

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL



Presentado por
Br. DAVID MUÑOZ HUACHUHUILLCA

HIDRÓLISIS DE LACTOSUERO
DESPROTEINIZADO CON *Kluyveromyces fragilis*
NRRL Y-2415 INMOVILIZADAS EN AGAR

Asesor:

Ing. FREDY TAIPE PARDO

Co-Asesor:

Dra. Blga. LUZ AZUCENA TORRES GARCÍA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TESIS FINANCIADO POR LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
DE LA UNAJMA

ANDAHUAYLAS – APURÍMAC - PERÚ
2018

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL



Presentado por
Br. DAVID MUÑOZ HUACHUHUILLCA

HIDRÓLISIS DE LACTOSUERO
DESPROTEINIZADO CON *Kluyveromyces fragilis*
NRRL Y-2415 INMOVILIZADAS EN AGAR

Asesor:

Ing. FREDY TAIPE PARDO

Co-Asesor:

Dra. Blga. LUZ AZUCENA TORRES GARCÍA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

TESIS FINANCIADO POR LA DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
DE LA UNAJMA

ANDAHUAYLAS – APURÍMAC - PERÚ
2018



APROBACIÓN DEL ASESOR

EL que suscribe:

Ing. FREDY TAIPE PARDO, identificado con CIP 88460, por la presente:

CERTIFICA,

Que, el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial **DAVID MUÑOZ HUACHUHUILCA**; ha culminado satisfactoriamente el informe final de tesis intitulado "**HIDRÓLISIS DE LACTOSUERO DESPROTEINIZADO CON *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 INMOVILIZADAS EN AGAR**", para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

Andahuaylas, 08 de agosto del 2018



Ing. Fredy Taipe Pardo
Asesor de Tesis



Br. David Muñoz Huachuhuilca
Tesista



APROBACIÓN DEL CO-ASESOR

El que suscribe:

Dra. Blga. LUZ AZUCENA TORRES GARCÍA, identificado con colegiatura N° 4117, por la presente:

CERTIFICA,

Que, el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial **DAVID MUÑOZ HUACHUHUILCA**; ha culminado satisfactoriamente el informe final de tesis intitulado **"HIDRÓLISIS DE LACTOSUERO DESPROTEINIZADO CON *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 INMOVILIZADAS EN AGAR"**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

Andahuaylas, 08 de agosto del 2018

.....
Dra. Luz Azucena Torres García
Co-Asesor

.....
Br. David Muñoz Huachuillca
Tesisista



FACULTAD DE INGENIERIA

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En el local Salón de Grados de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, de la Sede Académica Santa Rosa de la Universidad Nacional José María Arguedas de la ciudad de Andahuaylas, siendo las once de la mañana del día miércoles veintitrés de mayo del dos mil dieciocho; se reunieron Ing. MSc. David Juan Ramos Huallpartupa, Ing. MSc. Carlos Alberto Ligarda Samanez, el Ing. MSc. David Choque Quispe, integrantes del Jurado Evaluador del Informe Final de Tesis intitulado: "HIDRÓLISIS DE LACTOSUERO DESPROTEINIZADO CON *KLUYVEROMYCES FRAGILIS* NRRL Y-2415 INMOVILIZADAS EN AGAR", cuyo autor es el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial **DAVID MUÑOZ HUACHUHUILLCA**, el asesor Ing. Fredy Taípe Pardo y la Co-Asesora Dr. Blga. Luz Azucena Torres García con el propósito de proceder a la sustentación y defensa de dicha tesis.

Luego de la sustentación y defensa del tesista, el Jurado Evaluador **ACORDÓ: APROBAR** por **UNANIMIDAD** al Bachiller en Ingeniería Agroindustrial **DAVID MUÑOZ HUACHUHUILLCA**, obteniendo la siguiente calificación y mención:

Nota escala vigesimal		Mención
Números	Letras	
17	DIECISIETE	Muy BUENO

En señal de conformidad, se procedió a la firma de la presente acta en 03 ejemplares.

Ing. MSc. David Juan Ramos Huallpartupa
Presidenta del Jurado Evaluador

Ing. MSc. Carlos Alberto Ligarda Samanez
Primer Miembro del Jurado Evaluador

Ing. MSc. David Choque Quispe
Segundo Miembro del Jurado Evaluador



APROBACIÓN DEL JURADO DICTAMINADOR

La tesis: **"HIDRÓLISIS DE LACTOSUERO DESPROTEINIZADO CON *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 INMOVILIZADAS EN AGAR"**; para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, ha sido evaluado por el jurado dictaminador conformado por:

Presidente: Ing. MSc. David Juan Ramos Huallpartupa

Primer Miembro: Ing. MSc. Carlos Alberto Ligarda Samanez

Segundo Miembro: Ing. MSc. David Choque Quispe

Habiendo sido aprobado por unanimidad, en la ciudad de Talavera el día 23 de mayo del 2018.

Andahuaylas, 08 de agosto del 2018

Atentamente,

Ing. MSc. David Juan Ramos Huallpartupa
Presidente del Jurado Evaluador

Ing. MSc. Carlos Alberto Ligarda Samanez
Primer Miembro del Jurado Evaluador

Ing. MSc. David Choque Quispe
Segundo Miembro del Jurado Evaluador

DEDICATORIA

*A **Dios** quien supo guiarme por el buen camino y por darme las fuerzas para alcanzar este sueño hoy hecho realidad, a mis queridos padres **Enrique** y **Genoveva**, quienes me brindaron por todo su apoyo incondicional a lo largo de toda mi formación.*

David.

EPÍGRAFE

“El peor tipo de soledad en el mundo es la de ser malentendido. Puede llegar a provocar que uno pierda el contacto con la realidad.”

Dan Brown

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional José María Arguedas en especial a la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial (EPIA), por haberme acogido en sus aulas durante los cinco años de estudio, así mismo por permitirme tener acceso a los diferentes laboratorios y poder realizar este trabajo de investigación.
- A mis padres Enrique Muñoz Huachuillca y Genoveva Huachuillca Munares, su amor y consejos a lo largo de mi formación profesional, quienes siempre estuvieron en los momentos más difíciles.
- A mi Asesor Ing. Fredy Taipe Pardo, docente de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por el apoyo, gran colaboración y sobre todo su amistad; sin los cuales no se hubiera podido realizar la presente investigación.
- A mi Co-Asesor Dra. Blga. Luz Azucena Torres García, docente de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por su ejemplo, y por su desinteresada y valiosa orientación durante el desarrollo de la presente tesis.
- Por sus veredictos calificados y orientaciones, que forman parte del trabajo de investigación a mis jurados evaluadores Ing. MSc. David Juan Ramos Huallpartupa, Ing. MSc. Carlos Alberto Ligarda Samanez e Ing. MSc. David Choque Quispe.
- Al Ing. MSc. Fanny Emma Ludeña Urquizo, docente de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNALM, por su colaboración y orientación para facilitar la compra de cepas de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415.
- Al Dr. Julio César Arellano Barragán (Universidad Nacional de Trujillo), por su valiosa orientación y gran colaboración en el presente trabajo.
- Por ultimo quiero agradecer a todos los docentes que han contribuido en mi formación universitaria.

ÍNDICE

	PÁGINA
DEDICATORIA.....	vii
EPÍGRAFE	viii
AGRADECIMIENTO	ix
ABREVIATURAS Y UNIDADES	xvi
RESUMEN.....	xviii
ABSTRAC.....	xix
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problema de investigación.....	3
1.2 Hipótesis de la investigación.....	3
1.3 Objetivos de la investigación	4
CAPÍTULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Antecedentes de la investigación.....	5
2.2 Lactosuero.....	9
2.2.1 Tipos de lactosuero	9
2.2.2 Utilización del lactosuero como medio de cultivo	10
2.2.3 Desproteinizado de lactosuero	11
2.3 Lactosa.....	13
2.3.1 Intolerancia a la lactosa	14
2.3.2 Hidrólisis.....	14
2.3.3 Hidrólisis de la lactosa	15
2.3.4 Catalizador	16
2.3.5 Sustrato.....	16
2.3.6 Enzimas para la hidrólisis de la lactosa	17
2.3.7 <i>Kluyveromyces fragilis</i>	17
2.3.8 Característica de <i>kluyveromyces fragilis</i>	18
2.4 Método para determinar la glucosa.....	19
2.4.1 Método glucosa oxidasa	19
2.5 Inmovilización	19
2.5.1 Método de inmovilización	20

2.5.2 Elección del método de inmovilización	21
2.5.3 Efectos de la inmovilización.....	22
2.5.6 Matrices utilizadas como soportes de enzimas	23
2.5.6.1 Agar	23
2.6 Agitación.....	24
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Lugar de ejecución	26
3.2 Material de estudio	26
3.2.1 Población.....	26
3.2.2 Muestra	26
3.2.3 Unidad de análisis	26
3.3 Materiales.....	27
3.3.1 Materia prima	27
3.3.2 Material biológico.....	27
3.3.3 Material de laboratorio.....	27
3.3.4 Equipos	27
3.3.5 Reactivos e insumos	28
3.4 Metodología para la obtención de lactosuero.....	29
3.5 Metodología para la obtención de lactosuero desproteínizado.....	31
3.5.1 Obtención de lactosuero desproteínizado.....	31
3.6 Metodología para la recuperación de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 liofilizado.....	31
3.6.1 Metodología para la obtención de inóculo.....	32
3.6.2 Metodología para la obtención de la concentración de agar	33
3.6.3 Metodología para la obtención de la concentración de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415.....	33
3.6.4 Metodología para la determinación de la interacción de concentración de agar y concentración de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415.....	33
3.7 Metodología para la inmovilización de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 en agar.....	34

