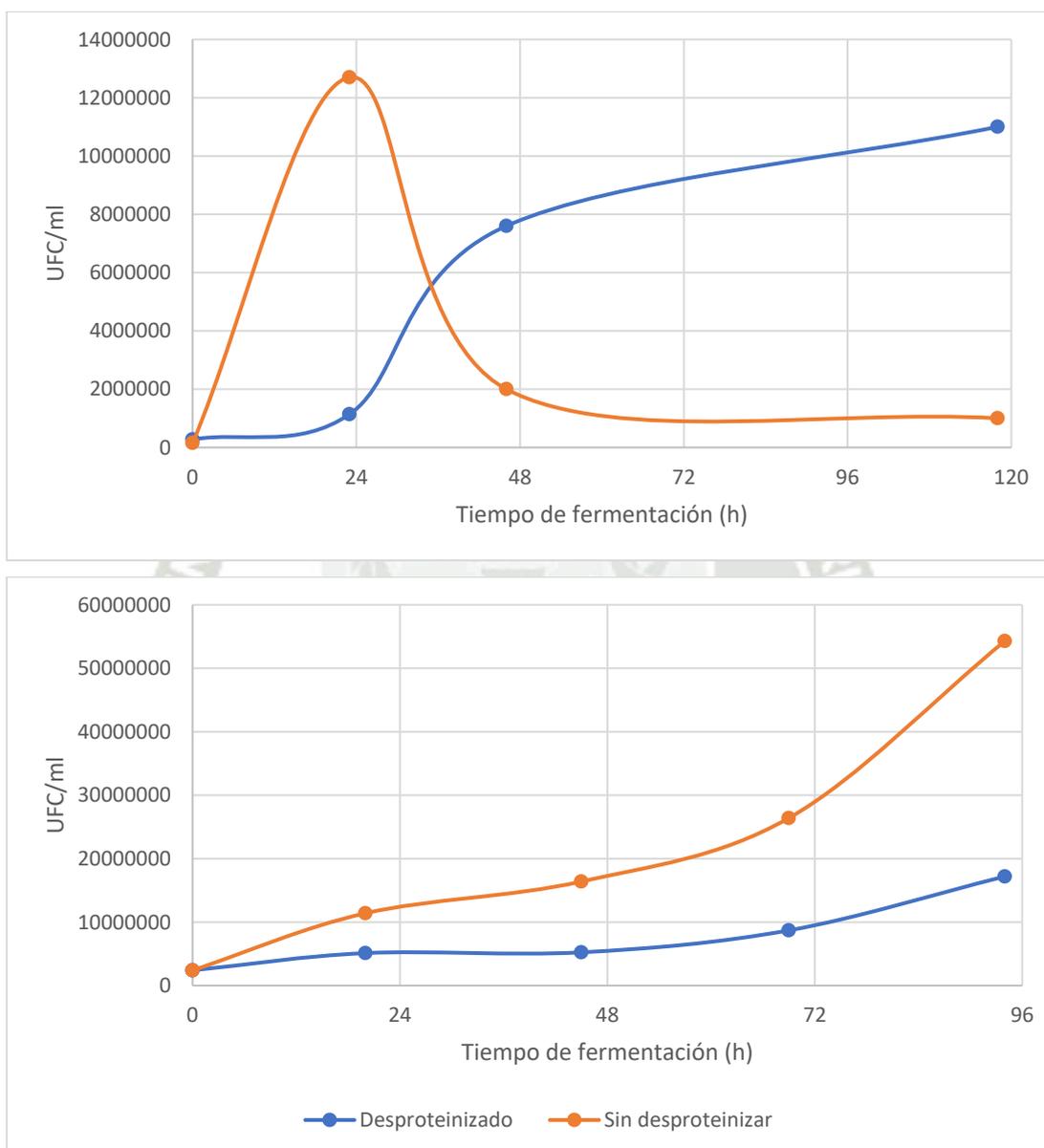


Figura 29. Monitoreo de crecimiento microbiano en la fermentación batch usando cepas libres activadas (a) y sin activar (b) en caldo desproteínizado y sin desproteínizar

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 29 se muestra el crecimiento de la cepa activada y sin activar y como era de esperarse en (a) que corresponde a la cepa activada previamente a las 24 horas para

el caso del caldo con lactosuero proteinizado llega más rápido a la cumbre de la fase exponencial, así como también en el caso del caldo con lactosuero desproteinizado.

Respecto al usar cepas sin activar, en ambos casos se observa la tendencia propia de la curva de crecimiento que va ingresando poco a poco a la etapa exponencial; sin embargo, es importante precisar que a pesar de haber usado cepas activadas no se obtiene un mayor rendimiento en la producción de ácido láctico, lo que sí es obtenido al usarlas sin activar. Este comportamiento de obtener una mayor generación de ácido láctico con cepas sin activar también fue observado por Rojas et al. (13) quienes usaron cepas liofilizadas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* con 72 horas de fermentación.

Por lo tanto, se observa que hay una diferencia en la fermentación usando el lactosuero fresco y desproteinizado, así como el uso de inóculos sin activar o activadas 24 horas antes, siendo más favorable el uso de lactosuero desproteinizado y con las bacterias sin activar, pero en un mayor tiempo de residencia.

3.3.2. Fermentación batch con cepas inmovilizadas

Se realizó el encapsulamiento de la cepa de *Enterococcus faecalis* para determinar si hay alguna diferencia al usarlas de forma libre. Al igual que el caso previo se realizó el monitoreo de pH, acidez y grados Brix. Los datos correspondientes se muestran en ANEXOS 7 (en caldo proteinizado) y ANEXOS 8 (en caldo desproteinizado).

En la Figura 30 se muestra el monitoreo del pH al usar perlas al 4% y 5% de concentración de cloruro de calcio ya que una determinada concentración de cloruro de calcio y de alginato de sodio generan una mayor o menor estabilidad de las perlas de alginato que contienen a las cepas. Se realizó a esa concentración y en lactosuero sin desproteinizar y desproteinizado debido a que al usar el caldo previamente preparado (lactosuero, carbonato de calcio, extracto de levadura y fosfato de amonio), la estabilidad de las perlas era casi nula, es decir, se deshacían las perlas durante la etapa de fermentación. Por lo que, se determinó no usar aditivos complementarios y se obtuvo buenos resultados en cuanto a la estabilidad de las perlas elaboradas.

Con respecto a los valores de pH se observa diferencia con las pruebas usando cepas libres, ya que al adicionar los aditivos complementarios generaron un incremento del pH. En estos casos se observa como la concentración de cloruro de calcio genera una variación en la tendencia del pH, así como el utilizar el lactosuero desproteinizado o sin

desproteínizar, lo que indica que la presencia de las grasas, proteínas y demás componentes del lactosuero influyen en el comportamiento de las cepas y por ende en la producción del ácido láctico.

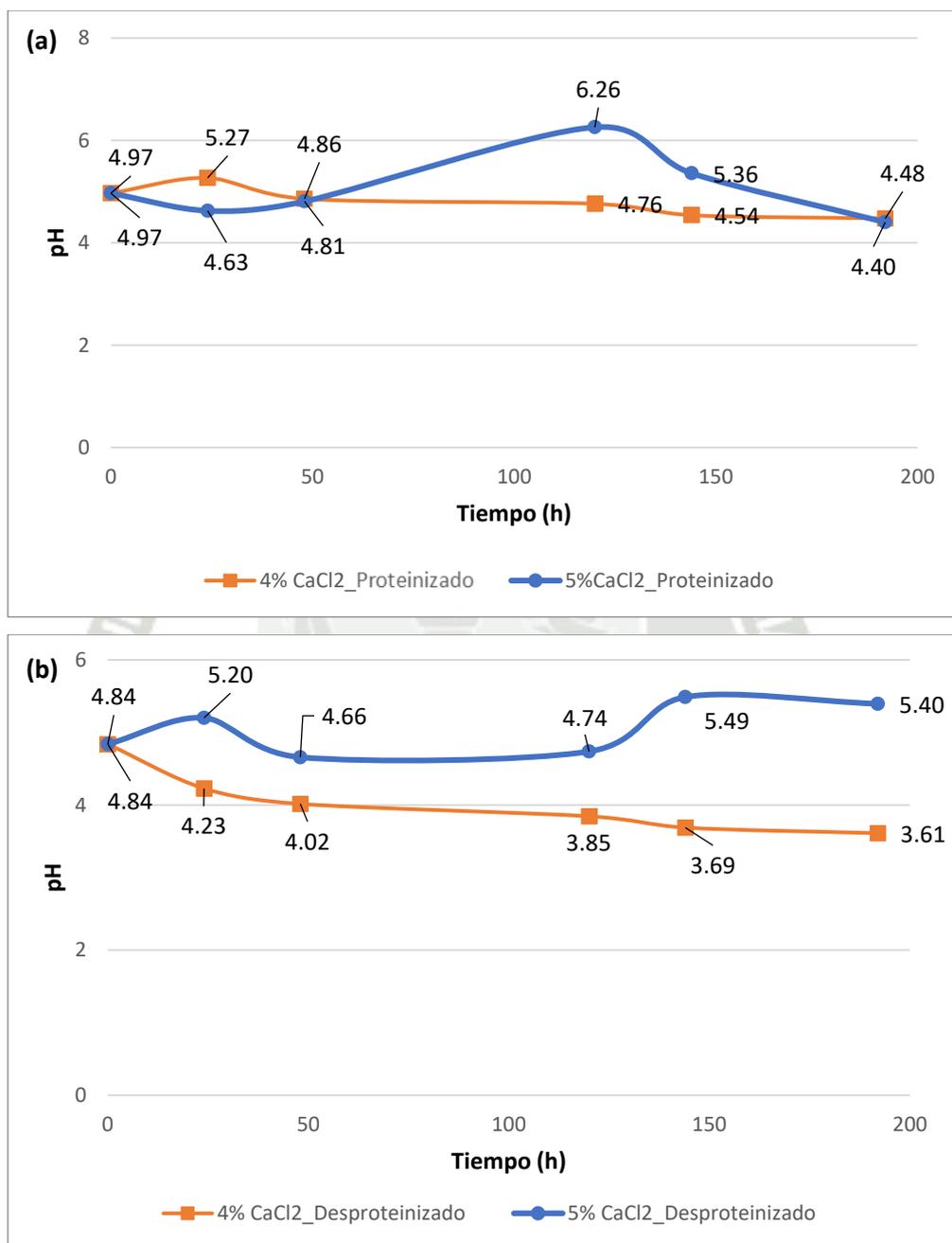


Figura 30. Monitoreo de pH en la fermentación batch usando cepas encapsuladas al 4% y 5% de CaCl₂ en caldo sin desproteínizar (proteínizado) en (a) y desproteínizado (b)

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la Figura 30 en el lactosuero desproteínizado y proteinizado al usar perlas de alginato elaboradas al 4% CaCl₂ ocurre una tendencia a disminuir el pH,

mientras que con el lactosuero proteinizado y desproteinizado al 5% hay una tendencia a subir el pH. Como se observó en el caso de las cepas libres, al usar las cepas encapsuladas y éstas estar expuestas a un pH que tiende a la neutralidad, no ocurre la generación de ácido láctico, como es el caso del lactosuero proteinizado al 5% de CaCl_2 hay una generación de ácido láctico de 6.00 g/L a 4.63 de pH y una caída drástica de ácido láctico (2.01 g/L) a un pH de 6.26. Siendo para el caso del lactosuero proteinizado donde no se ha generado una alta acidez, es decir, no ha habido una generación de ácido láctico (Figura 31).

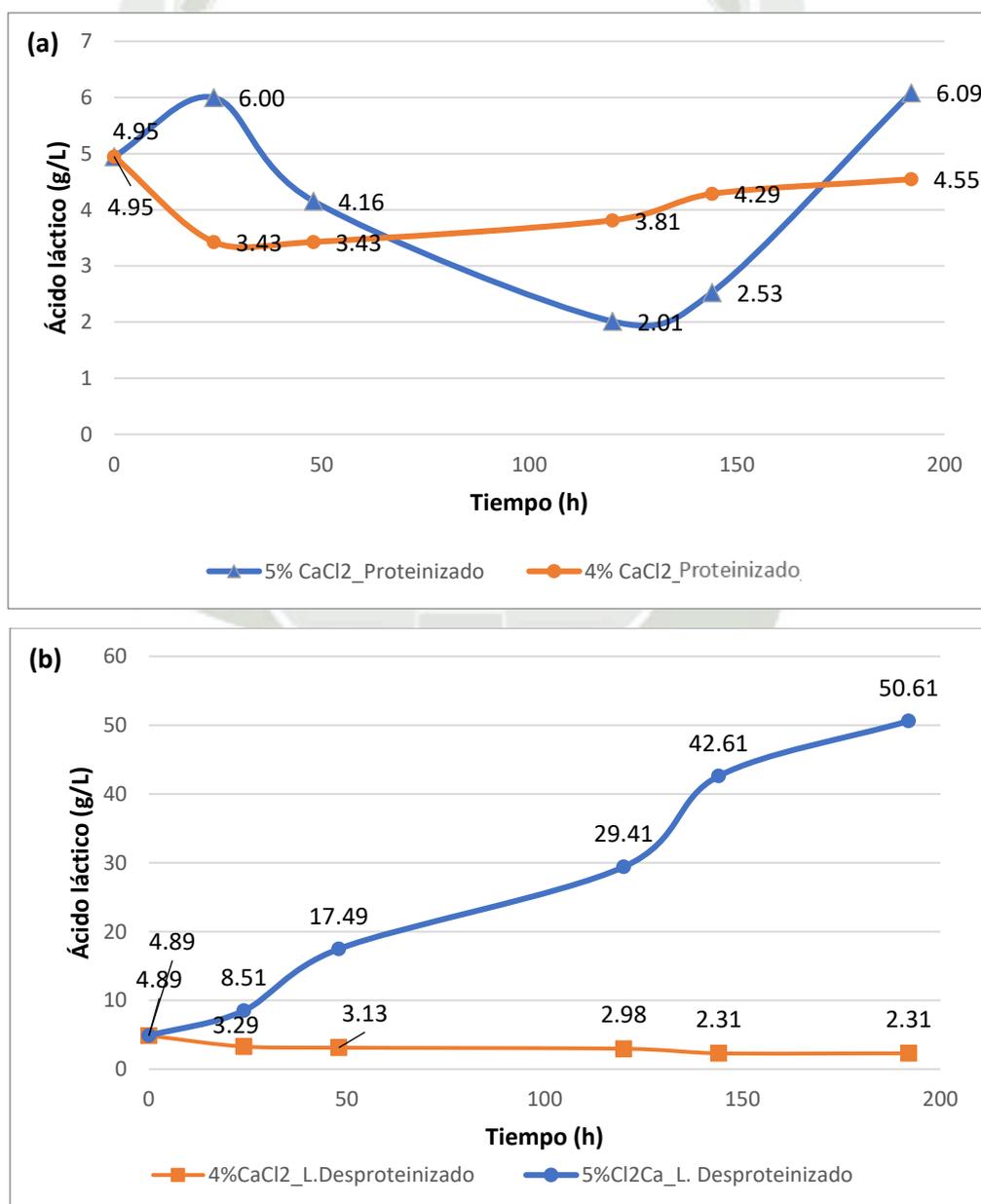


Figura 31. Monitoreo de ácido láctico en la fermentación batch usando cepas encapsuladas al 4% y 5% de CaCl_2 en caldo sin desproteinizar (proteinizado) (a) y desproteinizado (b)

Fuente: Elaboración propia

Mientras que con el lactosuero desproteínizado, se ha generado una elevada producción de ácido láctico llegando hasta 50.61 ± 34.94 g/L en un pH que va de 4.84 a 3.61. Por lo tanto, el pH óptimo de crecimiento sería entre 3.5 a 5 para la cepa *Enterococcus faecalis*, ya que a ese rango de pH se ha obtenido un mayor rendimiento de ácido láctico a diferencia de haberse usado el caldo con lactosuero proteínizado y los demás suplementos donde el pH llegó casi a la neutralidad (de 6.22 a 6.53) y la generación de ácido láctico fue limitada. Esto debido a que la influencia del pH en la generación de ácido láctico es muy importante, ya que afecta en dos aspectos del metabolismo microbiano que es el metabolismo de las enzimas y el transporte de los nutrientes dentro de las células (32).

En la Figura 32 se observa el consumo de lactosa por parte del *Enterococcus faecalis* encapsulado en las perlas de alginato en lactosuero proteínizado y desproteínizado. Respecto al lactosuero proteínizado, se observa que donde ha ocurrido una disminución de lactosa ha ocurrido mayor generación de ácido láctico (5% de CaCl_2 usado para elaborar las perlas). Mientras que al usar el 4% de CaCl_2 para el encapsulamiento, se genera el menor consumo de lactosa y menor cantidad de ácido láctico.

Cabe indicar que respecto al consumo de lactosa, si se toma los datos de lactosa consumida en ambos casos, usando el lactosuero proteínizado hay un ligero mayor consumo que con el lactosuero desproteínizado, 1.73°Bx (1.73 g de lactosa por 100 g de lactosuero) usando el lactosuero proteínizado frente a 1.53°Bx con el lactosuero desproteínizado al 4% CaCl_2 y al 5% de CaCl_2 se consumió 3.33°Bx usando lactosuero proteínizado frente a un 2.60°Bx en el lactosuero desproteínizado. Esto probablemente debido al pH del medio que no es favorable para un ambiente óptimo para que ocurra un mayor metabolismo de la lactosa, lo que si se observó en el lactosuero desproteínizado, donde a pesar de que hay una diferencia en el consumo de la lactosa, se obtuvo la mayor generación de ácido láctico.

Asimismo, se observa que la cantidad de ácido láctico obtenido con las cepas encapsuladas en perlas de alginato y como sustrato únicamente al lactosuero desproteínizado es la más alta con respecto al usar las cepas libres tanto en caldo proteínizado y desproteínizado. Este comportamiento, donde al usar las cepas de forma encapsulada se generó un mayor rendimiento de ácido láctico con cepas de *Enterococcus* aisladas de lactosuero, fue observado por Dosuky et al. (24) donde se obtuvo 41 ± 0.4 g/L

a las 96 horas de incubación, usando al *Enterococcus* encapsulado frente al usarlo sin encapsular donde obtuvieron 16.27 ± 0.09 g/L.

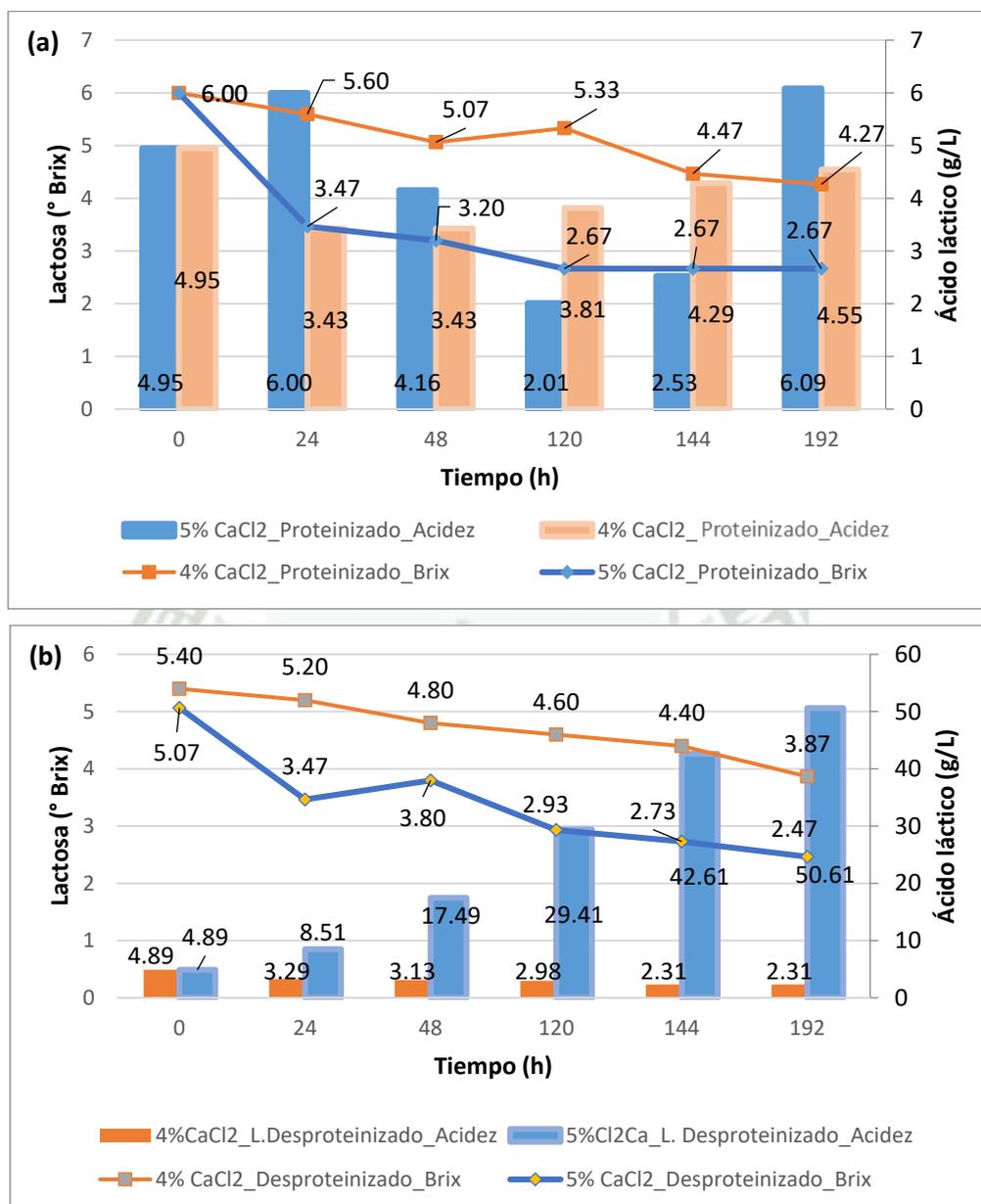


Figura 32. Monitoreo de consumo de lactosa versus producción de ácido láctico usando cepas encapsuladas al 4% y 5% de CaCl₂ en caldo sin desproteinar (proteínizado) (a) y desproteínizado (b)

Fuente: Elaboración propia

Cabe mencionar que en el presente trabajo se ha generado un valor mucho mayor con un máximo de 50.61 ± 34.94 g/L frente a cepas sin ser encapsuladas con un 13.09 ± 1.54 g/L de ácido láctico. Asimismo, es importante hacer notar que la mayor producción de ácido láctico ha sido usando el lactosuero desproteínizado tanto para las cepas libres como cepas inmovilizadas.

Por lo que, se puede diferir que la cepa aislada de *Enterococcus faecalis* genera una mayor producción en lactosuero desproteínizado y aún más cuando no se le adiciona nutrientes. Esto varía en función a otras bacterias como algunos del género *Lactobacillus* donde se ha determinado que únicamente el uso del lactosuero limita la producción de ácido láctico, es por ello, que se ha visto la importancia de la suplementación de nutrientes al lactosuero (2), (13); contrario a lo que se observa en el presente trabajo ya que este requerimiento va a depender del microorganismo y sustrato.

3.4. PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

3.4.1. Rendimiento obtenido en la purificación del ácido láctico

En la Tabla 14 se muestran los rendimientos después de la purificación del ácido láctico según las condiciones de concentración de ácido láctico indicado en el procedimiento.

Tabla 14. Rendimientos en la purificación de ácido láctico según las diferentes condiciones de concentración

CÓDIGO	MUESTRAS	Volumen inicial de caldo (ml)	Ácido láctico (ml)	Rendimiento (%)	Densidad (g/ml)	COLOR
P3_60°C_45'	Desproteínizado_ Sin activar_ <i>Enterococcus faecalis</i>	39	2.4	6.15	0.72	Amarillento
P3_45°C_5 h		40	1.1	2.75	0.98	Amarillento
P3_40°C_1 h		13	2.2	16.92	0.77	Amarillento
P3_40°C_5 h		11	0.7	6.36	1.22	Transparente
P7_45°C_5 h	Desproteínizado_ <i>Enterococcus faecalis</i> _Perla _5% cloruro calcio	42	3.5	8.33	0.69	Amarillento
P7_60°C_45'		41	1.2	2.93	1.09	Blanquecino
P7_40°C_1 h		40	1.2	3.00	0.74	Blanquecino
P7_40°C_5 h		39	2	5.13	0.81	Transparente

Fuente: Elaboración propia

Se realizó un análisis de las condiciones de purificación, ya que el uso de temperaturas en el proceso de purificación a condiciones normales y sin presión es ineficiente para recuperar el ácido láctico de un caldo de fermentación (como se realizó en la presente tesis), por lo que, se realizó un juego de temperaturas y tiempos y claramente se observa como el uso de estas temperaturas influye en el rendimiento de

obtención del ácido láctico separado del medio de cultivo, así como las características del ácido láctico obtenido (color y densidad). Además, es importante indicar que con respecto a la muestra P3 (caldo con lactosuero desproteinizado con *Enterococcus faecalis* sin activar) obtuvo un mayor rendimiento de 16.92% a 40°C por 1 hora de concentración en el rotavapor, con un color amarillento y respecto a la muestra P7 se obtuvo el mayor rendimiento de 8.33% a 45°C por 5 horas (como se observa en la Figura 33).