3.7.1 Metodología de monitoreo y control de operación	35
3.7.2 Metodología para la medición de la actividad de la célula inmovilizada.....	35
3.7.3 Metodología para la determinación de la hidrólisis de la lactosa.....	35
3.7.4 Análisis estadístico	36
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1 Recuperación de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 liofilizado	40
4.2 Obtención de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 en lactosuero desproteínizado.	40
4.3 Resultados de la inmovilización de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 en agar.	41
4.4 Resultados de la hidrólisis de la lactosa	42
4.5 Resultados de la concentración adecuada de agar y la cantidad optima del inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas.	47
4.6 Resultados de la interacción de concentración de agar y la cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas.	48
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES.....	51
SUGERENCIAS.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1: Composición (%) del lactosuero dulce y ácido.....	10
Tabla 2: Caracterización físico química del suero entero.	11
Tabla 3: Concentración de las principales proteínas del lactosuero.	12
Tabla 4: Caracterización química de lactosuero desproteinizado.	12
Tabla 5: Comparación de los diferentes métodos de inmovilización.....	22
Tabla 6: Clasificación de los soportes	23
Tabla 7: Matriz de diseño experimental.....	37
Tabla 8: ANOVA factorial con interacción.....	38
Tabla 9: Cálculo de los elementos del ANOVA.	38
Tabla 10: Resultados de la inmovilización en agar.....	41
Tabla 11: Resultados del porcentaje de la lactosa hidrolizada en lactosuero desproteinizado.	42
Tabla 12: Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de la lactosa hidrolizada.	43
Tabla 13: Resultado de la determinación de los modelos matemáticos para el porcentaje de lactosa hidrolizada.....	45
Tabla 14: Nivel óptimo de las variables de proceso y del rendimiento óptimo. ..	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Estructura molecular de la lactosa	13
Figura 2: Solubilidad de la lactosa	14
Figura 3: Hidrólisis de la lactosa por β -galactosidasa	15
Figura 4: Estructura química de agar	24
Figura 5: Diagrama de flujo para la obtención del suero de leche.....	29
Figura 6: Diagrama de flujo para la obtención de lactosuero desproteinizado... 31	
Figura 7: Diagrama de flujo para la inmovilización de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 en agar.	34
Figura 8: Superficie de respuesta para el porcentaje de lactosa hidrolizada.....	46
Figura 9: Grafica de contornos para el porcentaje de lactosa hidrolizada.	47
Figura 10: Efectos principales de la concentración de agar y cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas sobre la hidrólisis.....	49
Figura 11: Efecto de interacción de concentración de agar y <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas sobre la hidrólisis.....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
Anexo 1: Composición del suero de leche.	60
Anexo 2: Ficha técnica de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415.....	61
Anexo 3: Ficha técnica de glicemia enzimática.....	62
Anexo 4: Valores de glucosa, lactosa hidrolizada y % de lactosa hidrolizada (repetición numero 1).....	64
Anexo 5: Valores de glucosa, lactosa hidrolizada y % de lactosa hidrolizada (repetición numero 2).....	66
Anexo 6: Valores de glucosa, lactosa hidrolizada y % de lactosa hidrolizada (repetición numero 3).....	68
Anexo 7: Imágenes de la investigación realizada.....	70
Anexo 8: Matriz de consistencia.	78

ABREVIATURAS Y UNIDADES

l	: Litros
v/v	: Volumen sobre volumen
kg	: Kilogramo
mm	: Milímetro
ml	: Mililitro
cm	: Centímetro
mg	: Miligramos
μl	: Microlitro
T	: Temperatura
t	: Tiempo
h	: Horas
M	: Molar
pH	: Potencial de hidrogeniones
g	: Gramos
g/l	: Gramos por litro
μ	: Micro
nm	: Nanómetros
rpm	: Revoluciones por minuto
DBO	: Demanda biológica de oxígeno
DQO	: Demanda química de oxígeno
H₂O₂	: Peróxido de hidrógeno
Lh	: Lactosa hidrolizada
F₀	: Difusividad efectiva
Bi	: Número de Biot
Pe	: Peclet
H₀	: Hipótesis nula
H_A	: hipótesis alterna
\bar{x}	: Promedio

S	: Desviación estándar
msnm	: Metros sobre el nivel de mar
ANOVA	: Análisis de varianza
DCCR	: Diseño compuesto central rotatable
INIA	: Instituto Nacional de Innovación Agraria
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)
NCCY	: National Collection of Yeast Cultures (Colección Nacional de Cultivos de Levadura)

RESUMEN

El trabajo de investigación tuvo por objetivo determinar el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado con la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas, la leche fresca se adquirió del centro experimental del INIA ubicada en las coordenadas geográficas LO: 73°27'30.04" y LS: 13°38'42.30" de la localidad de Chumbibamba del distrito de Talavera, Provincia de Andahuaylas, el lactosuero se obtuvo bajo el procedimiento de elaboración de queso fresco, el suero fue inicialmente desproteínizado mediante acidificación con ácido acético a un pH 4.5 con tratamiento térmico a 91 °C por 30 minutos, se preparó el inóculo con un pH de 4.5 a temperatura ambiente a 150 rpm por 24 h, luego se centrifugó a 3300 rpm por 10 minutos, obteniendo una concentración celular de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 de 2.25×10^8 células/ml; en la inmovilización se obtuvo esferas de 3.84 ± 0.12 mm de diámetro y luego de ser llevado a agitación de 150 rpm por 1.5 h donde fueron evaluados las muestras de lactosuero desproteínizado cada 30 minutos respectivamente, por último se utilizó un espectrofotómetro a 505 nm para observar los valores de absorbancia de la muestra y con esto obtener el contenido de glucosa en lactosuero desproteínizado; se utilizó un diseño factorial 3^2 , definiendo que la concentración de agar, la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 y la interacción de los dos factores tienen un efecto significativo ($p\text{-value} < 0.05$) en la hidrólisis de lactosuero desproteínizado, obteniendo la concentración más adecuada de agar de 4 %, la cantidad óptima de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas de 15 % y el porcentaje de la lactosa hidrolizada de 98.99 %.

Palabras clave: agar, hidrólisis, lactosuero desproteínizado, *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415.

ABSTRAC

The aim of this research was to determine the percentage of hydrolysis of deproteinized whey, having into account the concentration of agar and the amount of inoculum of *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 immobilized. For this research, fresh milk was gotten from the experimental center of INIA that is located at the geographical coordinates LO: 73°27'30.04" and LS: 13°38'42.30" of the town of Chumbibamba in the district of Talavera, Province of Andahuaylas. The whey have been gotten through the procedure of fresh cheese making. Firstly, the whey was deproteinized through acidification with acetic acid at pH 4.5, using heat treatment at 91 °C for 30 minutes. After that, the inoculum was prepared with pH of 4.5 at environmental temperature at 150 rpm for 24 h. After a while, the different samples were centrifuged at 3300 rpm for 10 minutes, getting an inoculum cell concentration of *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 of 2.25×10^8 cells/ml. In the immobilization, it could be gotten many spheres of 3.84 ± 0.12 mm (diameter). After that, the different samples have been shaken at 150 rpm for 1.5 h. After this time, the samples were evaluated from 30 minutes to 30 minutes. Finally, a spectrophotometer was used at 505 nm in order to quantified the absorbance values of the samples; and also, obtain the content of glucose in deproteinized whey. For this, a factorial design 3^2 was used. To summarize, the concentration of agar, the amount of inoculum of *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 and the interaction of the two factors have a significant effect (p-value < 0.05). The most appropriate concentration of agar is 4 %, and the optimum amount of inoculum *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y – 2415 immobilized 15 % and the percentage of hydrolysed lactose of 98.99 %.

Key words: agar, hydrolysis, deproteinized whey, *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El lactosuero es la fase acuosa separada de la cuajada en el proceso de elaboración del queso y representa el 80 – 90 % del volumen total de la leche que entra en el proceso y contiene alrededor de 50 % de los nutrientes de la leche original: proteínas solubles, lactosa, grasa, vitaminas y sales minerales. El contenido en lactosa esta entre 42 y 52 g/L, representando este el 70 % del contenido total del conjunto de solidos presentes. El lactosuero es, uno de los desechos más contaminantes de la industria de alimentos ya que por cada kg de queso elaborado se crea 9 L de suero, estimando que anualmente a nivel mundial se generan 110 millones de toneladas. Cada 1 000 L de lactosuero generan cerca de 35 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (TETRA PACK, 2003)

En el Perú, actualmente, en el campo de las industrias productoras de queso, se tiene un problema latente sin resolver, el cual se genera debido a la gran producción de suero compuesto que se desecha a través del alcantarillado municipal generando problemas de contaminación ambiental. Para tener una idea de la cantidad de suero que se produce solo en la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), se sabe que la planta piloto de leche destina entre 270 a 750 L de leche para la producción de quesos, por lo que se obtiene entre 235,17 a 653.25 L de suero diariamente (Román, 2009).

En la actualidad, el consumo de bebidas lácteas a partir de suero, está muy difundida por su valor nutritivo y menor costo. Industrialmente el suero sirve como ingrediente en la elaboración de kéfir y bebidas lácteas con frutas (Garibay y Quintero, 1993). Otra línea de producción creciente son las bebidas lácteas fermentadas con bacterias o mezclas de estas con levaduras, las cuales generalmente se mezclan con jugos u hortalizas u otros saborizantes (Garibay y Quintero, 1993).

La producción de β -galactosidasa o lactasa (EC.3.2.1.23), a partir de microorganismo como hongos, bacterias o levaduras utilizando suero lácteo como medio de fermentación, ha despertado gran interés, así como también el uso de esta enzima en la industria de alimentos, que es utilizada para la hidrólisis de la

molécula de lactosa en sus correspondientes monosacáridos, glucosa y galactosa. Esto permite la obtención de diversos productos lácteos, especialmente para el consumo por individuos intolerantes al disacárido. La hidrólisis de la lactosa modifica sus propiedades funcionales y previene la cristalización, aumentando la vida útil de los productos lácteos así como la disponibilidad de azúcares fácilmente fermentables (Barham y Trinder, 1997).

La hidrólisis enzimática de la lactosa del suero, es una técnica sencilla que permite el aprovechamiento de este subproducto de la industria láctea, el cual se ha convertido en un grave problema de contaminación ambiental, debido a que generalmente se descarga a ríos y desagües (Montiel, Carruyo, Marcano, y Mavárez, 2005).

La búsqueda de las posibilidades de obtención de productos ricos en vitaminas, aminoácidos y micro elementos para uso humano y animal es una preocupación actual. Una opción que se puede implementar para este fin, es el cultivo de microorganismos, por ejemplo, utilizando el suero lácteo desproteínizado como medio de cultivo. De esta manera se aprovecha la composición del suero que es rico en elementos básicos necesarios para la fermentación y a su vez se ayuda a solucionar el problema ecológico que generan sus componentes debido a su alta demanda de oxígeno (Román, 2009).

Para obtener este producto es necesario elegir un microorganismo que utilice la lactosa (componente principal del suero) como fuente de carbono para su crecimiento (Zalashko y Grushenko, 2001). El lactosuero desproteínizado puede utilizarse como medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos capaces de generar productos de utilidad. La enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 es una enzima intracelular inducible por carbohidratos como la lactosa (Urribarrí et al., 2004).

El pH, la temperatura, las condiciones de crecimiento, la calidad y la cantidad de sustrato influyen significativamente sobre la tasa específica de crecimiento de la levadura y en la actividad enzimática de la β -galactosidasa (Román y Linares, 2011).