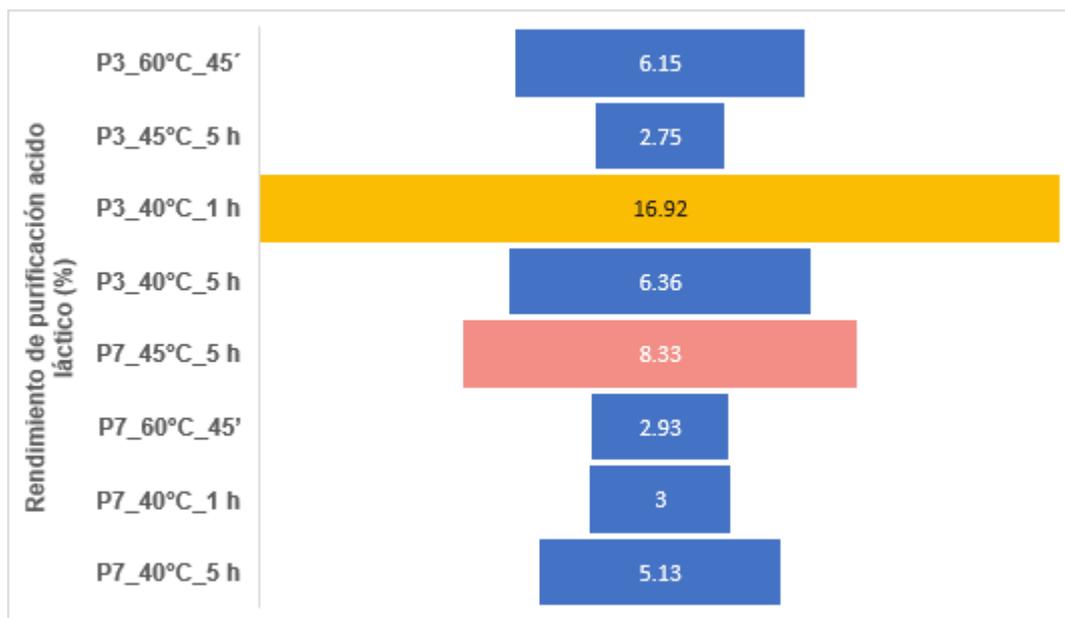


Figura 33. Rendimiento obtenido en la purificación del ácido láctico usando las dos condiciones de síntesis con mayor rendimiento (P3: desproteinizado sin activar y P7: desproteinizado al 5% CaCl₂)

Fuente: Elaboración propia



Figura 34. Muestras de ácido láctico purificadas

Nota: Muestra 1: P3_60°C_45Min; Muestra 2: P3_40°C_1h; Muestra 7: P7_45°C_5h y Muestra 8: P7_40°C_5h

Fuente: Elaboración propia

Asimismo, se observa diferencia en el color, obteniéndose colores blanquecinos, amarillentos (Figura 34) y esto también se presentó en ácido láctico obtenido por cepas homofermentativas y purificada por un proceso de microfiltración (17). Sin embargo, se menciona que usando a la nanofiltración se obtiene un color más claro y por ósmosis inversa se obtiene un color transparente, además de que esto genera una mayor concentración de ácido láctico (17).

Esta variación en el color se presentó también al usar la cepa del *Lactobacillus casei* encapsuladas en un lecho empacado y a una temperatura de fermentación de 45°C usando un lactosuero dulce (pH 6.8) donde obtuvieron un ácido láctico amarillo rojizo con una densidad de 1.1 g/ml (1) cuyas características son diferentes no solo desde el color sino también de la densidad. Asimismo, usando el *Lactobacillus casei* a 40.2°C sin suplementar al lactosuero dulce y durante 3 días de fermentación, produjo ácido láctico amarillento de 1.10 g/ml de densidad (2). Por lo que, se confirma como las condiciones de fermentación, cepas usadas en la fermentación y modo de uso (cepas libres y encapsuladas), generan variación en el rendimiento del ácido láctico obtenido, color y densidad.

Adicionalmente, es importante mencionar que, en el presente trabajo, se ha observado lo indicado por Orozco Olivarez (17), quien precisó que la etapa de purificación del ácido láctico en muestras de suero fresco o proteinizado es más difícil debido a la falta de desproteínización y filtración previa, lo que se ha observado también en la etapa de purificación, además de que al no usar cepas encapsuladas la etapa de filtración ha sido más lenta que al usar las cepas encapsuladas. Por lo que, el uso de lactosuero desproteínizado o sin desproteínizar, así como, de cepas libres o encapsuladas, favorece al tiempo en que demora la purificación del ácido láctico.

3.4.2. Caracterización por ensayo de FTIR del ácido láctico purificado

En la Tabla 15 se muestran las muestras seleccionadas con el mayor rendimiento y el código respectivo para su análisis FTIR.

Tabla 15. Rendimientos en la purificación de ácido láctico según las diferentes condiciones de concentración

MUESTRAS	CÓDIGO	Rendimiento (%)	COLOR	FTIR MUESTRA CÓDIGO
Desproteínizado_Sin activar_ <i>Enterococcus faecalis</i>	P3_60°C_45Min	6.15	Amarillento	Muestra 1
	P3_40°C_1h	16.92	Amarillento	Muestra 2
Desproteínizado_ <i>Enterococcus faecalis</i> _encapsulado _ 5% CaCl ₂	P7_45°C_5h	8.33	Amarillento	Muestra 7
	P7_40°C_5h	5.13	Transparente	Muestra 8

Fuente: Elaboración propia

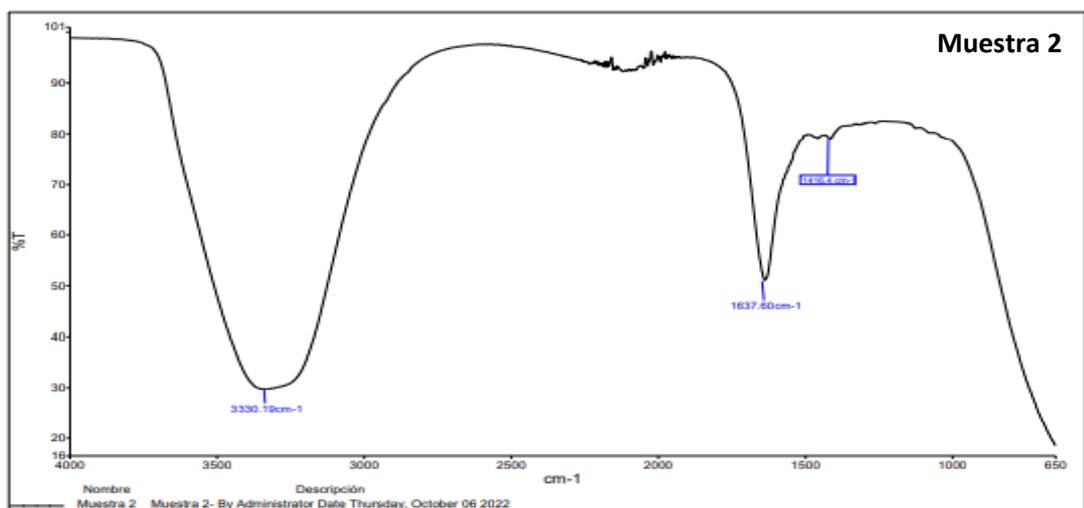
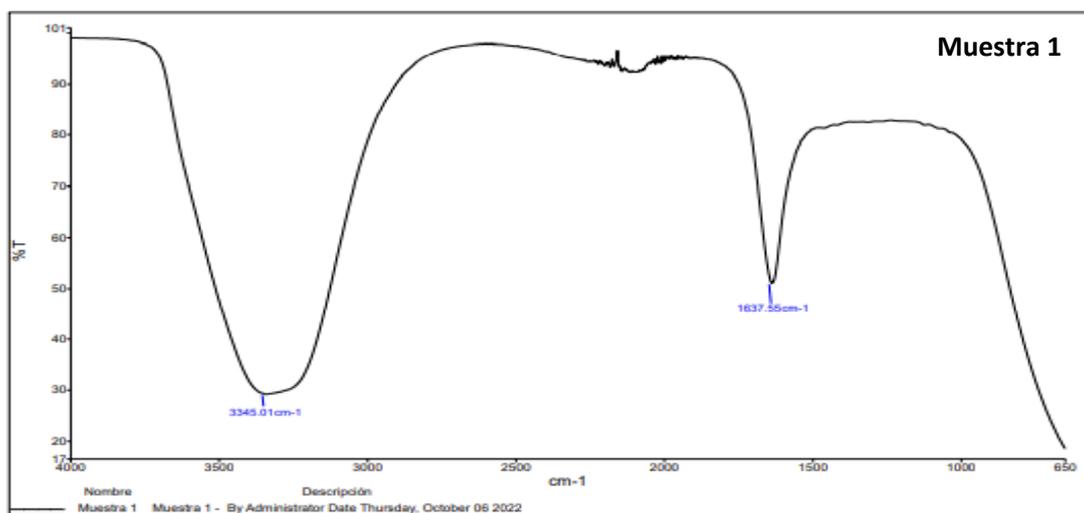


Figura 35. Espectro de FTIR de muestras 1 (P3_60°C_45 Min) y 2 (P3_40°C_1 h)

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 35 se observa las muestras 1 y 2 que tienen el mismo origen proveniente del caldo desproteínizado e inoculado con *Enterococcus faecalis* sin previa activación. Al variar las condiciones de purificación, si se compara ambos espectros, aparece otro pico; sin embargo, al mirar la región por encima de 1400 cm^{-1} es donde se permite determinar de una forma más específica a los grupos funcionales, mientras que a valores menores de 1400 puede ocurrir la superposición de grupos funcionales. Por lo que, se observa una banda gruesa en la región entre 3000 a 3500 cm^{-1} que corresponde al OH, mientras que el pico agudo en 1637 cm^{-1} indica la presencia del C=O. Además, al variar la condición se acentúa la señal y aparece ligeramente un pico correspondiente al grupo C-H (1456 cm^{-1}). Esta variación y valor del grupo carboxilo permite presumir que ambos corresponden al L-ácido láctico según lo indicado por Karande et al. (33) quien obtuvo una presencia de C=O alrededor de 1651.07 cm^{-1} pero al variar los picos a diferencia del ácido láctico puro indica que hay algunas impurezas. Si se compara la muestra 1 y 2 con el espectro de un ácido láctico puro éste presenta una banda a 1458.26 cm^{-1} (2) mientras que lo mostrado por Devi et al. (34) indica su presencia a 1457.33 cm^{-1} en el espectro de ácido láctico puro, lo que, si se observa en la muestra 2, por lo que se podría presumir que este tendría más pureza y a su vez resaltar que a esta condición se generó un mayor rendimiento de ácido láctico (Tabla 15).

En la Figura 36 se observan los espectros de las muestras 7 y 8, las cuales corresponden al ácido láctico obtenido a partir del lactosuero desproteínizado y con cepas de *Enterococcus* encapsuladas en perlas de alginato. Para ambas muestras se observa el pico característico de OH a 3351.42 cm^{-1} (muestra 7) y a 3377.92 cm^{-1} (muestra 8), el grupo C=O a 1703.10 cm^{-1} y 1641.79 cm^{-1} (muestra 8) y a 1638.27 cm^{-1} (muestra 7), el grupo C-H en los picos 1392.74 cm^{-1} (muestra 7) y a 1387.84 cm^{-1} (muestra 8). En la muestra 8 se observa un pico a 1268.93 cm^{-1} que corresponde al grupo C-O-C y este mismo grupo se presenta en la muestra 7 pero a una menor intensidad (1277.22 cm^{-1}). Entre estas dos muestras se selecciona a la muestra 8 que posee el pico a 1703.10 cm^{-1} ya que este pico es característico del grupo C=O del ácido láctico, por lo que, probablemente pueda tener una mayor pureza de 85% de ácido láctico (LD), esto debido a que los picos característicos a 1723 cm^{-1} (C=O) y 1120 cm^{-1} del grupo C-O (35). Según el pico a 1120 cm^{-1} que corresponde al ácido (DL) láctico al 85% de pureza (35) se podría presumir que ese es el tipo de ácido láctico obtenido.

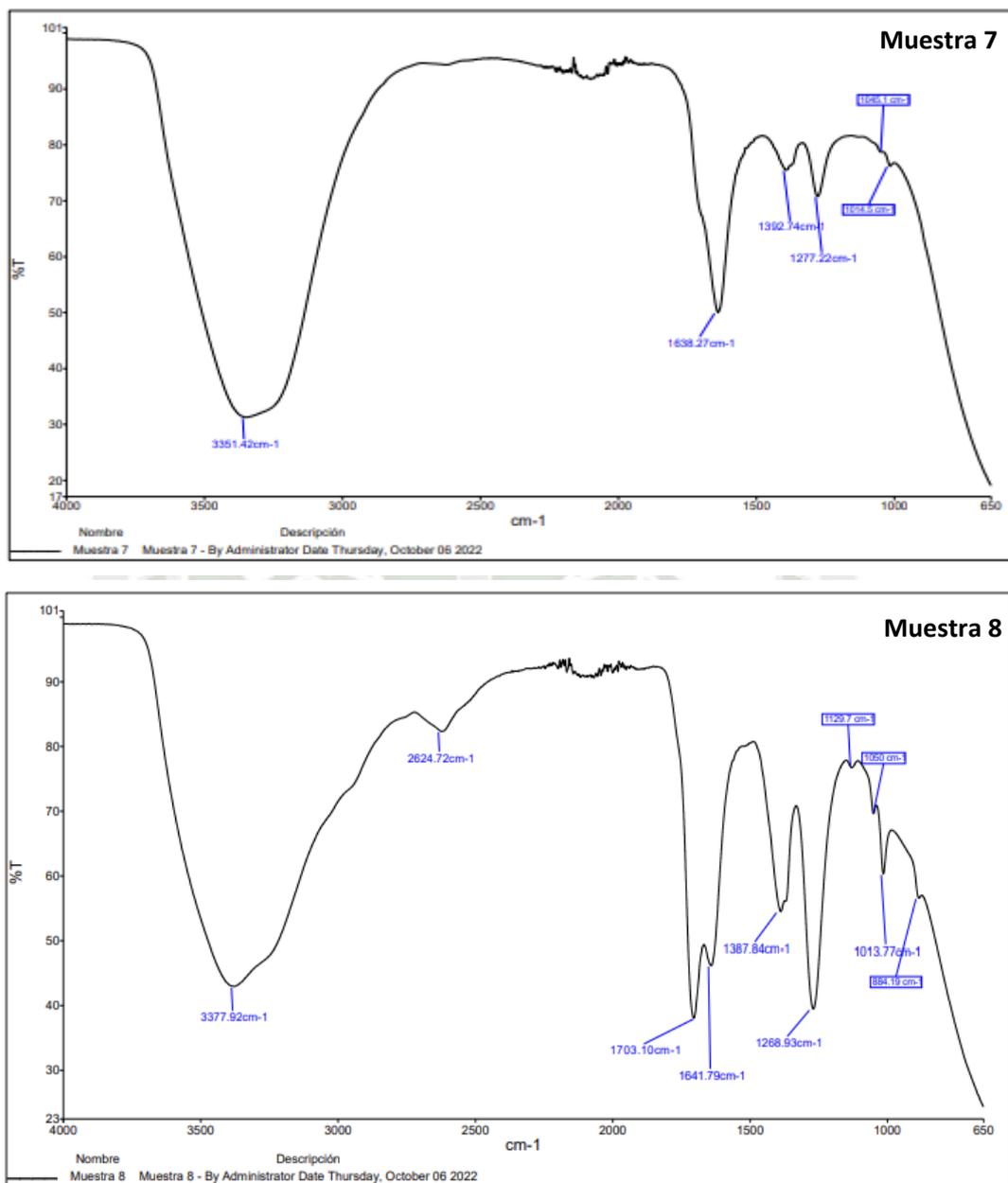


Figura 36. Espectro de FTIR de muestras 7 (P7_45°C_5h) y 8 (P7_40°C_5h)

Fuente: Elaboración propia

Es importante mencionar que a la condición de 40°C por 5 horas usando cepas encapsuladas aparece un pico de intensidad baja a 2620.26 cm⁻¹ y a 2624.72 cm⁻¹ que corresponde al grupo OH lo que no está presente en el resto de los espectros, esto permite confirmar que el uso de cepas encapsuladas o de forma libre varía en la pureza y características del ácido láctico obtenido. En todas las muestras se confirma la obtención de ácido láctico.