En el presente trabajo, se buscó aprovechar el suero de la leche, utilizando la tecnología de inmovilización de células. Se establecen también los parámetros de concentración de agar y concentración de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas necesarios para que se pueda obtener un mejor porcentaje

de lactosa hidrolizada. Resaltando la importancia de la biotecnología en los procesos para el mejoramiento y aprovechamiento del lactosuero.

Para lo cual se ha planteado lo siguiente:

1.1 Problema de investigación

Problema general

- ✓ ¿Cuál es el efecto de la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas en el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado?

Problemas específicos

- ✓ ¿Cuál es la concentración adecuada de agar para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado?
- ✓ ¿Cuál es la cantidad optima del inóculo de *kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado?
- ✓ ¿De qué manera influye la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado?

1.2 Hipótesis de la investigación

Hipótesis general

- ✓ La concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas influyen significativamente en el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado.

Hipótesis específica

- ✓ La concentración de agar varía significativamente para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado.
- ✓ La cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas varía significativamente para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado.
- ✓ La interacción de la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas muestra diferencia

significativa para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.

1.3 Objetivos de la investigación

Objetivo general

- ✓ Determinar el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado con la concentración de agar y la cantidad óptima del inóculo de *kluveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas.

Objetivo específico

- ✓ Determinar la concentración adecuada de agar para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.
- ✓ Determinar la cantidad óptima del inóculo de *kluveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.
- ✓ Comparar la interacción de la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *kluveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes de la investigación

Ludeña (2000), en el trabajo de recuperación de suero de quesería para la producción de una bebida alcohólica en un sistema en lote, determinó los parámetros para la producción de una bebida alcohólica a partir de queso fresco con *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, mediante el sistema tradicional de cultivo en lote. Se utilizó suero de queso fresco de la Planta Piloto de Leche de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se determinó que el acondicionamiento del suero (pH 4.5 y desproteinizado) es óptimo mediante un tratamiento térmico de 121 °C por 15 minutos. Para la producción de la bebida alcohólica de suero en cultivo en lote, se obtiene el mejor rendimiento, de 11.5 °GL, utilizando una concentración inicial de 21 °Brix; 1 % de inóculo; pH 4.5 y 30 °C durante 20 días. Al evaluarse el metabisulfito de sodio (100 ppm) se determinó que disminuye el rendimiento en un 14.5 % (de 11.5 °GL a 9.83 °GL). La inactivación de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 es efectiva a 70 °C por 5 minutos; para la estabilización de la bebida se agregó 50 ppm de metabisulfito de sodio.

Santiago, Marquez, Cardoso y Ribeiro (2004), en el estudio de la producción de β -galactosidasa por fermentación de suero de queso con *Kluyveromyces marxianus*, realizaron la hidrólisis enzimática de la lactosa por β -galactosidasa juega un papel importante en el procesamiento de productos lácteos, como para obtener leche con un contenido bajo para el consumo por personas intolerantes a la lactosa y la prevención de la cristalización en los productos lácteos. En este estudio, la enzima β -galactosidasa se produce mediante el cultivo del microorganismo, *Kluyveromyces marxianus*, en medio de cultivo basado en suero de leche en diferentes concentraciones iniciales de lactosa y extracto de levadura, de acuerdo con un diseño factorial. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un incubador rotatorio a 150 rpm, a 30 °C y pH inicial 5.5, concentración celular inicial fue de 10^7 células/ml. Para la extracción de la enzima β -galactosidasa, se llevó a cabo la autólisis de las células utilizando cloroformo como disolvente en tampón de fosfato. El medio de cultivo suplemento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 y MgSO_4 , las concentraciones iniciales de lactosa y extracto de levadura igual a 50 g/l y 12 g/l,

respectivamente, se obtuvo una actividad de 28.0 UI/ml y una concentración celular máxima de 5.3 g/l.

Linares (2006), en el estudio del efecto de la variación del caudal de entrada de leche en un bioreactor enzimático continuo de lecho fluidizado con β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) inmovilizada en el rendimiento productivo de lactosa hidrolizada y caracterización de parámetros cinéticos y difusionales, realizaron en un bioreactor de columna de lecho fluidizado con desplazamiento vertical ascendente con enzimas inmovilizadas de β -galactosidasa de 1.6 l de capacidad cumplió con el objetivo de hidrolizar la lactosa de leche, demostrándose así que es factible la inmovilización de esta enzima en esferas de agar al 3 % y su utilización en la hidrólisis de lactosa de leche en un birreactor enzimático continuo. Un caudal de entrada de 37.5 ml/h de leche en el bioreactor produjo el mayor rendimiento, con un 33.79 % de lactosa hidrolizada. Los parámetros cinéticos y difusionales para el birreactor de lecho fluidizado con enzimas de β -galactosidasa inmovilizadas en esferas de agar fueron de: Peclet (Pe) de 5.06×10^5 y el número de Biot (Bi) de 304.6, la principal limitación difusional encontrada en el birreactor fue a nivel de la matriz de soporte. El proceso de inmovilización produjo una disminución sobre la afinidad de la enzima al sustrato del orden del 20 al 25 %.

Mogrovejo y Urgiles (2009), en el estudio de optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando β -galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual, con el propósito del presente trabajo fue la optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando β -galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual. Esta investigación logró determinar los parámetros más relevantes para la preparación y estandarización de las perlas de alginato como también el atrapamiento del catalizador biológico en dichas perlas. Con el objetivo de determinar el mejor rendimiento de la enzima inmovilizada en el proceso de hidrólisis de la leche, mediante el diseño experimental se obtuvo el mejor resultado al alcanzar el 1 % de lactosa residual demostrando que existe hidrólisis en las muestras, lo cual nos ofrece un método innovador para la industria láctea en general.

Román y Linares (2011), en el estudio del efecto de la concentración de agar y relación células inmovilizadas/sustrato en la hidrólisis de lactosuero

desproteínizado en un biorreactor de lecho fluidizado con *Kluyveromyces sp.*, se evaluó el efecto de la concentración de agar (3 % - 5 %) y relación células inmovilizadas/sustrato (5 % - 15 % v/v) en la hidrólisis de lactosuero desproteínizado en un biorreactor de lecho fluidizado con *Kluyveromyces sp.*, empleando la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó un diseño compuesto central rotacional (DCCR) sin repetición, con dos factores: concentración de agar y relación células inmovilizadas/sustrato como variable independiente, y como variable dependiente el porcentaje de lactosa hidrolizada. El biorreactor de vidrio cilíndrico tuvo una altura de 36.5 cm y un diámetro de 2.4 cm con 2 cribas con orificios de 2.0 mm de diámetro y un volumen de 175 ml. Las células inmovilizadas en el biorreactor, fueron evaluadas cada 2.5 horas y dentro de ese tiempo se tomaron muestras de lactosuero desproteínizado cada 30 minutos respectivamente, por último se utilizó un espectrofotómetro para observar los valores de absorbancia de la muestra y con éstos obtener el contenido de glucosa en dicho lactosuero. Los resultados óptimos obtenidos estadísticamente determinaron que la concentración más adecuada de agar es de 4 %, relación células inmovilizadas/sustrato de 12.6 % y el porcentaje de lactosa hidrolizada de 98.33 %.

Sánchez et al. (2014), en el estudio del efecto del tamaño de perla y de la concentración de alginato de sodio en la difusividad efectiva de los azúcares solubles y en la producción alcohólica a partir de mosto de uva (*Vitis vinifera*) variedad cardinal con biorreactor estático utilizando células inmovilizadas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), señala que, en el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del tamaño de las perlas de alginato (4.596 ± 0.452 y 2.532 ± 0.294 mm de diámetro) y la concentración de alginato de sodio (3 %, 3.5 % y 4 %) en la difusividad efectiva en células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de alcohol en mosto de *Vitis vinifera* variedad cardinal con biorreactores estáticos, utilizando un diseño factorial 2 x 3, con 3 repeticiones y dos factores: tamaño de las perlas de alginato y concentración de alginato de sodio y como variables dependiente el consumo de azúcar, producción de alcohol, rendimiento de la producción de alcohol respecto al sustrato y difusividad efectiva en las perlas. Se usó un biorreactor simple estático sin aireación, para un volumen de 1000 ml de mosto. Con una relación de 1.8 % de volumen de perlas respecto al mosto. A menor tamaño de las perlas y concentración de alginato se obtuvo la mejor producción

y rendimiento de alcohol. La difusividad efectiva se evaluó para F_0 entre 0.018 y 0.19 que presenta un intervalo de 48 a 84 horas obteniéndose una mayor difusividad en las perlas de mayor tamaño.

Antezana (2015), en el estudio del efecto de la hidrólisis enzimática de la lactosa en el perfil de textura de queso fresco normal y bajo en grasa, señala que la tendencia actual hacia el desarrollo de derivados lácteos deslactosados, ha incrementado el interés de la industria por la investigación de dichos parámetros, que ayuden a la caracterización e innovación de nuevos productos. El presente trabajo de investigación evaluó el efecto de la hidrólisis enzimática de la lactosa y la reducción del contenido graso en la reología del queso fresco. La primera etapa de esta investigación, consistió en estandarizar la leche en 2 y 3 % el contenido de grasa e hidrolizar la lactosa con la enzima HA-LACTASE 3.000 L.A.U. en una dosis de 4 ml/l a 40 °C monitoreando el proceso por 100 min. Luego se elaboró queso fresco con leche estandarizada con y sin hidrólisis de la lactosa. Se evaluó la reología de los quesos frescos elaborados mediante *Texture Profile Analysis* (TPA) en muestras de 15 mm de diámetro por 15 mm de altura, a una compresión del 75 % y velocidad constante de 100 mm.min⁻¹. La hidrólisis en leche con 3 % de grasa, originó un queso fresco con mayor cohesividad, mientras que en leche con 2 % de grasa originó un queso fresco con mayor dureza, menor elasticidad y menor cohesividad. Mientras que la reducción del contenido graso afectó la reología del queso fresco deslactosado, el cual presentó mayor dureza, gomosidad y masticabilidad.

Wolf, Gasparin y Tadeu (2018), en la hidrólisis de lactosa usando β -d-galactosidasa inmovilizada en un hidrogel modificado basado en goma arábica para la producción de leche sin lactosa/baja en lactosa, se utilizó la β -d-galactosidasa que se inmovilizó en un hidrogel modificado basado en goma arábica para la hidrólisis de lactosa estándar y lactosa contenida en leche UHT con el objetivo de producir leche sin lactosa/baja lactosa. El hidrogel se sintetizó por reticulación de la goma arábica modificada con acrilamida, usando persulfato de potasio como iniciador. La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier y la microscopía electrónica de barrido confirmaron la formación del hidrogel y su red porosa tridimensional. Los grados de hinchamiento en agua destilada, agua potable, solución de tampón fosfato a pH 7,0 y solución tampón de acetato a pH 4,0 fueron 12,56 y 17,72, 10,65 y 12,58, 8,58 y 10,71, y 6,49 y 8,16 g de agua por g de hidrogel seco a temperatura ambiente y 37.0 \pm 1.0 °C,

respectivamente. Las capacidades de inmovilización de β -d-galactosidasa en soluciones tampón de acetato y fosfato a temperatura ambiente fueron 242.52 ± 0.13 y 118.42 ± 0.23 mg de enzima por g de hidrogel seco, respectivamente, después de 1440 min de contacto. Se encontraron actividades enzimáticas más altas después de la inmovilización en solución tampón de fosfato debido al punto isoelectrónico de la β -d-galactosidasa. La hidrólisis de lactosa y lactosa estándar contenidas en la leche UHT fue más eficaz usando β -d-galactosidasa inmovilizada que con β -d-galactosidasa libre. La β -d-galactosidasa inmovilizada se aplicó para tres ciclos de hidrólisis de lactosa sin perder significativamente la actividad enzimática.

2.2 Lactosuero

Es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración de quesos, que se obtiene tras la separación de la caseína y grasas, de aspecto turbio y blanco amarillento, además constituye casi el 90 % del volumen de la leche y contiene los compuestos hidrosolubles de la misma. Se ha estimado que por cada kilogramo de queso producido se obtienen entre 9 y 10 litros de suero (Rubiolo, 2010), los compuestos solubles en su mayoría son proteínas (6 - 8 g/l), azúcares, especialmente lactosa (44 - 52 g/l), y sales minerales (4.3 - 9.5 g/l). El lactosuero contiene un 25 % de las proteínas de la leche, cerca del 8 % de la materia grasa y el 95 % de la lactosa (Torres, 2012).

El lactosuero es un subproducto de la fabricación de queso fresco, y se caracteriza porque contiene proteínas y fracciones proteicas de alto valor biológico como la β -lactoglobulina (6 - 8 g/l), la α -lactoalbúmina (1 - 2 g/l), péptidos, albúmina sérica (0.4 g/l), inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa y glicomacropéptidos, alta cantidad de lactosa (44 - 52 g/l), minerales (4.3-9.5 g/l) y vitaminas (Londoño, Sepúlveda, Hernández, y Parra, 2008).

2.2.1 Tipos de lactosuero

Inda (2000), menciona que el suero contiene un poco más del 25 % de las proteínas de la leche, cerca del 8 % de la materia grasa y cerca del 95 % de la lactosa. El lactosuero puede clasificarse en suero dulce o suero ácido, según la leche utilizada, el tipo de queso a fabricar y el sistema de coagulación. La composición del lactosuero teniendo en cuenta ésta

clasificación, se presenta en la Tabla 01. No todos los lactosueros son iguales, una de las diferencias principales entre ellos es su composición, que depende no solamente de la composición de la leche para quesería y del contenido de humedad del queso sino, de manera muy significativa, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada. Los lactosueros de quesos más ácidos tienen mayor contenido de minerales que los lactosueros de quesos menos ácidos.

Tabla 1: Composición (%) del lactosuero dulce y ácido.

Componente	Suero dulce	Suero ácido
Humedad	93 - 94	94 - 95
Grasa	0.2 – 0.7	0.04
Proteínas	0.8 – 1.0	0.8 – 1.0
Lactosa	4.5 – 5.0	4.5 – 5.0
Sales Minerales	0.005	0.4

Fuente: Inda, (2000).

Los sueros ácidos (pH, 3.57 a 4.34) y dulces (pH, 6.02 a 6.58) pueden ser condensados, secados, fermentados, deslactosados, demineralizados y desproteinizados (Rubiolo, 2010). Utilizando tecnologías como la ultrafiltración, ósmosis inversa, intercambio de iones y electro diálisis. Además, la preparación de formulaciones para niños recién nacidos, ha sido un negocio rentable a nivel mundial (Torres, 2012).

2.2.2 Utilización del lactosuero como medio de cultivo

Independiente de que microorganismos se utilice, para que el proceso de producción del producto proteico y vitamínico sea económicamente favorable es necesario elegir un medio de cultivo sencillo y barato. Los microorganismos pueden usar como sustrato muchas sustancias carbonadas, como la celulosa, el metanol, el suero lácteo o los derivados del petróleo. El petróleo ofrece el mejor rendimiento en su transformación de alimentos, pero su demanda como combustible hace caro su uso en la industria de alimentos. Los residuos de celulosa procedente de la madera

u otras plantas son los candidatos más obvios para ser utilizados como medios de cultivos, pero son relativamente pocos los microorganismos capaces de usar la celulosa o la lignina, a menudo presente en ellos (Tortora, Funke, y Case, 2007).

Actualmente, existen varias alternativas biotecnológicas que usan al suero lácteo como medio de cultivo, aprovechando su composición química para la elaboración de distintos productos en la industria alimentaria y reduciendo el problema ecológico que generan sus componentes (Revillion, Brandelli, y Záchia, 2003).

Tabla 2: Caracterización físico química del suero entero.

Análisis	Suero entero
Proteínas	0.8 – 1 %
Grasa	0.4 – 0.5 %
Densidad	1.026 g/cc
SS	6.00
Humedad	94.0 %
Cenizas	6.20 g/L
pH	6.5 – 6.6
Lactosa	2.85 %

Fuente: Ludeña, (2000).

2.2.3 Desproteínizado de lactosuero

El desproteínizado consiste en la precipitación selectiva, que es uno de los métodos más usados para separar proteínas del lactosuero (Román, 2009). Es un proceso que consiste en el ajuste de las propiedades físico-químicas de una disolución para promover la insolubilidad de algunos de sus componentes. Cada una de las proteínas del lactosuero presenta una solubilidad diferente en función del pH, temperatura y fuerza iónica a la que se encuentre. Por tanto, variando el ambiente físico-químico del lactosuero se conseguirá obtener dos fracciones: un sobrenadante más diluido que la alimentación y un precipitado más concentrado en el ó los componentes insolubles en esas condiciones (Almécija, 2007).

Las proteínas del lactosuero se caracterizan por tener un alto valor biológico, es decir, son absorbidas casi en su totalidad por el sistema digestivo. Los principales componentes, así como su concentración (Almécija, 2007), se resume en la tabla 03.

Tabla 3: Concentración de las principales proteínas del lactosuero.

Proteínas	Concentración (g/l)
B-lactoglobulina	4.00
α -lactoalbúmina	1.50
Inmunoglobulinas	0.80
Seroalbúmina	0.40
Lactoferrina	0.10
Otras	1.50

Fuente: Coultate, (2002).

Estas proteínas son muy utilizadas en la industria alimentaria debido a su amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales. Entre estas últimas destacan la solubilidad, viscosidad, capacidad de retención de agua y sus cualidades como agentes gelificantes, emulsificantes y espumantes (Firebaugh y Daubert, 2005).

Tabla 4: Caracterización química de lactosuero desproteinizado.

Características	Valor mínimo	Vapor promedio	Valor máximo
% Humedad	92.62	93.83	96.56
% Sólidos totales	3.44	6.17	7.38
% Proteína	0.37	0.44	0.49
% Lactosa	3.80	4.85	5.65
% Acidez	0.30	0.43	0.58
pH	4.5	4.58	4.62

Fuente: Chinappi y Sánchez, (2000).

2.3 Lactosa

La lactosa o azúcar de la leche es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes en todas las leches. De los componentes de la leche es el más abundante (40% de los sólidos de la leche de vaca), el de estructura química más simple y el más constante en proporción. La lactosa es menos dulce y soluble que la sacarosa y no siempre puede ser absorbida por el sistema digestivo humano (Rubiolo, 2010).

La lactosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa) es una hexobiosa de fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11}$, y está constituida por una molécula de galactosa y otra de glucosa, unidas mediante un enlace glucosídico β(1,4), (Badui, 2006), con un peso molecular de 342 g/g-mol (Mammarella, 2005), este disacárido presenta las características de los azúcares reductores (Badui, 2006). Existe bajo dos formas isómeras: α y β, que se diferencian únicamente en la posición de un grupo -OH en el carbono C₁ de la glucosa (isomería ciclánica) (Figura 01) (Rubiolo, 2010).

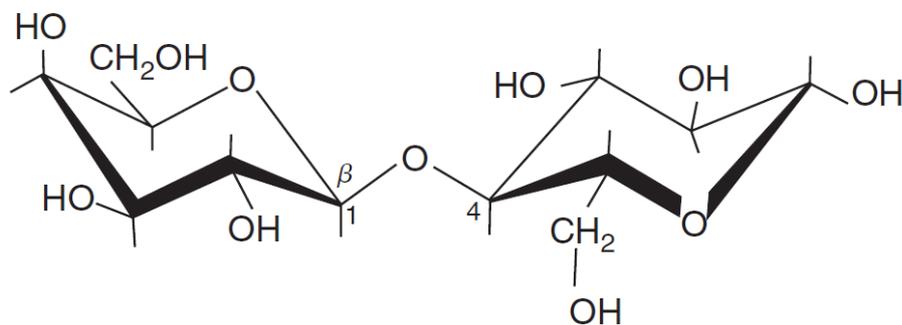


Figura 1: Estructura molecular de la lactosa

Fuente: Badui, (2006).

Además, se conoce la forma hidratada $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$. La lactosa está, por lo tanto formada por la unión de una molécula de β-galactosa y una molécula de glucosa α o β. Debe destacarse que la lactosa es un azúcar relativamente poco soluble: unas 10 veces menos que el azúcar ordinario. La solubilidad de la lactosa aumenta con la temperatura (Figura 02). Por tanto, cristaliza al enfriar sus soluciones concentradas. Con la lactosa no se pueden obtener jarabes espesos ni confituras estables a la temperatura ordinaria. Las soluciones concentradas de lactosa quedan en estado de sobresaturación durante la

refrigeración; a 25°C la solubilidad límite de la lactosa es de 22 g por 100 ml de agua, por lo que una solución de lactosa con 50 g por 100 ml de agua, enfriada a esa temperatura, comienza a cristalizar naturalmente (Rubiolo, 2010).