Estos resultados permiten diferir que el lactosuero sí puede ser utilizado para generar ácido láctico, cabe mencionar, que este lactosuero es propio de la región de Arequipa, proveniente de la elaboración del queso. Lo que a su vez genera que se le pueda brindar un valor agregado a un residuo lácteo que muchas veces es eliminado, ocasionando una alta contaminación del suelo y agua debido a su elevada cantidad de proteínas y grasas.

Asimismo, se ha determinado la obtención de ácido láctico usando a la biotecnología a través de un proceso de fermentación con cepas bacterianas aisladas del mismo lactosuero, lo que abarataría los costos de producción.

Por lo tanto, esta metodología propuesta podría ser replicada no solo en nuestro mercado local sino en otras ciudades como las del norte del Perú, que también son ganaderas. Esta aplicación como una propuesta de un modelo de negocio no solo podría darse para las empresas lácteas locales pequeños, sino también, en las industrias lácteas grandes cuyo problema principal es no poder tratar sus aguas residuales industriales provenientes de sus procesos. Lo que conllevaría no solo a un beneficio económico sino a una contribución a la minimización de los impactos ambientales generados por el lactosuero.

CONCLUSIONES

- El encapsulamiento o inmovilización de las cepas homofermentativas (cepas nativas), resultó un método adecuado para optimizar la producción de ácido láctico a partir de lactosuero por fermentación batch. Además de permitir el incremento de la retención y densidad celular, reducción de la fase de latencia microbiana, tolerancia a altas concentraciones de azúcar, control de pH y facilitar la purificación del ácido láctico.
- Se recolectó y caracterizó física y químicamente el lactosuero cuya composición está conformada por lactosa (3.41%), proteínas (0.81%) y grasas (0.85%) con un pH de 5.00. Además, se realizó la desproteínización del lactosuero a través del autoclavado, filtración, centrifugación y filtración al vacío, generando la remoción de las proteínas (0.04 %) y grasas con una ligera variación en los valores de acidez, cenizas y lactosa con un pH de 4.84.
- Se aisló una cepa a partir del lactosuero que corresponde al *Enterococcus faecalis* que es un coco, catalasa negativa y gram positivo.
- Se determinó sus condiciones óptimas de crecimiento que son crecimiento a 32°C, es neutrófila y alcalófila con una tolerancia a la salinidad hasta 4% de NaCl.
- Se realizó la fermentación batch usando el *Enterococcus faecalis* no encapsulado (de forma libre) y encapsulado, en lactosuero desproteínizado y proteínizado. Se determinó que la cepa del *Enterococcus faecalis* presentó una mayor generación de ácido láctico en lactosuero desproteínizado tanto de forma libre como encapsulada. La mayor generación de ácido láctico se consiguió con cepas inmovilizadas a un 5% de CaCl₂ y 3% de alginato de sodio durante 1 hora de estabilización, consiguiéndose 50.61 g/L de ácido láctico con un pH de fermentación que varió

entre 3.5 a 5 usando como medio de cultivo al lactosuero desproteínizado sin complementos nutricionales. En forma libre, la cepa del *Enterococcus faecalis* presentó una generación de 13.09 ± 1.54 g/L de ácido láctico a un pH de 4.90, mientras que, al subir el pH se observó un decaimiento en la generación de ácido láctico, usando la cepa sin activar previamente.

- Se purificó al ácido láctico siendo las condiciones óptimas para el caldo con lactosuero desproteínizado con la cepa sin activar y sin ser encapsulada a 40°C por 1 hora para la concentración de ácido láctico obteniéndose un rendimiento de 16.92%. Mientras que al usar lactosuero desproteínizado con cepas encapsuladas (5% CaCl₂) a 45°C por 5 horas con un rendimiento de purificación del 8.33%. Se caracterizó el ácido láctico por espectroscopía infrarroja donde se pudo observar picos característicos del ácido láctico (grupo OH, C=O y CH) en todos los espectros, por lo que, en todos los casos se obtuvo ácido láctico. Habiendo diferencias con la presencia de algunos picos cuando se usa el *Enterococcus faecalis* en forma libre y encapsulada en perlas de alginato, así como en las distintas condiciones de concentración para la purificación. Por lo que, se confirma que la disposición de la cepa usada (en forma libre o encapsulada), uso de lactosuero sin tratar y desproteínizado y las condiciones de purificación influyen en las características y rendimientos del ácido láctico obtenido (color, densidad y presencia de otros grupos funcionales en el mismo). Se presume que según los espectros se ha obtenido ácido láctico (L) y ácido láctico (DL).

RECOMENDACIONES

- Realizar la fermentación batch usando las cepas del *Enterococcus faecalis* no encapsuladas (en forma libre) en lactosuero desproteínizado sin adicionar complementos nutricionales como el carbonato de calcio, fosfato de amonio y extracto de levadura, ya que se obtuvo una elevada generación de ácido láctico al usar a la cepa encapsulada.
- Se puede usar enzimas adicionales al usar lactosuero proteínizado para facilitar la asimilación de la lactosa por la cepa de *Enterococcus faecalis*.
- Usar un cultivo mixto de BAL para determinar si se genera un mayor rendimiento de ácido láctico usando el lactosuero proteínizado o desproteínizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Novoa Arroyo C. Obtención de ácido láctico por el método de células inmovilizadas del *Lactobacillus casei* [[Tesis de pregrado]]. Universidad Técnica del Norte; 2019.
2. Flores Tixicuro JM. Optimización estadística de la producción de ácido láctico a partir de lactosuero por *Lactobacillus casei* [Tesis de pregrado]. Universidad Técnica del Norte; 2020.
3. Salazar A, Oblitas Cruz J, Rojas E. Reutilización del LACTOSUERO ácido y dulce de las queserías de Cajamarca en la elaboración de una bebida con sabor a poroporo (*Passiflora Mollisima*) y sauco (*Sambucus Peruviana*). *Agroindustrial Science*, ISSN-e 2226-2989, Vol 6, N° 1, 2016 (Ejemplar dedicado a: *Agroindustrial Science*), págs 45-51. 2016;6(1).
4. Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*. 2011;278(1-3).
5. El-Tanboly E sayed. Recovery of Cheese Whey, a by-Product from the Dairy Industry for use as an Animal Feed. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*. 2017;6(5).
6. Domínguez Niño A, Luna Solano G, Andrade González I. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE SECADO DE QUESO FRESCO Y SUERO DE LECHE APLICANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA [Tesis de doctorado]. Instituto Tecnológico de Orizaba; 2018.
7. Cortez JXM, Patiño DAP, Paredes JFM, Castillo VE v. Lactosuero: materia prima para la elaboración de productos con valor agregado. *Boletín Informativo CEI*. 2022;9(1):103-6.
8. Huertas Parra A. Lactosuero, importancia en la industria alimentaria. Vol. 62, *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. 2018.
9. Mazorra-Manzano (SNI I) MÁ, Moreno-Hernández JM. Propiedades y opciones para valorizar el lactosuero de la quesería artesanal. *CienciaUAT*. 2019;14(1).
10. Sánchez L. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev Salud Anim*. 2014;36(2).
11. GARCÉS LVC, VARGAS JCE. EVALUACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDO POLILÁCTICO PROVENIENTE DEL SUERO DE QUESERÍA A NIVEL LABORATORIO. FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA FACULTAD DE INGENIERIAS PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA BOGOTÁ DC. 2016;

12. Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. Vol. 101, Bioresource Technology. 2010.
13. Rojas AM, Montañó LP, Bastidas MJ. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Revista Colombiana de Química. 2015;44(3).
14. Castro Cedeño B. Estudio del proceso de purificación de ácido láctico [Tesis de maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2017.
15. Orozco FG, Valadez-González A, Domínguez-Maldonado JA, Zuluaga F, Figueroa-Oyosa LE, Alzate-Gaviria LM. Lactic acid yield using different bacterial strains, its purification, and polymerization through ring-opening reactions. Int J Polym Sci. 2014;2014.
16. Robalino Puente JF. Obtención de ácido láctico a partir de suero de leche mediante un proceso biofermentativo utilizando un cultivo mesófilo homofermentativo [Tesis de maestría]. Escuela Politécnica Nacional; 2017.
17. Orozco F. Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo. Centro de investigación científica de Yucatan. 2011;1(2).
18. Medina J, García F, Rojas J, Paricaguán B, Castro X, Lugo F. Obtención de ácido láctico por fermentación del mosto del fruto de cují (*Prosopis juliflora*) y su posterior poli-condensación con zinc metálico a poli (ácido láctico) (PLA). Revista INGENIERÍA UC. 2014;21(2):52–9.
19. Serna-Cock L, Stouvenel AR de. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ACIDO LÁCTICO: ESTADO DEL ARTE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF LACTIC ACID: STATE OF THE ART PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO: ESTADO DO ARTE. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2005;5(1).
20. Komesu A, de Oliveira JAR, da Silva Martins LH, Maciel MRW, Filho RM. Lactic Acid Production to Purification: A Review. Bioresources. 2017;12(2).
21. Torre Pascual I. Producción biotecnológica de ácido D-Láctico a partir de residuos de naranja. Universidad Complutense de Madrid; 2019.
22. Torres Cárdenas H. Obtención de Ácido Poliláctico (PLA) Utilizando Ácido Láctico de Origen Biológico Fermentado por Cepas de *Lactobacillus Casei* y *Staphylococcus Aureus* en un Biorreactor PFTR [Tesis de pregrado]. Universidad Católica de Santa María; 2019.