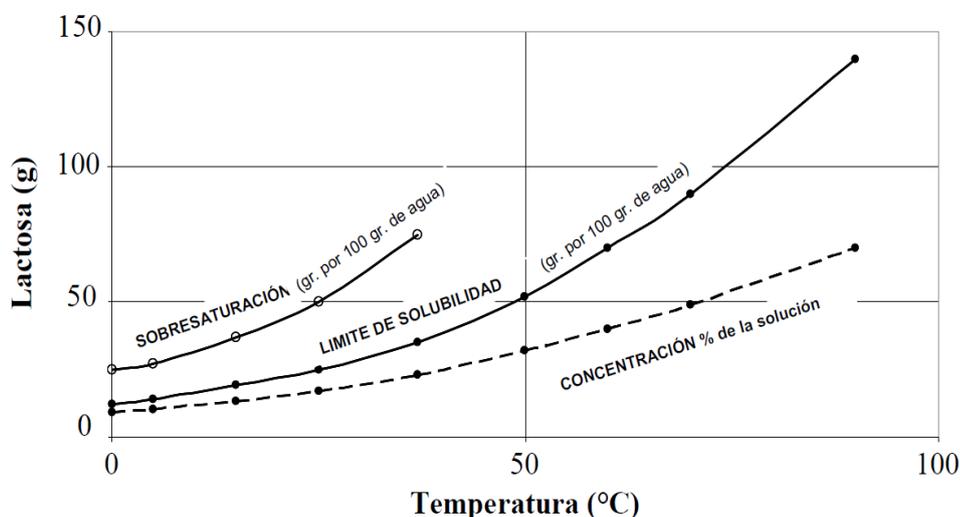


Figura 2: Solubilidad de la lactosa

Fuente: Rubiolo, (2010).

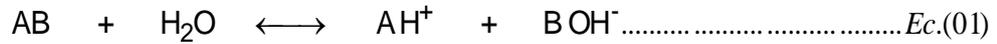
2.3.1 Intolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactosa es un problema que ocasiona malestares gastrointestinales, sólo que éste se produce debido a la falta de la actividad de β -galactosidasa (Badui, 2006), significa que no hay suficiente enzima (lactasa) en el intestino delgado para romper toda la lactosa consumida. La lactosa digerida parcialmente pasara al intestino grueso y puede provocar todos sus síntomas desagradables, como náusea, cólicos y diarrea con espuma, que suelen presentarse entre una y dos horas después de consumir un producto que la contenga (Solís, 1990), La intolerancia a la lactosa es rara en los niños; sin embargo, la producción de la lactasa empieza a reducirse a partir de los 2 años de edad. La intolerancia a la lactosa afecta a un elevado número de personas en el mundo; entre éstos un 60 a 90 % se encuentra entre personas de raza negra, nativos norteamericanos, hispanos, asiáticos, judíos y árabes (Badui, 2006).

2.3.2 Hidrólisis

La hidrólisis es el proceso químico en el cual una molécula es separada en dos partes por la adición de una molécula de agua. La reacción se lleva a

cabo cuando uno de los fragmentos del par molecular gana una molécula de hidrogeno (H^+) mientras que el otro grupo recibe un grupo hidroxilo (OH^-), (Lipa y Maquera, 2013).



La reacción de hidrólisis se puede representar por una ecuación reversible de tipo ácido-base (Ecuación 01) la cual implica varios pasos; la etapa más lenta es cuando se genera un enlace covalente entre los átomos de oxígeno de la molécula de agua y el átomo de carbono. Posteriormente los enlaces carbono-oxígeno de los grupos funcionales y los iones de hidrogeno desprendidos de la molécula de agua se unen a la molécula de alcohol naciente (Boyer, 2000).

2.3.3 Hidrólisis de la lactosa

La lactosa, disacárido formado por glucosa y galactosa, es prácticamente el único carbohidrato presente en la leche, en la que se encuentra en una concentración de 4.75 a 5.2 % en la leche de vaca, 6.5 % en la leche humana y alrededor de 4.5 % en la leche cabra y oveja (Solís, 1990).

La hidrólisis enzimática de este azúcar es efectuado por la β -galactosidasa o lactasa, la cual mediante la inclusión de una molécula de agua rompe el enlace glucosídico $\beta(1,4)$ que une los dos monómeros (figura 03). Esta enzima es producida en los mamíferos en el intestino delgado, principalmente en el yeyuno, en donde se efectúa la hidrólisis y la absorción de los monosacáridos (Linares, 2006).

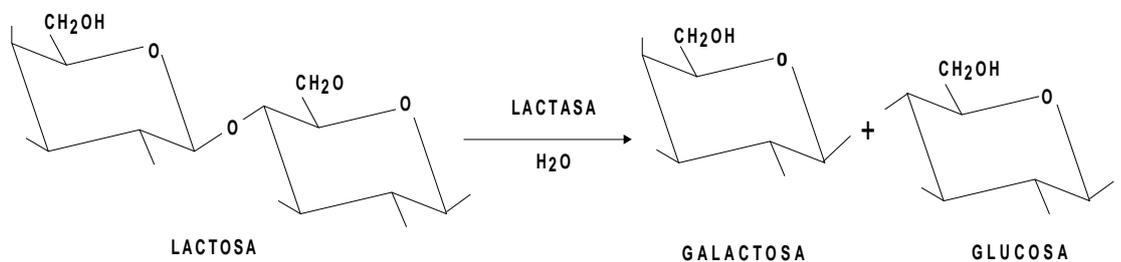


Figura 3: Hidrólisis de la lactosa por β -galactosidasa

Fuente: García et al. (1999).

La hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa es interesante desde varios puntos de vista. Un porcentaje significativo de la población mundial es intolerante a la lactosa, por lo que no puede beber leche sin sufrir diarreas y problemas gastrointestinales (Badui, 2006). En segundo lugar, la producción de quesos da lugar a suero como subproducto, que contiene concentrados relativamente altas de lactosa. La utilización de este subproducto viene limitada porque este disacárido tiende a cristalizar fácilmente, por lo que anualmente se desechan grandes cantidades de suero, ocasionando problemas para su eliminación así como la pérdida de potenciales nutrientes. En tercer lugar, la lactosa es un azúcar relativamente insoluble y origina muchos problemas al cristalizar durante el almacenamiento o transporte de suero, particularmente si este está concentrado (Wiseman, 1991).

2.3.4 Catalizador

Un catalizador es una sustancia capaz de acelerar una reacción química sin sufrir cambios significativos. Las enzimas son proteínas capaces de catalizar reacciones bioquímicas específicas. Fue Berzelius quien sugirió en 1836 el término “catalizador” para designar a aquellas sustancias capaces de “activar, por su sola presencia, afinidades que se encuentran a estado latente a una temperatura dada”. Asigno este fenómeno a un misterioso “poder catalítico”. Las sustancias que sufren la transformación en presencia de la enzima reciben el nombre de sustrato de dicha enzima. Muchas enzimas son proteínas conjugadas. La parte proteica, denominada “grupo prostético”, se encuentra a menudo débilmente unida a la proteína y puede separarse por diálisis. En estos casos, la parte proteica se denomina “apoenzima” y el grupo prostético “coenzima” o “cofactor”. El sistema apoenzima-coenzima se conoce como “holoenzima” (Villarreal, 2010).

2.3.5 Sustrato

Los sustratos son componentes del medio capaz de sustentar el crecimiento de microorganismos o la producción de metabolitos secundarios. La función del medio nutriente es idéntica a la de los medios de reacción química, es decir, proporcionar los componentes químicos necesarios y en las proporciones adecuadas para que la reacción ocurra. En edición, debe

asegurar los componentes que garanticen el crecimiento de los microorganismos en todas sus facetas, en la forma más accesible, o sea, en medio líquido. Solo en casos especiales se usan medios con nutrientes sólidos o gaseosos. Además de los componentes esenciales, como fuente de carbono y de energía y nitrógeno, el medio debe contener otros muchos nutrientes que se requieren para la propagación de las células microbianas (Román, 2009).

2.3.6 Enzimas para la hidrólisis de la lactosa

Las principales fuentes comerciales de la enzima β -galactosidasa son los microorganismos: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli*. Las preparaciones de lactasa pura se obtienen a partir de *Escherichia coli*, *Candida pseudotropicalis*, *Zymomonas mobilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* y hongos. Las lactasas obtenidas de *Escherichia coli*, *Candida pseudotropicalis* y *Zymomonas mobilis* se utilizan mayoritariamente en química analítica. Entre las lactasas obtenidas de la levadura *Kluyveromyces lactis* es por el momento la más utilizada a escala comercial (Rubiolo, 2010).

La lactosa se puede hidrolizar mediante, las lactasas de interés comercial incluyen las de los hongos *Aspergillus oryzae*, *A. niger* y las de las levaduras *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *torula cremoris*, y *Bacillus sp*, en forma inmovilizadas (Wiseman, 1991).

2.3.7 *Kluyveromyces fragilis*

Kluyveromyces fragilis es una especie fermentadora de la lactosa que se explota en pequeña escala para la producción de alcohol a partir del suero de la leche, su reproducción es asexual, la gemación multilateral ocurre en una base estrecha, las células son ovoides, elipsoides, cilíndricas o alargadas. Pseudohyphae se puede formar, pero las hifas verdaderas no se producen. En la reproducción sexual se ve que la conjugación puede o no preceder a la formación del asco. Las ascosporas son lisas, reniformes, baciliformes, elipsoidales o esféricas y tienden a aglutinarse después de la liberación. Se forman de uno a cuatro ascosporas por ascus. En fisiología y bioquímica, se observa que la especie fermenta la glucosa enérgicamente (Kurtzman, Fell y Boekhout, 2011).

Clasificación taxonómica de *Kluyveromyces fragilis*

REINO: *Fungi*

FILO: *Ascomycota*

SUBFILO: *Saccharomycotina*

CLASE: *Saccharomycetes*

ORDEN: *Saccharomycetales*

FAMILIA: *Saccharomycetaceae*

GÉNERO: *Kluyveromyces*

ESPECIE: *K. Fragilis*

Fuente: Rubiolo, (2010).

2.3.8 Característica de *kluyveromyces fragilis*

Es capaz de realizar la conversión directa de la lactosa en etanol, gracias a la actuación de una permeasa específica (lactosa-permeasa), codificada por el gen LAC12, este sistema asocia el transporte de una molécula de lactosa con el de un H⁺. El flujo de H⁺ es generado por una ATPasa adjunta a la membrana plasmática en el interior de la célula; realizando la fermentación de ese azúcar ya que tienen la capacidad de producir la enzima β-galactosidasa, que hidroliza lactosa en glucosa y galactosa (Barrios y Quispe, 2014).