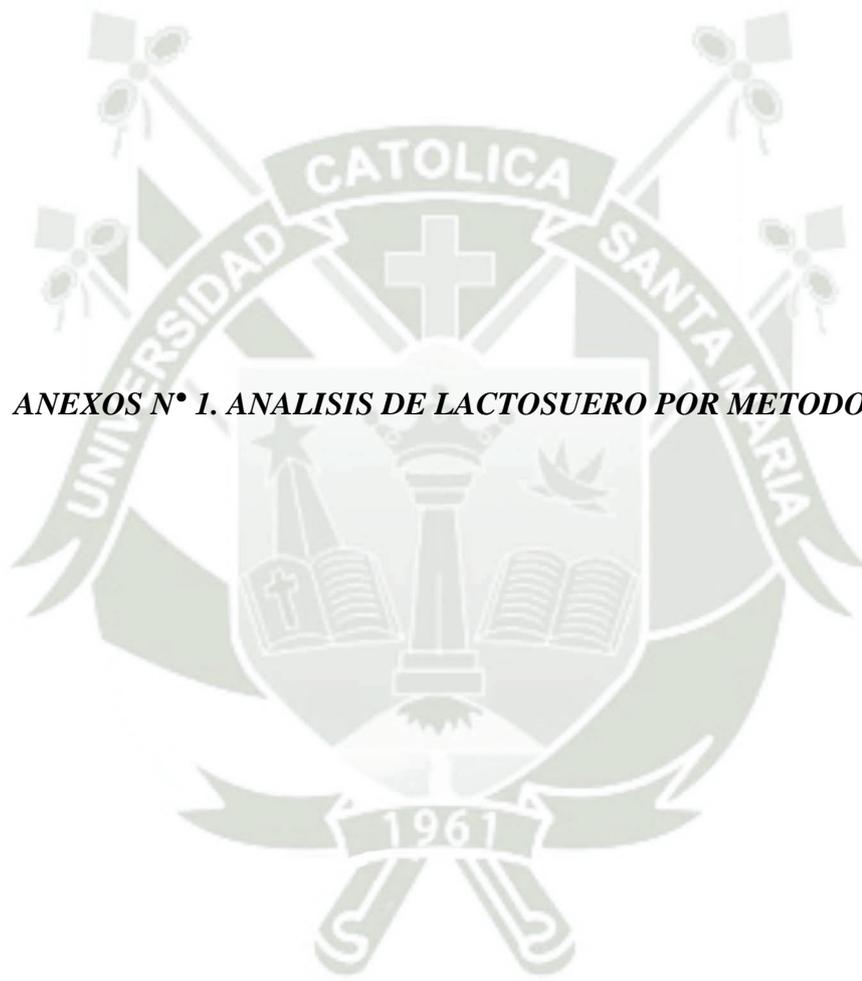
23. Sánchez Dávila JF. Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.
24. Dosuky AS, Elsayed TR, Yousef ET, Barakat OS, Nasr NF. Isolation, identification, and application of lactic acid-producing bacteria using salted cheese whey substrate and immobilized cells technology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2022;20(1).
25. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol* [Internet]. 2018;4(4):665—684. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC6613329>
26. Veerapagu M, Jeya KR. Evaluation of probiotic characteristics of bacteria isolated from fermented foods. *The Pharma Innovation Journal*. 2017;6(7).
27. Mishra AK, Ghosh AR. Characterization of Functional, Safety, and Probiotic Properties of *Enterococcus faecalis* AG5 Isolated From Wistar Rat, Demonstrating Adherence to HCT 116 Cells and Gastrointestinal Survivability. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018;10(3).
28. Sayed WF, Salem WM, Sayed Z. A., Abdalla AK. Production of lactic acid from whey permeates using lactic acid bacteria isolated from cheese. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*. 2020;3(2):78–95.
29. Yuan SF, Hsu TC, Wang CA, Jang MF, Kuo YC, Alper HS, et al. Production of optically pure l(+)-lactic acid from waste plywood chips using an isolated thermotolerant *Enterococcus faecalis* SI at a pilot scale. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2018;45(11).
30. Simental Valle DE. Inmovilización de *Lactobacillus acidophilus* en mezclas de alginato gelatina y mucílago de nopal [Tesis de maestría]. Instituto Politécnico Nacional; 2015.
31. Guauque Torres M, Liliana Gómez S. **ÁCIDO LÁCTICO: UNA REVISIÓN SOBRE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN Y PURIFICACIÓN**. *Biociencias*. 2019;14(2).
32. Bahry H, Abdalla R, Pons A, Taha S, Vial C. Optimization of lactic acid production using immobilized *Lactobacillus Rhamnosus* and carob pod waste from the Lebanese food industry. *J Biotechnol*. 2019;306.
33. Karande RD, Abitha V, Rane A v, Mishra RK. Preparation of Polylactide from Synthesized Lactic Acid and Effect of reaction Parameters on Conversion. *Journal of Material Science and Engineering with Advanced Technology*. 2015;12(1).

34. Devi PN, Sathiyabama J, Rajendran S. Study of surface morphology and inhibition efficiency of mild steel in simulated concrete pore solution by lactic acid-Zn²⁺ system. International Journal of Corrosion and Scale Inhibition. 2017;6(1).
35. Mazo P, Rios LA, Restrepo G. Síntesis de poli ácido láctico y poli ricinoleato empleando calentamiento por microondas y su utilización en la producción de termoplásticos de poliuretano. Polimeros. 2011;21(2).



ANEXOS

ANEXOS N° 1. ANALISIS DE LACTOSUERO POR METODO 1 Y 2



METODO 1 DE DESPROTEINIZACIÓN





INFORME DE ENSAYOS N° 2379- 2021
PÁGINA 1 DE 2

SOLICITANTE	: UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
DIRECCIÓN	: NRO. SIN URB. SAN JOSE (UMACOLLO) AREQUIPA - AREQUIPA - AREQUIPA
PRODUCTO DECLARADO	: LACTOSUERO
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO	: Líquido color amarillento
CODIFICACIÓN / MARCA	: No especificada
DATOS DECLARADOS POR EL CLIENTE	: Fecha de envío: 04/05/2021
TAMAÑO DE MUESTRA RECIBIDA	: 01 muestra de 1100mL aprox.
PRESENTACIÓN, ESTADO Y CONDICIÓN	: En bolsa de plástico anudada. A una temperatura de 25.0°C.
CONDICIONES DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA	: Recibida en el Laboratorio
CONTRAMUESTRA Y PERIODO DE CUSTODIA	: Ninguna (por ser muestra única)
FECHA PRODUCCIÓN	: No especificada
FECHA DE VENCIMIENTO	: No especificada
CONTRATO N°	: 0777-2021
FECHA DE RECEPCIÓN	: 04/05/2021

CONDICIONES DE USO DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS:

- El presente Informe de Ensayos tan sólo es válido únicamente para la Muestra analizada / el Lote muestreado , según sea el caso.
- No deben inferirse a la Muestra analizada o al Lote muestreado otros parámetros que no estén consignados en el presente Informe de Ensayos.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por el cliente (Muestra recibida en laboratorio), BHIOS LABORATORIOS no se responsabiliza si las condiciones de muestreo no fueron las adecuadas, los resultados se aplican a la muestra tal como se recibió.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por BHIOS LABORATORIOS , la presentación, estado y condición del lote corresponden a las encontradas al momento del muestreo.
- Los datos declarados por el cliente son consignados a solicitud expresa del mismo cliente y no son necesariamente verificados por el Laboratorio, por lo que BHIOS LABORATORIOS no asume responsabilidad por el uso de los mismos.
- El Período de Custodia es dependiente del tipo de ensayo y de la disponibilidad de la Muestra.
- BHIOS LABORATORIOS no guarda contramuestras de productos perecibles o de productos cuyas características pudieran variar durante el almacenamiento.
- El presente Informe de Ensayos no es un certificado de conformidad, ni certificado del sistema de calidad del productor.
- Está terminantemente prohibida la reproducción parcial de este Informe de Ensayos sin el conocimiento y la autorización escrita de BHIOS LABORATORIOS.
- Cualquier modificación, borrón o enmienda, anula el presente Informe de Ensayos.

PRP-06-F-05-E Versión: 01 Fecha de Emisión: 27/03/19 Elaborado por: GT / Revisado por: CAC / Aprobado por : GG

Página 1 de 2

Av. Quiñones B-6 (2do. Piso) - Urb. Magisterial II Etapa - Yanahuara - Arequipa - Perú
Teléfono: ++51 (0)54 273320 / 274515 RPC 983768883 RPM #954068110
e-mail: bhios@bhioslabs.com y operaciones@bhioslabs.com

BHIOS LABORATORIOS ...calidad a su servicio



INFORME DE ENSAYOS Nº 2379- 2021
PÁGINA 2 DE 2

RESULTADOS

LAB	DETERMINACIÓN	LACTOSUERO No especificada	UNIDADES
FQ	Acidez	0.45	%
FQ	Cenizas	0.50	%
FQ	Lactosa ¹	3.41	%
FQ	Proteína (F=6.25)	0.81	%
FQ	Grasa	0.85	%

ABREVIATURAS:

% : Expresado en porcentaje

MÉTODOS UTILIZADOS :

Acidez : Norma Técnica Peruana 202.116 : 2008. Leche y Productos Lácteos. Leche cruda. Determinación de acidez de la leche. Método volum.
Cenizas : AOAC Official Method 945.46 Chapter 33 Subchapter 2.33.2.10 Ash of Milk. Gravimetric Method. 20th Ed. Rev. Online 201
Lactosa : Determinación del contenido de lactosa por medidor ultrasónico
Proteína (F=6.25) : BHIOS-FQ-016. Determinación de Proteína en Leche y Productos Lácteos. Versión 01-2018
Grasa : Norma Técnica Peruana 202.125 : 1998. Leche y Productos Lácteos. Leche Cruda. Grasa en la leche. Método de Rose-G.

OBSERVACIONES :

¹ Ensayo subcontratado

FECHAS DE EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS : FQ 04/05/2021 al 11/05/2021

FECHA DE EMISIÓN DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS : 11/05/2021



Bigo. Miguel Valdivia Martínez
Gerente Técnico

Fin del Informe



INFORME DE ENSAYOS N° 2549- 2021
PÁGINA 1 DE 2

SOLICITANTE : UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
DIRECCIÓN : NRO. SIN URB. SAN JOSE (UMACOLLO) AREQUIPA - AREQUIPA - AREQUIPA
PRODUCTO DECLARADO : LACTOSUERO DESPROTEINIZADO
DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO : Líquido color amarillento
CODIFICACIÓN / MARCA : No especificada
DATOS DECLARADOS POR EL CLIENTE : Fecha: 12/05/2021
TAMAÑO DE MUESTRA RECIBIDA : 01 muestra de 900mL aprox.
PRESENTACIÓN, ESTADO Y CONDICIÓN : En botella de plástico cerrado. A una temperatura de 23.0°C
CONDICIONES DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA : Recibida en el Laboratorio
CONTRAMUESTRA Y PERIODO DE CUSTODIA : Ninguna (por ser muestra única)
FECHA PRODUCCIÓN : No especificada
FECHA DE VENCIMIENTO : No especificada
CONTRATO N° : 0777-2021
FECHA DE RECEPCIÓN : 12/05/2021

CONDICIONES DE USO DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS:

- El presente Informe de Ensayos tan sólo es válido únicamente para la Muestra analizada / el Lote muestreado , según sea el caso. No deben inferirse a la Muestra analizada o al Lote muestreado otros parámetros que no estén consignados en el presente Informe de Ensayos.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por el cliente (Muestra recibida en laboratorio), BHIOS LABORATORIOS no se responsabiliza si las condiciones de muestreo no fueron las adecuadas, los resultados se aplican a la muestra tal como se recibió.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por BHIOS LABORATORIOS , la presentación, estado y condición del lote corresponden a las encontradas al momento del muestreo.
- Los datos declarados por el cliente son consignados a solicitud expresa del mismo cliente y no son necesariamente verificados por el Laboratorio, por lo que BHIOS LABORATORIOS no asume responsabilidad por el uso de los mismos.
- El Periodo de Custodia es dependiente del tipo de ensayo y de la disponibilidad de la Muestra.
- BHIOS LABORATORIOS no guarda contramuestras de productos perecibles. o de productos cuyas características pudieran variar durante el almacenamiento.
- El presente Informe de Ensayos no es un certificado de conformidad, ni certificado del sistema de calidad del productor.
- Está terminantemente prohibida la reproducción parcial de este Informe de Ensayos sin el conocimiento y la autorización escrita de BHIOS LABORATORIOS.
- Cualquier modificación, borrón o enmienda, anula el presente Informe de Ensayos.

PRP-06-F-05-E Versión: 01 Fecha de Emisión: 27/03/19 Elaborado por: GT / Revisado por: CAC / Aprobado por : GG Página 1 de 2

Av. Quiñones B-6 (2do. Piso) - Urb. Magisterial II Etapa - Yanahuara - Arequipa - Perú
 Teléfono: ++51 (0)54 273320 / 274515 RPC 983768883 RPM #954068110
 e-mail: bhios@bhioslabs.com y operaciones@bhioslabs.com

BHIOS LABORATORIOS ...calidad a su servicio



INFORME DE ENSAYOS N° 2549- 2021
PÁGINA 2 DE 2

RESULTADOS

LAB	DETERMINACIÓN	LACTOSUERO DESPROTEINIZADO	
		No especificada	UNIDADES
FQ	Acidez	0.38	%
FQ	Cenizas	0.52	%
FQ	Lactosa*	3.57	%
FQ	Proteína (F=6.25)	0.89	%
FQ	Grasa	0.38	%

ABREVIATURAS:

% : Expresado en porcentaje

MÉTODOS UTILIZADOS :

- Acidez : Norma Técnica Peruana 202.118 : 2008. Leche y Productos Lácteos. Leche cruda. Determinación de acidez de la leche. Método volum
- Cenizas : AOAC Official Method 945.46 Chapter 33 Subchapter 2.33.2.10 Ash of Milk. Gravimetric Method. 20th Ed. Rev. Octbre 201
- Lactosa : Determinación del contenido de lactosa por medidor ultrasónico
- Proteína (F=6.25) : BHCG-FQ-016. Determinación de Proteína en Leche y Productos Lácteos. Versión 01-2008.
- Grasa : Norma Técnica Peruana 202.120 : 1966. Leche y Productos Lácteos. Leche Cruda. Grasa en la leche. Método de Rose-Gi

OBSERVACIONES :

* Ensayo subcontratado

FECHAS DE EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS : FQ 12/05/2021 al 19/05/2021

FECHA DE EMISIÓN DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS : 21/05/2021



[Signature]
Bigo. Miguel Valdivia Martínez
Gerente Técnico

Fin del Informe

BHIOS LABORATORIOS ...calidad a su servicio

METODO 2 DE DESPROTEINIZACIÓN



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204205 + 51 54 362038 ANEXO 1186
laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO N° ANA02K21.004573A

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del cliente : Universidad Católica de Santa María
Dirección del cliente : Urb San José s/n Umacollo
RUC : 20141637941
Identificación del contacto : María Vargas
Descripción de la muestra : Lacto suero Inicial

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Tamaño de muestra : 50 mL
Fecha de recepción : 02/11/2021
Fecha de ejecución de ensayo : 03/11/2021 al 04/11/2021
Fecha de emisión de informe : 04/11/2021
Página : 1 de 1