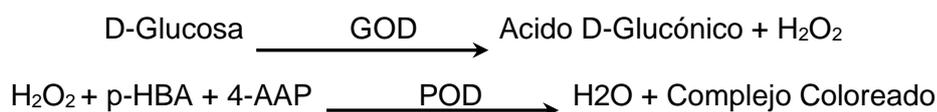
Es una de las especies más estudiadas, es considerada el organismo modelo del género *Kluyveromyces*, sin embargo *Kluyveromyces fragilis* ha sido estudiado en los últimos años por causa de sus ventajas en potencial biotecnológico. De esta forma esta levadura ha sido aceptada por las industrias porque posee características que son deseables para las aplicaciones biotecnológicas. *Kluyveromyces* es una levadura respiro-fermentativa, generando energía a través del ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico) o por fermentación en etanol. En contraste con *S. Cerevisiae*, las levaduras respiro-fermentativas no exploran plenamente su capacidad de captación de glucosa durante el crecimiento oxidativo. Sobre todo *Kluyveromyces* es capaz de realizar simultáneamente fermentación y respiración, siendo el equilibrio entre estas dos vías (Barrios y Quispe, 2014). La fermentación aerobia y anaerobia por la levadura *Kluyveromyces* en el tratamiento de reducción del potencial contaminante del suero y

también para la obtención de productos como proteínas celulares, enzimas, biomasa microbiana y etanol (Ferreira, 2006).

2.4 Método para determinar la glucosa

2.4.1 Método glucosa oxidasa

La glucosa reacciona con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas Glucosa Oxidasa (GOD) y Peroxidasa (POD). En la primera etapa la glucosa es oxidada a Acido Glucónico por la acción de la enzima (GOD), liberándose como producto H_2O_2 , el cual en una reacción mediada por la enzima (POD), reacciona con el Ácido p-Hidroxibenzoico y 4-Aminoantipirina produciéndose un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 505 nm., en cantidad proporcional a la cantidad de Glucosa presente en la muestra (Valtek, 2014)



Fuente: Valtek, (2014).

La glucosa oxidasa es ampliamente utilizada para la determinación y cuantificación de glucosa libre en los fluidos biológicos, tales como sangre y orina, en materia prima vegetal (naranja, durazno, tomate) y de verduras (zanahoria) y en la industria de los alimentos (jugos, néctares, vino). Tiene además muchas aplicaciones en biotecnología, y se utiliza para la fabricación de biosensores sensibles a glucosa, usualmente se extrae de *Aspergillus niger* (Barham y Trinder, 1997).

2.5 Inmovilización

La inmovilización se define como el proceso por el cual el movimiento de las enzimas, células, orgánulos, etc., en el espacio se ve restringido total o parcialmente, dando lugar a una forma de enzima insoluble en agua. Las enzimas inmovilizadas son enzimas unidos, insolubilizados, soportados o ligados a una matriz (Rubiolo, 2010).

La inmovilización de células es la unión o su incorporación en un sistema de fase sólida específica que permite el intercambio de sustratos, productos, inhibidores, etc. Pero al mismo tiempo, separa la biomasa celular catalítica de la fase que contiene los sustratos y productos (Román, 2009).

La inmovilización de enzimas es aquella en la que las enzimas se encuentran físicamente confinados o localizados en una región definida de espacio manteniendo su actividad catalítica, y pueden ser repetida y continuamente utilizadas (Chibata, 1978). El término de “inmovilización” también es aplicable a orgánulos celulares y a células tanto microbianas como de plantas o de animales. La inmovilización de células tiene una serie de ventajas para los procesos industriales de fermentación como: aumento de la productividad, estabilidad celular y reducción de los costes del proceso debido a la fácil recuperación y reciclaje de las células (Lizarraga, 2012).

La tecnología de inmovilización celular disminuye la mayoría de los problemas que plantea la fermentación utilizando células libres. Este sistema tiene la ventaja de poder manejar la densidad celular, previa al inicio de la fermentación. Además, facilita el sistema de operación del proceso de fermentación continua, evitando el paso de eliminar células del fermentador (Linares, 2006). La inmovilización celular desacopla el crecimiento microbiano de los procesos metabólicos de interés industrial (Lizarraga, 2012). Es así, que diversos grupos de investigación han empleado este sistema de células inmovilizadas para la obtención de variados productos de interés industrial, asimismo, en el tratamiento de desechos de residuos líquidos y sólidos (Olano, 2004).

La inmovilización biológica es una técnica mediante la cual, las moléculas biológicas, enzimas, organismos o células son fijados a superficies o atrapados en matrices para ser reutilizados protegiendo el material biológico frágil (Julca, 2013).

2.5.1 Método de inmovilización

En años recientes ha cobrado auge el desarrollo de la tecnología enzimática, fundamentalmente en el campo de la inmovilización de enzimas y células (Arellano, 2010), para la inmovilización celular se utilizará el atrapamiento en gel de agar.

A. Métodos de inmovilización de enzimas por retención física

A.1. Atrapamiento

Este método de inmovilización se basa en la localización de un enzima dentro de la red espacial de una matriz polimérica o de una membrana, de forma que se evite la liberación de la proteína sin impedir la penetración

del sustrato. Puesto que la enzima no está unido de ninguna forma al gel o a la membrana, el método puede aplicarse más generalmente que cualquier otro para el atrapado de cualquier tipo de enzimas, células microbianas y orgánulos de diferentes tamaños y propiedades, con poca pérdida de la actividad biológica (Linares, 2006).

a. Atrapado en geles

El método de atrapado en geles se basa en la localización de las enzimas dentro de los espacios intersticiales de geles poliméricos entrecruzados insolubles en agua. La oclusión en geles de poliacrilamida entrecruzados fue la primera técnica de atrapado empleada. Se han utilizado también otras matrices para atrapar una gran variedad de enzimas (Lizarraga, 2012).

b. Atrapado en fibras

Se desarrolla un método de inmovilización de enzimas por atrapado dentro de las microcavidades de las fibras sintéticas, de forma que las moléculas de enzima pudieran quedar atrapadas en fibras producidas continuamente mediante técnicas convencionales de hilado en húmedo destinadas a la manufactura de fibras sintéticas, utilizando aparatos muy similares a los de la industria textil (Linares, 2006).

c. Microencapsulado

El microencapsulado de enzimas consiste en atrapar la enzima en membranas poliméricas semipermeables esféricas cuyos diámetros oscilan entre 1 y 100 μ . Las enzimas inmovilizadas de esta forma están contenidas físicamente dentro de la membrana y las moléculas de producto y sustrato deben difundir a través de ella libremente siempre que sus tamaños sean los suficientemente pequeños para que esto sea factible (Linares, 2006).

2.5.2 Elección del método de inmovilización

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosos enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todas las enzimas en todos los casos. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer

generalizaciones sobre cada método de inmovilización (tabla 05) y así, podremos seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. La elección ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores (Román, 2009).

Tabla 5: Comparación de los diferentes métodos de inmovilización.

Método	Inclusión de membranas	Atrapamiento	Reticulado	Adsorción química	Unión covalente
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Débil	Media	Débil-media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media - alta	Baja	baja	Media	Alta
Regeneración soporte	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Coste proceso	Medio – alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alto	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Si	Si	Si	No	No

Fuente: Román, (2009).

En general, los métodos de preparación difícil y de mayor costo proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos; en cambio aquellos métodos más sencillos como el atrapamiento, donde la unión de la enzima con el soporte es media y de bajo costo, con estabilidad adecuada y resistencia microbiana.

2.5.3 Efectos de la inmovilización

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada en un sistema heterogéneo en el cual todo los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustrato, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.), se encuentran en interface: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática

se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno (Román, 2009).

2.5.6 Matrices utilizadas como soportes de enzimas

Las características de la matriz sobre la que se realizará la inmovilización, son de suma importancia para determinar el desempeño de las enzimas y células inmovilizadas, un soporte ideal incluye las siguientes propiedades: resistencia física a la compresión, hidrofiliidad, inerte a las enzimas, biocompatibilidad, resistencia al ataque de microorganismos, disponibilidad y bajo costo (Rubiolo, 2010).

Tabla 6: Clasificación de los soportes

Orgánicos
Polímeros naturales
<ul style="list-style-type: none"> • Polisacáridos: celulosa, dextranos, agar-agar, agarosa, quitina, alginato. • Proteínas: colágeno, albumina • Carbón
Polímeros sintéticos
<ul style="list-style-type: none"> • Poliestireno • Otros polímeros: poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamidas, poliamidas, vinilo, polietersulfona
Inorgánicos
Minerales naturales: bentonita, sílica.
Materiales procesados: vidrio (no poroso y de poros controlado), metales, óxidos de metal de poro controlado.

Fuente: Rubiolo, (2010).

2.5.6.1 Agar

El agar es un polisacárido lineal procedente de las algas rojas (Multon, 2000), entre las que se encuentran *Gelidium cartilagineum*, *G. amansii*, *G. corneum*, *G. liatum*, *G. linguatum*, *G. pacificum*, *G. sesquipedale* (Badui, 2006), y de la familia de las Rodofíceas (Multon, 2000), formado por residuos alternados de β -D-galactopiranososa y 3,6-anhidro- α -L-

galactopiranosas unidos por enlaces (1→3) y (1→4) respectivamente, que contiene menos del 4.5 % de grupos sulfato (Nieto, Santacruz, y Moreno, 2013). Hasta 21 % de las unidades de α -D-galactosa pueden tener grupos metoxilo, los cuales se considera están relacionados con la temperatura de gelificación del agar; a mayor porcentaje de grupos metoxilo, mayor será la temperatura de gelificación. Sus geles son muy resistentes mecánicamente, y estables al calor (Badui, 2006).

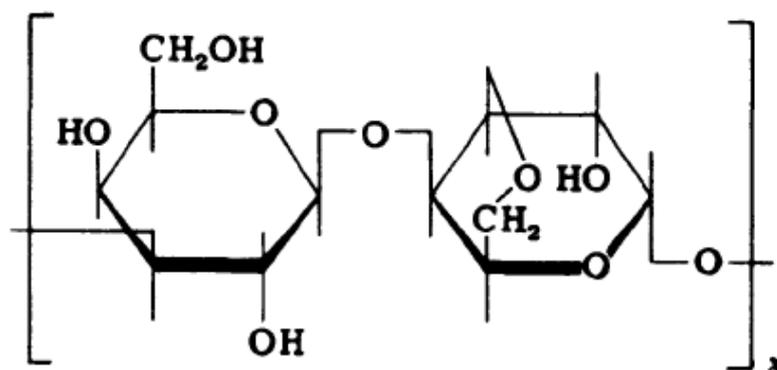


Figura 4: Estructura química de agar

Fuente: Nieto et al. (2013).

2.6 Agitación

La agitación es un proceso que contiene agitador magnético, consiste de una pequeña barra magnética (llamada barra de agitación) la cual está normalmente cubierta por una capa de plástico (usualmente teflón) y una placa debajo de la cual se tiene un magneto rotatorio o una serie de electromagnetos dispuestos en forma circular a fin de crear un campo magnético rotatorio. Es muy frecuente que tal placa tenga un arreglo de resistencia eléctrica con la finalidad de dotarle de calor necesario para calentar algunas soluciones químicas. Durante la operación de un agitador magnético típico, la barra magnética de agitación (también llamado pulga, frijol o bala magnética) es deslizada dentro de un contenedor ya sea un matraz o vaso precipitado de vidrio borosilicato preferentemente conteniendo algún líquido para agitarle. Los agitadores magnéticos resuelven dos problemas mayores al usarse en lugar de los agitadores motorizados. Primero, los agitadores motorizados requieren el uso de lubricantes, los cuales pueden en un momento dado contaminar los reactivos. Segundo, en un agitador motorizado el sellar herméticamente la conexión mecánica rotatoria del agitador motorizado puede ser un problema en el caso de

tratarse de un sistema cerrado, o por regulación ambiental o por tratarse de un proceso en el cual debe haber ausencia de polvo, agua u oxígeno; sus desventajas, las limitadas dimensiones de la barra de agitación significan que no pueden ser utilizados más que para experimentos a nivel laboratorio (en pequeña escala o análisis químico). Además los líquidos viscosos o suspensiones espesas, son muy difíciles de agitar por este dispositivo, aunque existen algunos modelos con imanes especiales que consiguen el objetivo (Villarreal, 2010).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología e industrias lácteas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional José María Arguedas (UNAJMA), ubicada en el barrio de Santa Rosa del distrito de Talavera, Provincia de Andahuaylas del departamento de Apurímac.

3.2 Material de estudio

3.2.1 Población

Se consideró como universo y/o población de 18 litros de lactosuero que se obtuvo de la elaboración de queso fresco, que se ha procesado en el laboratorio de industrias lácteas de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional José María Arguedas (UNAJMA), de la leche fresca que fue adquirida del centro experimental de INIA ubicada en el barrio de Chumbibamba del distrito de Talavera, Provincia de Andahuaylas del departamento de Apurímac.

El centro experimental INIA se encuentra ubicada al noroeste del distrito de Talavera entre las coordenadas geográficas LO: 73°27'30.04" y LS: 13°38'42.30" del meridiano de Greenwich, 2790 msnm.

3.2.2 Muestra

Se consideró como muestra el lactosuero del primer desuerado de 4 litros, debido a que el lactosuero a utilizarse es de la misma densidad poblacional con la finalidad de obtener los resultados deseados.

3.2.3 Unidad de análisis

Para el estudio la unidad de análisis de investigación es el porcentaje de glucosa en lactosuero desproteínizado.

3.3 Materiales

3.3.1 Materia prima

- Lactosuero desproteinizado

3.3.2 Material biológico

- La cepa de inóculo liofilizado: *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, adquiridos de la Colección Nacional de Cultivos de Levadura (NCYC).

3.3.3 Material de laboratorio

- Beaker 100 y 500 ml
- Probetas graduadas de 250-500 ml
- Matraz Erlenmeyer, Borosilicato 3.3, 100, 250, 500 y 1000 ml
- Balón, Borosilicato 3.3, 100, 250 y 500 ml
- Placas petri en vidrio cal soda, Ø 150 mm, altura 25 mm.
- Pipetas serológica 1, 2, 5 y 10 ml, (± 0.01 , ± 0.045 y ± 0.075 ml)
- Varilla de vidrio borosilicato, Ø 5 mm, peso 66 g.
- Cámara de Neubauer, 0.0025 mm².
- Tubo de ensayo (clase A), 16x160 mm.
- Frascos transparente, tapa rosca 100 ml, Ø 56 mm.
- Gotero de vidrio
- Mechero de vidrio con tapa.
- Embudo de vidrio
- Pipetas automáticas ACUMAX, 0.5 - 10 µl
- Termómetro digital (0 – 100 °C)
- Asa bacteriológica
- Espátula de acero inoxidable mango de madera, hoja 100 mm.
- Gradilla con agarradera sin alambre, 248x105x74 mm, Cap. 40 tubos.
- Pizeta de polietileno BEL-ART, boca angosta 250 ml.
- Olla a presión RECORD, aluminio importado de alta pureza 12 l.
- Papel filtro. 589/2 (Watman). Ø 125 mm.

3.3.4 Equipos

- Centrifuga modelo U8V – 2, FUNKE GERBER, 3300 $\pm 5\%$ RPM
- Espectrofotómetro UV-Visible, GENESIS 20, 325-1100 nm.

- Esterilizador eléctrico con circulación de aire ODHG – 9070B, KER LAB, 5-300 °C.
- Refrigeradora COLDEX
- Microscopio óptico trinocular PRIMO STAR de 4, 10, 40 y 100X.
- Balanza analítica KERN.ABS/ABJ, 0.1 mg – 120 g.
- Incubadora modelo 200 MEMMERT, 5-70 °C, HR 80%.
- Agitador magnético CAT, 0-400 °C, 60-1600 rpm.
- Baño maría, 20-110 °C
- Potenciómetro

3.3.5 Reactivos e insumos

- Cloruro de sodio SCHARLAU, pureza 99.5%
- Ácido acético SIGMA-ALDRICH, pureza 99.8%
- Sulfato de magnesio RYACTC, pureza 99.5%
- Agar 2 – 4.5 % SIGMA – ALDRICH
- Sabouraud Dextrose Agar HIMEDIA
- Agar extracto levadura
- Extracto de levadura
- Caldo peptona
- Agar patata glucosa
- Caldo papa glucosa
- Amoxicilina MEDROCK 500 mg
- Glicemia enzimática AA, WIENER LAB
- Etanol 96°, CENTROLAB
- Ron de quemar, PINO
- Agua destilada

3.4 Metodología para la obtención de lactosuero.

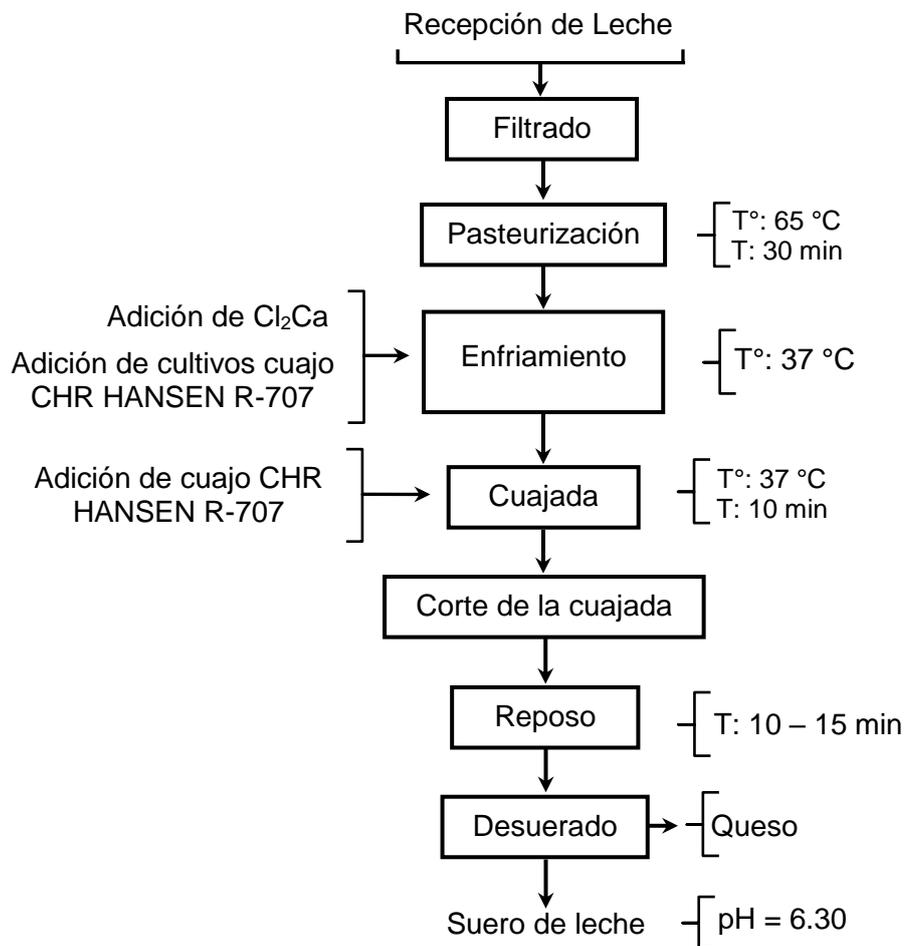


Figura 5: Diagrama de flujo para la obtención del suero de leche.

Fuente: Tinoco, (2010).

3.4.1 Recepción de leche

La leche es recepcionada en balde transparente en el laboratorio de industrias lácteas.

3.4.2 Filtrado

La leche que se ha recepcionado se ha filtrado haciendo pasar a través de una tela fina (organza) previamente lavada y desinfectada a una olla de acero inoxidable, esta operación es necesaria para eliminar las partículas de gran tamaño como paja o pelos se ha filtrado para el proceso de producción, el tipo de tela recomendada es la polipyma (Tinoco, 2010).

3.4.3 Pasteurización

Constituye un intento de estandarización de su calidad microbiológica, mediante la destrucción de microorganismos no deseados, bacterias patógenas, por lo tanto se realizó una pasteurización lenta de 65 °C por 30 minutos (Tinoco, 2010).

3.4.4 Enfriamiento

Se ha realizado el enfriado de la leche a una temperatura de 37 °C, para adicionar los insumos requeridos (Tinoco, 2010).

Adición de cloruro de calcio (Cl₂Ca): La adición de sales de calcio a la leche facilita y reduce el tiempo de coagulación, mejora el rendimiento, acelera de cierto modo la salida del suero y determina una mejor retención de la grasa y otros sólidos, por lo que se recomienda su uso luego de la pasteurización en una cantidad de hasta 15 g por 100 litros de leche (Tinoco, 2010).

Adición de cultivos lácticos: La adición de (CHR HANSEN R-707), nos permite desarrollar una acidez controlada y pH a valores de 5.0 - 5.2 y le confiere un sabor ácido (Tinoco, 2010).

3.4.5 Cuajado

La temperatura de coagulación del cuajo (enzima quimosina), tiene un rango alto de acción, ya que la temperatura de cuajada debe ser de 37 °C, que se agregó cuajo HANSEN 1.56 g para 75 litros de leche (Tinoco, 2010).

3.4.6 Corte

La buena técnica recomienda que se corte inicialmente con la lira de 1x1 cm² (Tinoco, 2010).

3.4.7 Reposo

Se dejó en reposo para la separación parcial del suero y la cuajada entre 10 - 15 minutos (Tinoco, 2010).

3.4.8 Desuerado

La máxima cantidad de suero que se retiró, es la que sale hasta alcanzar en nivel de la cuajada con un pH de 6.30 (Tinoco, 2010).