I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (Factor 6,38) Método Kjeldahl, A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.	%	0,31

OBSERVACIONES:

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


C.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CGPDA 00424
ESPECIALISTA EN CONTROL DE
CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO N° ANA02K21.004573B

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del cliente : Universidad Católica de Santa María
Dirección del cliente : Urb San José s/n Umacollo
RUC : 20141637941
Identificación del contacto : María Vargas
Descripción de la muestra : Lacto suero final

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Tamaño de muestra : 50 mL
Fecha de recepción : 02/11/2021
Fecha de ejecución de ensayo : 03/11/2021 al 04/11/2021
Fecha de emisión de informe : 04/11/2021
Página : 1 de 1

I. ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO:

ANÁLISIS	UNIDADES	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (Factor 6,38) Método Kjeldahl, A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.	%	0,04

OBSERVACIONES:

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


O. F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFSA 00424
ESPECIALISTA EN CONTROL DE
CALIDAD LECC



ANEXOS N° 2. ANÁLISIS SECUENCIAL POR PCR

[BLAST](#) » [blastn suite](#) » RID-JKMZ2GEY018

BLAST Results

[Questions/comments](#)

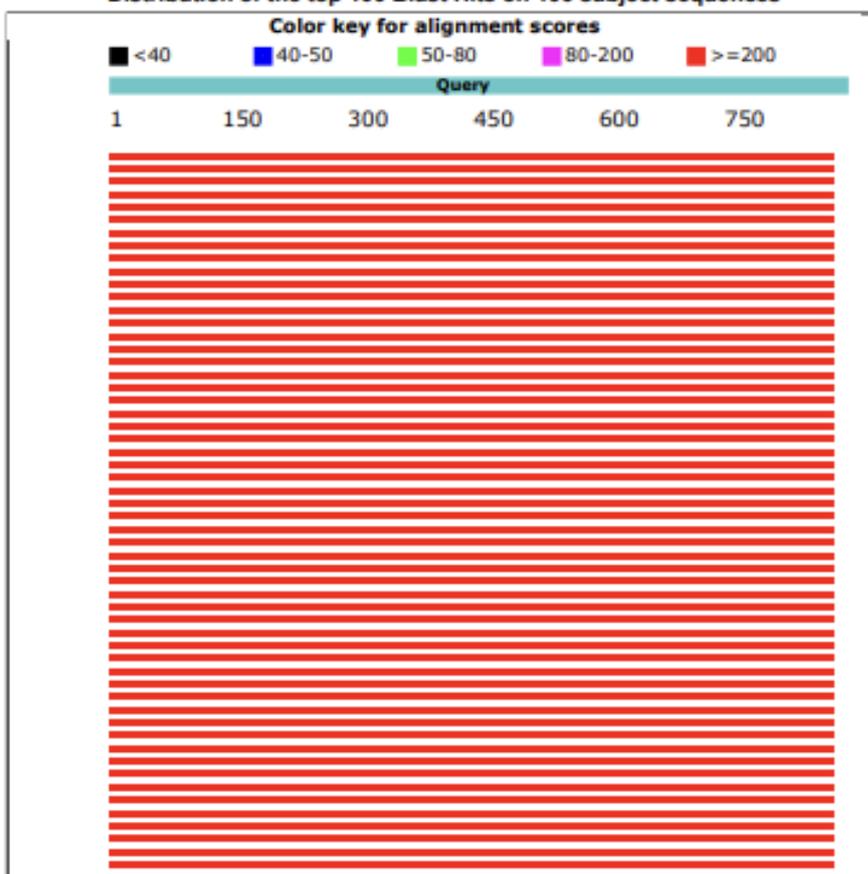
Job title: 103lacto-maria_27F TRIM QUALITY: 20

RID [JKMZ2GEY016](#) (Expires on 09-21 22:53 pm)

Query ID	Id Query_9549	Database Name	nt
Description	103lacto-maria_27F TRIM QUALITY: 20	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	dna	Program	BLASTN 2.13.0+
Query Length	856		

Graphic Summary

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain 2675 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT611694.1
Enterococcus faecalis strain 2358 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT604811.1
Enterococcus faecalis strain 939 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT585601.1
Enterococcus faecalis strain 533 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT573115.1
Enterococcus faecalis strain 531 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT573114.1
Enterococcus faecalis strain 368 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT573058.1
Enterococcus faecalis strain 4369 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT544905.1
Enterococcus faecalis strain 4358 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT544896.1
Enterococcus faecalis strain 3911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT538750.1
Enterococcus faecalis strain 7634 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT516172.1
Enterococcus faecalis strain 7617 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT516167.1
Enterococcus faecalis strain KB-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT378126.1
Enterococcus faecalis strain S1-4-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT509943.1
Enterococcus faecalis strain M1-7-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT509934.1
Enterococcus faecalis strain G1-6-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT509928.1
Enterococcus faecalis strain BSFL-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT232429.1
Enterococcus faecalis strain IGM5-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT197262.1
Enterococcus faecalis strain IGM4-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT197243.1
Enterococcus faecalis strain DSIHZ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT158864.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MN894281.1
Enterococcus faecalis strain 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MH236312.2
Enterococcus faecalis strain EF2-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MN867947.1
Enterococcus faecalis strain MG4579 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MN833019.1
Enterococcus faecalis strain MG4562 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MN661215.1
Enterococcus faecalis strain MG4607 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OP102460.1
Enterococcus faecalis strain MG4597 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OP102455.1

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2/9

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain MG4596 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QP102454.1
Enterococcus faecalis strain hhe94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974826.1
Enterococcus faecalis strain hhe92 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974825.1
Enterococcus faecalis strain hhe89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974822.1
Enterococcus faecalis strain hhe87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974820.1
Enterococcus faecalis strain hhe47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974782.1
Enterococcus faecalis strain hhe46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974781.1
Enterococcus faecalis strain hhe34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974771.1
Enterococcus faecalis strain hhe27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974764.1
Enterococcus faecalis strain he94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974397.1
Enterococcus faecalis strain he84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974387.1
Enterococcus faecalis strain huang95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974207.1
Enterococcus faecalis strain huang94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974206.1
Enterococcus faecalis strain huang63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974185.1
Enterococcus faecalis strain huang47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974171.1
Enterococcus faecalis strain huang34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974158.1
Enterococcus faecalis strain huang5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974138.1
Enterococcus faecalis strain huang2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN974136.1
Enterococcus faecalis strain MG4665 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QP077275.1
Enterococcus faecalis strain MG4645 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QP077258.1
Enterococcus faecalis strain MG4735 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QP035541.1
Enterococcus faecalis strain MG4731 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QP035537.1
Enterococcus faecalis strain Ismallia/2017 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN845622.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 10513 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN782139.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 10441 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN782134.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 10411 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN782131.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 20554 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN776708.1

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

3/9

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain TMPC 2051B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN778706.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 2071N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN778704.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 20544 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN778619.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 2055C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN778614.1
Uncultured bacterium done a7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN745460.1
Uncultured bacterium done a6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN745459.1
Uncultured bacterium done a3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN745456.1
Enterococcus faecalis strain MG4642 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN668168.1
Enterococcus faecalis strain MG4616 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN631300.1
Enterococcus faecalis strain MG4615 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN631299.1
Enterococcus faecalis strain MG5471 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN619517.1
Enterococcus faecalis strain MG5470 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN619516.1
Enterococcus faecalis strain JC20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN406127.1
Enterococcus faecalis strain NBRC .47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM980158.1
Enterococcus faecalis strain NBRC .6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM980118.1
Enterococcus faecalis strain t3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN377287.1
Enterococcus faecalis strain AUHR027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN138984.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 209G5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QN045521.1
Enterococcus sp. strain hasL.6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM986908.1
Enterococcus faecalis strain MW4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM956212.1
Enterococcus faecalis strain 103D2T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM935976.1
Enterococcus faecalis strain 10342M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM935975.1
Enterococcus faecalis strain 10341T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM935974.1
Enterococcus faecalis strain 103E1M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM935972.1
Enterococcus faecalis strain 103D1M 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM935971.1
Enterococcus faecalis strain 103A1T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QM935970.1

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

4/9

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain IraqYaHa10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OM248454.1
Enterococcus faecalis strain BH024225 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OL851599.1
Enterococcus faecalis strain BG999150 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QL851597.1
Enterococcus faecalis strain BH010134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QL851596.1
Enterococcus faecalis strain BH019113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OL851593.1
Enterococcus faecalis strain LA-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OM019305.1
Enterococcus faecalis strain LY410 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT740430.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 10441 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OL798063.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 10411 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OL798060.1
Enterococcus faecalis strain TMPC 10513 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	QL798050.1
Enterococcus faecalis strain BAU/MH/Bag-2032 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OQ187185.1
Enterococcus faecalis strain BAU/MH/Bag-2029 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OQ187184.1
Enterococcus faecalis strain BAU/MH/Bag-2024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OQ187183.1
Enterococcus faecalis strain BAU/MH/Bag-2020 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	OQ187182.1
Enterococcus faecalis strain K-86 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MW051601.1
Enterococcus faecalis strain 19-SYU 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MW548687.1
Enterococcus faecalis strain w1-fd1_E04.ab1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MW534528.1
Enterococcus faecalis strain co4-fd1_A02.ab1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MW534489.1
Enterococcus faecalis strain PV1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT791338.1
Enterococcus faecalis strain 403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1581	1581	100%	0.0	100.00%	MT658582.1
Enterococcus faecalis strain PBR_9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1570	1570	100%	0.0	99.65%	MT484109.1

Alignments

Enterococcus faecalis strain 2675 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: **MT611694.1** Length: 1458 Number of Matches: 1

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

5/9

Range 1: 21 to 876

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1581 bits(856)	0.0()	856/856(100%)	0/856(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	CAGTCGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGCCGGAC				60
Sbjct 21	CAGTCGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGCCGGAC				80
Query 61	GGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGC				120
Sbjct 81	GGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGC				140
Query 121	TAATACCCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCCTTTCGGGTGTCTG				180
Sbjct 141	TAATACCCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCCTTTCGGGTGTCTG				200
Query 181	CTGATGGATGGACCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC				240
Sbjct 201	CTGATGGATGGACCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC				260
Query 241	GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT				300
Sbjct 261	GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT				320
Query 301	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC				360
Sbjct 321	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC				380
Query 361	CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAGAGAAGAACAAGGACG				420
Sbjct 381	CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAGAGAAGAACAAGGACG				440
Query 421	TTAGTAACGAACTGCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA				480
Sbjct 441	TTAGTAACGAACTGCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA				500
Query 481	GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC				540
Sbjct 501	GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC				560
Query 541	GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGA				600
Sbjct 561	GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGA				620
Query 601	AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG				660
Sbjct 621	AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG				680
Query 661	TAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAG				720
Sbjct 681	TAGATATATGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAG				740
Query 721	GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGGTAACGAT				780
Sbjct 741	GCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGGTAACGAT				800
Query 781	GAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAAACGATTAAGCACCTC				840
Sbjct 801	GAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAAACGATTAAGCACCTC				860
Query 841	CGCCTGGGGAGTACGA 856				
Sbjct 861	CGCCTGGGGAGTACGA 876				

Enterococcus faecalis strain 2358 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **MT604811.1** Length: 1462 Number of Matches: 1

Range 1: 23 to 878

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1581 bits(856)	0.0()	856/856(100%)	0/856(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	CAGTCGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGCCGGAC				60
Sbjct 23	CAGTCGAACGCTTCTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGCCGGAC				82
Query 61	GGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGC				120
Sbjct 83	GGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGC				142
Query 121	TAATACCCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCCTTTCGGGTGTCTG				180
Sbjct 143	TAATACCCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCCTTTCGGGTGTCTG				202
Query 181	CTGATGGATGGACCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC				240
Sbjct 203	CTGATGGATGGACCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC				262
Query 241	GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT				300

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

6/9

```

Sbjct 263 GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT 322
Query 301 CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGC 360
Sbjct 323 CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGC 382
Query 361 CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC TCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACG 420
Sbjct 383 CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC TCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACG 442
Query 421 TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA 480
Sbjct 443 TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA 502
Query 481 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC 540
Sbjct 503 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC 562
Query 541 GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA 600
Sbjct 563 GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA 622
Query 601 AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG 660
Sbjct 623 AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG 682
Query 661 TAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG 720
Sbjct 683 TAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG 742
Query 721 GCTCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT 780
Sbjct 743 GCTCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT 802
Query 781 GAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAAACGATTAAAGCACTC 840
Sbjct 803 GAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAAACGATTAAAGCACTC 862
Query 841 CGCCTGGGGAGTACGA 856
Sbjct 863 CGCCTGGGGAGTACGA 878
    
```

Enterococcus faecalis strain 939 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **MT585601.1** Length: 1425 Number of Matches: 1

Range 1: 2 to 857

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1581 bits(856)	0.0()	856/856(100%)	0/856(0%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	CAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGAC	60			
Sbjct 2	CAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGAC	61			
Query 61	GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGC	120			
Sbjct 62	GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGC	121			
Query 121	TAATACCCGATAAAGCTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCG	180			
Sbjct 122	TAATACCCGATAAAGCTTTATGCCGATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCG	181			
Query 181	CTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC	240			
Sbjct 182	CTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC	241			
Query 241	GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT	300			
Sbjct 242	GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT	301			
Query 301	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGC	360			
Sbjct 302	CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGC	361			
Query 361	CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC TCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACG	420			
Sbjct 362	CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAAC TCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACG	421			
Query 421	TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA	480			
Sbjct 422	TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA	481			
Query 481	GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC	540			
Sbjct 482	GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC	541			
Query 541	GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA	600			
Sbjct 542	GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA	601			
Query 601	AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG	660			
Sbjct 602	AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG	661			
Query 661	TAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG	720			

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

7/9

```

Sbjct 662 TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAG 721
Query 721 GCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGAT 780
Sbjct 722 GCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGAT 781
Query 781 GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAAGCACTC 840
Sbjct 782 GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAAGCACTC 841
Query 841 CGCCTGGGGAGTACGA 856
Sbjct 842 CGCCTGGGGAGTACGA 857
    
```

Enterococcus faecalis strain 533 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **MT573115.1** Length: 1423 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 858

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1581 bits(856)	0.0()	856/856(100%)	0/856(0%)	Plus/Plus	

Features:

```

Query 1 CAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGAC 60
Sbjct 3 CAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGAC 62
Query 61 GGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGC 120
Sbjct 63 GGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGC 122
Query 121 TAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCG 180
Sbjct 123 TAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCG 182
Query 181 CTGATGGATGGACCCGCGGTGCAATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC 240
Sbjct 183 CTGATGGATGGACCCGCGGTGCAATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAC 242
Query 241 GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT 300
Sbjct 243 GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT 302
Query 381 CCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC 360
Sbjct 383 CCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC 362
Query 361 CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAGGACG 420
Sbjct 363 CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAGGACG 422
Query 421 TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA 480
Sbjct 423 TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA 482
Query 481 GCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC 540
Sbjct 483 GCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC 542
Query 541 GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCAGGGGAGGGTCAATTGGA 600
Sbjct 543 GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCAGGGGAGGGTCAATTGGA 602
Query 681 AACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG 660
Sbjct 683 AACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG 662
Query 661 TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAG 720
Sbjct 663 TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAG 722
Query 721 GCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGAT 780
Sbjct 723 GCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGAT 782
Query 781 GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAAGCACTC 840
Sbjct 783 GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAAGCACTC 842
Query 841 CGCCTGGGGAGTACGA 856
Sbjct 843 CGCCTGGGGAGTACGA 858
    
```

Enterococcus faecalis strain 531 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: **MT573114.1** Length: 1412 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 858

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1581 bits(856)	0.0()	856/856(100%)	0/856(0%)	Plus/Plus	

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

8/9

Features:

```

Query 1  CAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGTGGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGAC 60
Sbjct 3  CAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGTGGCACTCAATTGGAAAAGAGGAGTGGCGGAC 62

Query 61  GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGC 120
Sbjct 63  GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGC 122

Query 121  TAATACCGCATAAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAAGAGTGAAGGGCGCTTTCGGGTGTCG 180
Sbjct 123  TAATACCGCATAAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAAGAGTGAAGGGCGCTTTCGGGTGTCG 182

Query 181  CTGATGGATGGACCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCCAC 240
Sbjct 183  CTGATGGATGGACCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCACCAAGGCCAC 242

Query 241  GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT 300
Sbjct 243  GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT 302

Query 301  CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGC 360
Sbjct 303  CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGC 362

Query 361  CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGACG 420
Sbjct 363  CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGACG 422

Query 421  TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA 480
Sbjct 423  TTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA 482

Query 481  GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC 540
Sbjct 483  GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC 542

Query 541  GCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA 600
Sbjct 543  GCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA 602

Query 601  AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCG 660
Sbjct 603  AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCG 662

Query 661  TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAG 720
Sbjct 663  TAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAG 722

Query 721  GCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT 780
Sbjct 723  GCTCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT 782

Query 781  GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTC 840
Sbjct 783  GAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTC 842

Query 841  CGCCTGGGGAGTACGA 856
Sbjct 843  CGCCTGGGGAGTACGA 858
    
```

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center Mailing list](#)

[YouTube](#)



[National Library Of Medicine](#)



[National Institutes Of Health](#)



[U.S. Department of Health & Human Services](#)



[USA.gov](#)

NCBI

[National Center for Biotechnology Information](#), [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA

[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

[HHS Vulnerability Disclosure](#)

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

9/9

ANEXOS N° 3. DATOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO**Datos de crecimiento microbiano a la temperatura óptima de 32 °C**

Densidad óptica		Log	
Horas	Absorbancia	Horas	Ln(abs)
0	0	0	-
2	0.0080	2	-4.8283
4	0.012	4	-4.4228
6	0.0985	6	-2.3177
8	0.1854	8	-1.6852
9	0.3248	9	-1.1247
22	0.9130	22	-0.0910
23	1.0390	23	0.0383
25	1.0940	25	0.0898
27	1.0810	27	0.0779
46	1.0550	46	0.0535
47	1.0500	47	0.0488
48	1.0430	48	0.0421
49	1.0300	49	0.0296
50	1.0420	50	0.0411
51	0.8980	51	-0.1076
70	0.6720	70	-0.3975
71	0.6940	71	-0.3653
72	0.4850	72	-0.7236

Fuente: Elaboración propia

ANEXOS N° 4. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS SIN ACTIVAR EN CALDO DESPROTEINIZADO

Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO pH	Grados BRUX	PROMEDIO BRUX	Peso vaso vacío	Peso vaso+mu	Vol. muestra	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico	PROMEDIO ACIDEZ
0	Repetición 1	To_Lb_S_D_R1	6.27	6.30	8.1	8.10	32.2566	42.2852	10	7.8	7.00	7.0917
22	Repetición 1	T1_Lb_S_D_R1	5.41	5.48	4.6	6.20	32.2566	42.0678	10.5	10.5	9.63	9.3820
46	Repetición 1	T2_Lb_S_D_R1	5.23	4.92	4.2	4.10	52.5624	62.4716	10	9.1	8.27	11.1047
70	Repetición 1	T3_Lb_S_D_R1	5.13	4.89	3.8	3.87	50.3455	60.0018	10.2	11.4	10.63	12.9410
94	Repetición 1	T4_Lb_S_D_R1	5.08	4.90	2.8	2.80	50.3455	59.8602	10	12	11.35	13.0946
0	Repetición 2	To_Lb_S_D_R2	6.3	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	8.1	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	32.2566	42.1577	10	7.8	7.09	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
22	Repetición 2	T1_Lb_S_D_R2	5.54		7		32.2566	42.3001	10.4	8.6	7.71	
46	Repetición 2	T2_Lb_S_D_R2	4.79		4		50.3455	60.1353	10.4	12.9	11.86	
70	Repetición 2	T3_Lb_S_D_R2	4.76		3.8		52.5624	62.3029	10	14.8	13.67	
94	Repetición 2	T4_Lb_S_D_R2	4.81		2.8		52.5624	62.1775	10	14.6	13.67	
0	Repetición 3	To_Lb_S_D_R3	6.32	0.03	8.1	0.00	32.2566	42.2773	10	8	7.19	0.09
22	Repetición 3	T1_Lb_S_D_R3	5.49	0.07	7	1.39	50.3464	60.3392	10	12	10.81	1.57
46	Repetición 3	T2_Lb_S_D_R3	4.74	0.27	4.1	0.10	50.3455	60.1031	10.4	14.3	13.19	2.55
70	Repetición 3	T3_Lb_S_D_R3	4.78	0.21	4	0.12	50.3455	59.951	10	15.5	14.52	2.05
94	Repetición 3	T4_Lb_S_D_R3	4.8	0.16	2.8	0.00	50.3455	59.808	10.4	15	14.27	1.54

Tiempo (h)	MUESTRA	[DILUCIÓN]	N° COLONIAS	VOLUMEN SEMBRADO	UFC/ml
0	To_Lb_S_D_R1	0.001	241	0.1	2410000
20	T1_Lb_S_D_R1	0.001	512	0.1	5120000
45	T2_Lb_S_D_R1	0.001	524	0.1	5240000
69	T3_Lb_S_D_R1	0.0001	87	0.1	8700000
94	T4_Lb_S_D_R1	0.0001	172	0.1	17200000

Fuente: Elaboración propia

ANEXOS N° 5. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS SIN ACTIVAR EN CALDO PROTEINIZADO

Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO	Grados BRIX	PROMEDIO	Peso vaso vacío	Peso vaso+mu	Vol. muestra	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico	PROMEDIO
0	Repetición 1	To_Lb_S_P_R1	6.67	6.67	4.25	4.08	50.3455	60.1645	10.4	8.5	7.7910	8.1749
20	Repetición 1	T1_Lb_S_P_R1	7.3	7.58	4	3.93	52.5624	59.9936	10.2	8.1	9.8100	6.1535
45	Repetición 1	T2_Lb_S_P_R1	5.99	5.97	3.2	3.20	50.3455	59.9352	10	1.8	6.7572	6.7048
69	Repetición 1	T3_Lb_S_P_R1	6.39	6.09	3	2.93	52.5624	61.9821	9.8	1.4	5.3505	6.4166
94	Repetición 1	T4_Lb_S_P_R1	6.61	6.29	2.4	2.47	50.3455	59.833	10.2	4.6	4.3636	5.5206
0	Repetición 2	To_Lb_S_P_R2	6.65	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	4	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	52.5624	62.3921	10.2	9.8	8.9728	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
20	Repetición 2	T1_Lb_S_P_R2	7.73		3.9		52.5624	62.2112	10	4.8	4.4772	
45	Repetición 2	T2_Lb_S_P_R2	5.92		3.2		52.5624	62.3335	10.4	1.8	6.6318	
69	Repetición 2	T3_Lb_S_P_R2	5.86		3		50.3455	59.8893	10.2	1.8	6.7897	
94	Repetición 2	T4_Lb_S_P_R2	6.23		2.4		52.5624	62.3105	10.2	5.6	5.1702	
0	Repetición 3	To_Lb_S_P_R3	6.68	0.02	4	0.14	50.3455	60.0867	10	8.4	7.7609	0.69
20	Repetición 3	T1_Lb_S_P_R3	7.71	0.24	3.9	0.06	52.5624	62.0517	10	1.1	4.1731	3.17
45	Repetición 3	T2_Lb_S_P_R3	6	0.04	3.2	0.00	50.3455	59.9805	10.4	1.8	6.7255	0.07
69	Repetición 3	T3_Lb_S_P_R3	6.03	0.27	2.8	0.12	52.5624	62.1834	10.1	1.9	7.1094	0.94
94	Repetición 3	T4_Lb_S_P_R3	6.02	0.30	2.6	0.12	50.3455	59.6941	10	7.3	7.0278	1.37

Fuente: Elaboración propia

Tiempo (h)	MUESTRA	[DILUCIÓN]	N° COLONIAS	VOLUMEN SEMBRADO	UFC/ml
0	To_Lb_S_P_R1	0.001	241	0.1	2410000
20	T1_Lb_S_P_R1	0.001	1140	0.1	11400000
45	T2_Lb_S_P_R1	0.001	1640	0.1	16400000
69	T3_Lb_S_P_R1	0.0001	264	0.1	26400000
94	T4_Lb_S_P_R1	0.0001	543	0.1	54300000

ANEXOS N° 6. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS ACTIVADAS EN CALDO DESPROTEINIZADO

Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO pH	Grados BRIX	PROMEDIO BRIX	Peso vaso vacío	Peso vaso+mu	Vol. muestra	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico	PROMEDIO ACIDEZ
0	Repetición 1	To_Lb_A_D_R1	6.32	6.30	5.6	5.47	32.5537	42.5086	10.4	8.1	7.32	7.2628
23	Repetición 1	T1_Lb_A_D_R1	6.39	6.51	5.4	5.07	32.5537	42.4149	10.4	6.7	6.11	5.4109
47	Repetición 1	T2_Lb_A_D_R1	4.56	6.05	4	4.33	32.5537	42.4198	10.5	18.8	17.15	8.1111
144	Repetición 1	T3_Lb_A_D_R1	4.98	5.65	3	3.93	51.1511	61.0664	10.4	10.9	9.89	9.0537
0	Repetición 2	To_Lb_A_D_R2	6.27	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	5.4	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	51.1515	60.9901	10.2	7.7	7.04	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
23	Repetición 2	T1_Lb_A_D_R2	6.70		5		51.1515	61.047	10.2	4.9	4.46	
47	Repetición 2	T2_Lb_A_D_R2	6.99		4.8		51.1515	61.0247	10.2	3	2.73	
144	Repetición 2	T3_Lb_A_D_R2	7.2		4.8		32.5535	42.4353	10.4	2.3	2.09	
0	Repetición 3	To_Lb_A_D_R3	6.32	0.03	5.4	0.12	32.5537	42.4975	10.4	8.2	7.42	0.20
23	Repetición 3	T1_Lb_A_D_R3	6.45	0.16	4.8	0.31	32.5537	42.41	10.5	6.2	5.66	0.86
47	Repetición 3	T2_Lb_A_D_R3	6.6	1.31	4.2	0.42	32.5537	42.2637	10.2	4.8	4.45	7.87
144	Repetición 3	T3_Lb_A_D_R3	4.78	1.34	4	0.90	51.1511	61.2351	10.4	17	15.17	6.58

Fuente: Elaboración propia

Tiempo (h)	MUESTRA	[DILUCIÓN]	N° COLONIAS	VOLUMEN SEMBRADO	UFC/ml
0	To_Lb_AP_D_R1	0.01	276	0.1	276000
23	T1_Lb_AP_D_R1	0.001	114	0.1	1140000
46	T2_Lb_AP_D_R1	0.0001	76	0.1	7600000
118	T3_Lb_AP_D_R1	0.00001	11	0.1	11000000