3.5 Metodología para la obtención de lactosuero desproteínizado.

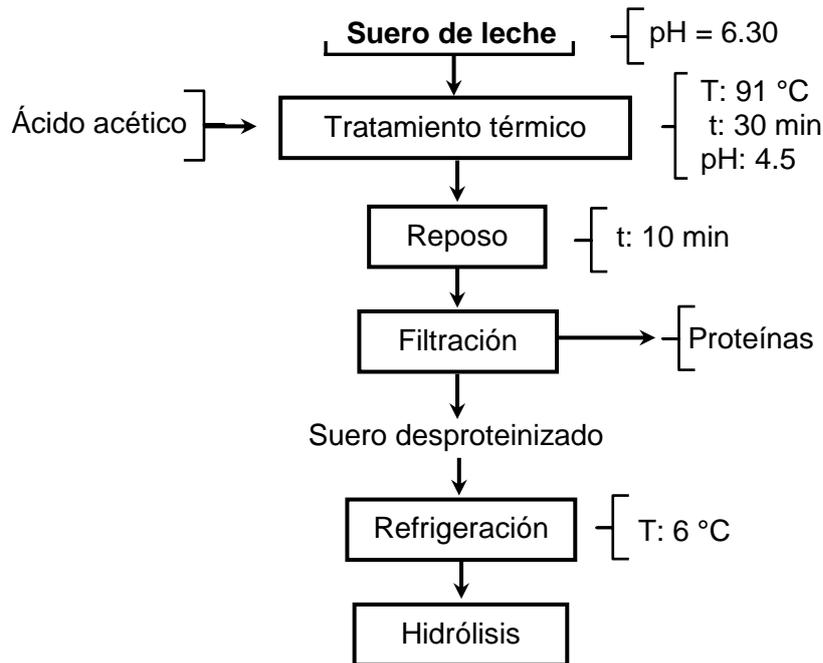


Figura 6: Diagrama de flujo para la obtención de lactosuero desproteínizado.

Fuente: Román, (2009).

3.5.1 Obtención de lactosuero desproteínizado.

Para la obtención del lactosuero desproteínizado se aplicó el método utilizado por (Román, 2009), describiendo de la siguiente forma.

- Para lograr separar las proteínas del suero lácteo obtenida, se aplicó un tratamiento termo ácido, el cual consistió en ajustar el pH a 4.5 con ácido acético glacial y posteriormente se pasteurizó a 91 °C por 30 minutos, luego se dejó en reposo para así precipitar las proteínas. Luego se realizó una filtración con papel filtro con tamaño de porosidad de 4 – 12 μm y se conservó en refrigeración (Arellano, 2010), para finalmente ser llevado al Matraz Erlenmeyer con agitador junto con las perlas de agar que contienen *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas.

3.6 Metodología para la recuperación de *Kluyveromyces fragilis* (NRRL Y-2415) liofilizado.

- La apertura del líofilo se realizó sobre una superficie de trabajo limpio en condiciones de asepsia cerca de la llama de mechero, los medios de cultivo extracto de levadura, caldo papa glucosa y caldo peptonado,

pipetas estériles, placa petri estéril, recipiente con alcohol, agua estéril, pinza metálica y gradilla.

- Para abrir el liófilo se calentó la ampolla de vidrio a la llama de mechero durante unos segundos para asegurarse de que el cono de calor solo afecte la zona entre el algodón y la parte estrecha de la ampolla e inmediatamente dejar caer unas gotas de agua sobre la zona calentada de forma que el vidrio se resquebraje, con la pinza se separan los fragmentos de vidrio y se saca el tapón de algodón hacia el extremo abierto.
- Se cargó agua destilada estéril de 0.5 ml con una pipeta para rehidratar las células liofilizadas siempre será inferior a 0.5 ml, con el fin de que no rebose la ampolla teniendo en cuenta su altura y diámetro, lo siguiente es suspender cuidadosamente el agua destilada estéril introduciendo, aspirando y expulsando varias veces la suspensión de células con la pipeta evitando la formación de burbujas.
- La suspensión conseguida se utilizó para inocular un medio de cultivo líquido, hasta agotar todo el volumen no se puede guardar parte de la suspensión, incubar los medios de cultivo a 30 °C durante las próximas 65 horas para su crecimiento.

3.6.1 Metodología para la obtención de inóculo

Para la obtención de inóculo se aplicó el método utilizado por (Román, 2009), describiendo de la siguiente forma.

- En primer lugar la levadura se sembró en placas petri por estrías, se dejó por 24 horas a 30 °C para luego observar el crecimiento celular.
- En segundo lugar se le agrega a un volumen de trabajo de 1 L (caldo de cultivo).
 - Levadura: *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415
 - MgSO₄..... 0.67 g.
 - Queso..... 100 g.
 - Amoxicilina..... 33 mg.
 - Agua destilada estéril..... 3.5 mL.
- Se inició la preparación del inóculo con un pH de 4.5 a temperatura ambiente, a 150 rpm por 24 horas, esto se hizo con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa, seguidamente se detiene la

agitación hasta terminar el proceso de fermentación por 24 horas, luego se centrifuga a 3300 rpm por 10 minutos, se eliminó el precipitado y se lava con agua destilada helada para luego hacer el conteo celular utilizando en la Cámara de Neubauer encontrando una concentración celular de 2.25×10^8 células/ml., el sedimento celular será suspendido en una solución de buffer fosfato 0.1 molar.

3.6.2 Metodología para la obtención de la concentración de agar

- Para obtener la concentración de agar, se utilizó la ecuación del porcentaje en peso/volumen (% p/v), que expresa como el peso de soluto dividido entre el volumen de la solución (Suca y Fernández, 2011).

$$(\%) \text{ Peso/Volumen} = \frac{\text{Peso de soluto, g}}{\text{Volumen de la solución, ml}} \times 100 \dots \dots \dots \text{Ec.}(02)$$

3.6.3 Metodología para la obtención de la concentración de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415.

- Para obtener la concentración de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, se utilizó la ecuación del porcentaje en volumen (% v/v), que expresa como el volumen de soluto dividido entre el volumen de la solución (Suca y Fernández, 2011).

$$(\%) \text{ en Volumen} = \frac{\text{Volumen del soluto, ml}}{\text{Volumen de la solución, ml}} \times 100 \dots \dots \dots \text{Ec.}(03)$$

3.6.4 Metodología para la determinación de la interacción de concentración de agar y concentración de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415.

- Para determinar la interacción se utilizó la tabla 8 ANOVA factorial con interacción (Gutiérrez y De la Vara, 2008) obtenida por el Software *Statística* 8.0 y Excel 2013 (aplicativo solver).

3.7 Metodología para la inmovilización de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en agar.

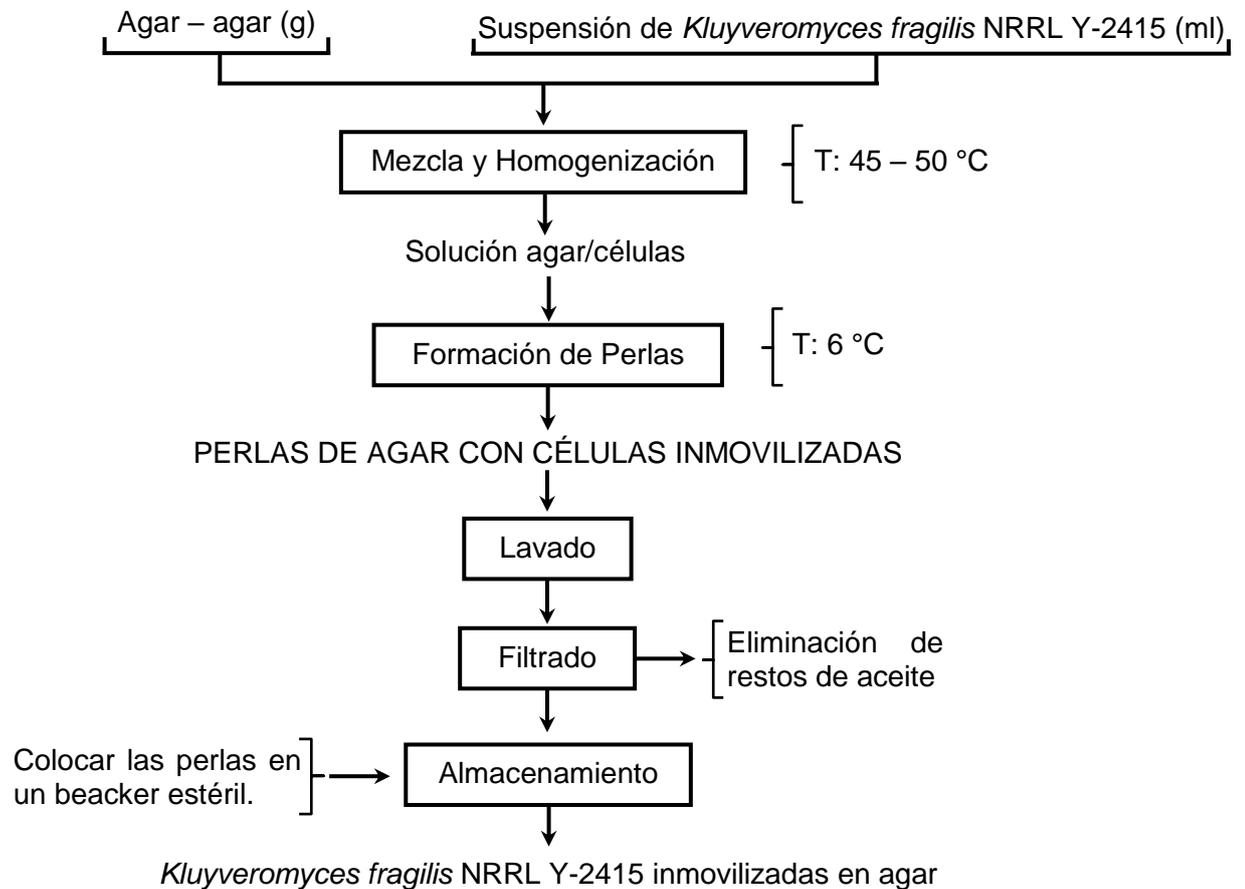


Figura 7: Diagrama de flujo para la inmovilización de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en agar.

Fuente: Román, (2009).

- El método que se utilizó para la inmovilización celular, es el de atrapamiento en gel de agar; para lo cual se tomó como referencia el procedimiento de (Chibata, 1978) citado por (Ludeña, 2000).
- Se preparó agar a diferentes concentraciones y se mantuvo entre 45 y 50 °C durante todo el tiempo que dure el proceso de inmovilización para evitar la solidificación. Posteriormente se adicionó diferentes cantidades en ml de una suspensión de cultivo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, se mezcló y se