Fuente: Elaboración propia

ANEXOS N° 7. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS NO ENCAPSULADAS ACTIVADAS EN CALDO PROTEINIZADO

Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO	Grados BRIX	PROMEDIO	Peso vaso vacío	Peso vaso+mu	Vol. muestra	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico	PROMEDIO
0	Repetición 1	To_Lb_A_P_R1	6.18	6.22	6.4	6.27	32.5537	42.3935	10.4	8.8	8.0489	7.9143
23	Repetición 1	T1_Lb_A_P_R1	6.62	6.91	5.8	5.87	32.5537	42.4481	10.2	7.1	6.4582	4.5196
47	Repetición 1	T2_Lb_A_P_R1	4.77	6.42	5.6	5.80	32.5537	42.561	10.5	18.6	16.7278	7.5285
144	Repetición 1	T3_Lb_A_P_R1	4.96	6.53	4.4	5.53	51.1511	61.1651	10.2	14.2	12.7621	6.1167
0	Repetición 1	To_Lb_A_P_R2	6.22	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	6.2	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	51.1515	61.0823	10.5	8.9	8.0658	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
23	Repetición 1	T1_Lb_A_P_R2	7.32		5.8		51.1515	61.223	10.5	3.4	3.0383	
47	Repetición 1	T2_Lb_A_P_R2	7.43		5.8		51.1515	60.9484	10	2.8	2.5722	
144	Repetición 1	T3_Lb_A_P_R2	7.38		6.2		32.5535	42.6214	10.4	3	2.6818	
0	Repetición 1	To_Lb_A_P_R3	6.25	0.04	6.2	0.12	32.5537	42.4645	10.4	8.4	7.6280	0.25
23	Repetición 1	T1_Lb_A_P_R3	6.78	0.37	6	0.12	32.5537	42.5234	10.5	4.5	4.0623	1.76
47	Repetición 1	T2_Lb_A_P_R3	7.05	1.44	6	0.20	32.5537	42.4156	10.2	3.6	3.2854	7.97
144	Repetición 1	T3_Lb_A_P_R3	7.24	1.36	6	0.99	51.1511	61.0615	10.4	3.2	2.9060	5.76

Fuente: Elaboración propia

Tiempo (h)	MUESTRA	[DILUCIÓN]	N° COLONIAS	VOLUMEN SEMBRADO	UFC/ml
0	To_Lb_AP_P_R1	0.01	153	0.1	153000
23	T1_Lb_AP_P_R1	0.001	1270	0.1	1270000
46	T2_Lb_AP_P_R1	0.0001	20	0.1	200000
118	T3_Lb_AP_P_R1	0.00001	1	0.1	100000

Fuente: Elaboración propia

ANEXOS N° 8. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS ENCAPSULADAS A UN 4% Y 5% DE CaCl₂ EN CALDO SIN DESPROTEINIZAR O PROTEINIZADO

Perlas al 4% CaCl ₂ -1 h - 3% alginato / Suero proteinizado										
Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO pH	Grados BRIX	PROMEDIO BRIX	Vol. mu	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico	PROMEDIO ACIDEZ
0	Repetición 1	To_Lb_P_R1	4.97	4.97	6	6.00	6	3.3	4.95	4.9500
24	Repetición 1	T1_Lb_P_R1	5.25	5.27	5.6	5.60	7	2.4	3.09	3.4286
48	Repetición 1	T2_Lb_P_R1	4.64	4.86	5	5.07	7	2.7	3.47	3.4286
120	Repetición 1	T3_Lb_P_R1	4.49	4.76	5	5.33	7	3.3	4.24	3.8143
144	Repetición 1	T4_Lb_P_R1	4.26	4.54	4.2	4.47	7	3.6	4.63	4.2857
192	Repetición 1	T5_Lb_P_R1	4.21	4.48	3.8	4.27	6.5	4	5.54	4.5462
0	Repetición 2	To_Lb_P_R2	4.97	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	6	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	6	3.3	4.95	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
24	Repetición 2	T1_Lb_P_R2	5.26		5.6		7	2.9	3.73	
48	Repetición 2	T2_Lb_P_R2	5.08		5.2		7	2.6	3.34	
120	Repetición 2	T3_Lb_P_R2	5.29		6		7	2.3	2.96	
144	Repetición 2	T4_Lb_P_R2	5.08		5		7	2.8	3.60	
192	Repetición 2	T5_Lb_P_R2	5		5		7	2.5	3.21	
0	Repetición 3	To_Lb_P_R3	4.97	0.00	6	0.00	6	3.3	4.95	0.00
24	Repetición 3	T1_Lb_P_R3	5.3	0.03	5.6	0.00	7	2.7	3.47	0.32
48	Repetición 3	T2_Lb_P_R3	4.86	0.22	5	0.12	7	2.7	3.47	0.07
120	Repetición 3	T3_Lb_P_R3	4.51	0.46	5	0.58	7	3.3	4.24	0.74
144	Repetición 3	T4_Lb_P_R3	4.28	0.47	4.2	0.46	7	3.6	4.63	0.59
192	Repetición 3	T5_Lb_P_R3	4.22	0.45	4	0.64	7	3.8	4.89	1.20

Fuente: Elaboración propia

Perlas al 5% CaCl2-1 h - 3% alginato / Suero proteinizado

Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO	Grados BRIX	PROMEDIO	Vol. mu	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico	PROMEDIO
0	Repetición 1	To_Lb_P_R1	4.97	4.97	6	6.00	6	3.3	4.95	4.9500
24	Repetición 1	T1_Lb_P_R1	4.61	4.63	3.4	3.47	7	4.8	6.17	6.0000
48	Repetición 1	T2_Lb_P_R1	4.71	4.81	3.4	3.20	7	3.5	4.50	4.1571
120	Repetición 1	T3_Lb_P_R1	6.19	6.26	2.8	2.67	7	1.4	1.80	2.0143
144	Repetición 1	T4_Lb_P_R1	5.42	5.36	2.8	2.67	7	2.6	3.34	2.5286
192	Repetición 1	T5_Lb_P_R1	4.38	4.40	2.8	2.67	7	8.3	10.67	6.0857
0	Repetición 2	To_Lb_P_R2	4.97	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	6	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	6	3.3	4.95	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
24	Repetición 2	T1_Lb_P_R2	4.61		3.6		7	4.5	5.79	
48	Repetición 2	T2_Lb_P_R2	4.8		3		7	3.3	4.24	
120	Repetición 2	T3_Lb_P_R2	6.24		2.6		7	1.6	2.06	
144	Repetición 2	T4_Lb_P_R2	5.2		2.6		7	3.4	4.37	
192	Repetición 2	T5_Lb_P_R2	4.34		2.6		7	9.3	11.96	
0	Repetición 3	To_Lb_P_R3	4.97	0.00	6	0.00	6	3.3	4.95	0.00
24	Repetición 3	T1_Lb_P_R3	4.66	0.03	3.4	0.12	7	4.7	6.04	0.20
48	Repetición 3	T2_Lb_P_R3	4.92	0.11	3.2	0.20	7	2.9	3.73	0.39
120	Repetición 3	T3_Lb_P_R3	6.35	0.08	2.6	0.12	7	1.7	2.19	0.20
144	Repetición 3	T4_Lb_P_R3	5.46	0.14	2.6	0.12	7	2.5	3.21	0.63
192	Repetición 3	T5_Lb_P_R3	4.49	0.08	2.6	0.12	7	7.3	9.39	1.29

Fuente: Elaboración propia

ANEXOS N° 9. DATOS DE MONITOREO DE pH, LACTOSA Y ACIDEZ EN LA FERMENTACIÓN BATCH CON CEPAS ENCAPSULADAS A UN 4% Y 5% DE CaCl₂ EN CALDO DESPROTEINIZADO

Perlas al 4% CaCl ₂ -1 h - 3% alginato / Suero desproteínizado										
Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO pH	Grados BRIX	PROMEDIO BRIX	Vol. mu	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico (MASA ÁCIDO LÁCTICO)	PROMEDIO ACIDEZ
0	Repetición 1	To_Lb_D1_R1	4.84	4.84	5.4	5.40	7	3.8	4.89	4.8857
24	Repetición 1	T1_Lb_D1_R1	5.16	5.20	5.2	5.20	7	2.6	3.34	3.2901
48	Repetición 1	T2_Lb_D1_R1	4.64	4.66	4.8	4.80	7	2.4	3.09	3.1286
120	Repetición 1	T3_Lb_D1_R1	4.79	4.74	4.6	4.60	6.5000	2.4	3.32	2.9802
144	Repetición 1	T4_Lb_D1_R1	5.57	5.49	4.4	4.40	7.0000	1.6	2.06	2.3143
192	Repetición 1	T5_Lb_D1_R1	5.1	5.40	4	3.87	7.0000	2	2.57	2.3143
0	Repetición 2	To_Lb_D1_R2	4.84	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	5.4	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	7	3.8	4.89	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
24	Repetición 2	T1_Lb_D1_R2	5.23		5.2		7	2.6	3.34	
48	Repetición 2	T2_Lb_D1_R2	4.57		4.8		7	2.3	2.96	
120	Repetición 2	T3_Lb_D1_R2	4.61		4.6		6.5	2.2	3.05	
144	Repetición 2	T4_Lb_D1_R2	5.86		4.4		7	1.5	1.93	
192	Repetición 2	T5_Lb_D1_R2	5.74		3.8		7	1.7	2.19	
0	Repetición 3	To_Lb_D1_R3	4.84	0.00	5.4	0.00	7	3.8	4.89	0.00
24	Repetición 3	T1_Lb_D1_R3	5.22	0.04	5.2	0.00	6.5	2.3	3.18	0.09
48	Repetición 3	T2_Lb_D1_R3	4.77	0.10	4.8	0.00	7	2.6	3.34	0.20
120	Repetición 3	T3_Lb_D1_R3	4.82	0.11	4.6	0.00	7	2	2.57	0.38
144	Repetición 3	T4_Lb_D1_R3	5.04	0.42	4.4	0.00	7	2.3	2.96	0.56
192	Repetición 3	T5_Lb_D1_R3	5.35	0.32	3.8	0.12	7	1.7	2.19	0.22

Fuente: Elaboración propia

Perlas al 5% CaCl2- 21 h - 3% alginato / Suero desproteínizado

Tiempo (h)	REPETICIÓN MUESTRA	CÓDIGO MUESTRA	pH	PROMEDIO	Grados BRIX	PROMEDIO	Vol. mu	Vol. NaOH	ACIDEZ g/L ácido láctico (MASA ÁCIDO LÁCTICO)	PROMEDIO
0	Repetición 1	To_Lb_D1_R1	4.84	4.84	5.4	5.07	7.0	3.8	4.89	4.89
24	Repetición 1	T1_Lb_D1_R1	4.21	4.23	3.4	3.47	6.5	7.1	9.83	8.51
48	Repetición 1	T2_Lb_D1_R1	4.03	4.02	3.8	3.80	7.0	8.2	10.54	17.49
120	Repetición 1	T3_Lb_D1_R1	3.82	3.85	3	2.93	7.0	18.6	23.91	29.41
144	Repetición 1	T4_Lb_D1_R1	3.64	3.69	2.8	2.73	7.0	21.4	27.51	42.61
192	Repetición 1	T5_Lb_D1_R1	3.55	3.61	2.6	2.47	7.0	27.9	35.87	50.61
0	Repetición 2	To_Lb_D1_R2	4.84	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	4.4	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	7.0	3.8	4.89	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
24	Repetición 2	T1_Lb_D1_R2	4.27		3.2		7	6.1	7.84	
48	Repetición 2	T2_Lb_D1_R2	4.01		4		7	8.1	31.37	
120	Repetición 2	T3_Lb_D1_R2	3.84		3		6.5	12.4	45.42	
144	Repetición 2	T4_Lb_D1_R2	3.69		2.6		7	15.2	78.17	
192	Repetición 2	T5_Lb_D1_R2	3.63		2.4		7	17.6	90.51	
0	Repetición 3	To_Lb_D1_R3	4.84	0.00	5.4	0.58	7.0	3.8	4.89	0.00
24	Repetición 3	T1_Lb_D1_R3	4.21	0.03	3.8	0.31	7	6.1	7.84	1.15
48	Repetición 3	T2_Lb_D1_R3	4.01	0.01	3.6	0.20	7	8.2	10.54	12.03
120	Repetición 3	T3_Lb_D1_R3	3.88	0.03	2.8	0.12	7	14.7	18.90	14.09
144	Repetición 3	T4_Lb_D1_R3	3.74	0.05	2.8	0.12	6.5	16	22.15	30.91
192	Repetición 3	T5_Lb_D1_R3	3.66	0.06	2.4	0.12	7	19.8	25.46	34.94

Fuente: Elaboración pro



"EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL ENCAPSULAMIENTO DE CEPAS HOMOFERMENTATIVAS EN LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	cicy.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
3	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	1%
4	repository.uamerica.edu.co Fuente de Internet	1%
5	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	www.scribd.com Fuente de Internet	1%
7	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	1%
8	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%

9

repositorio.unal.edu.co

Fuente de Internet

1 %

10

revistas.unicordoba.edu.co

Fuente de Internet

1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado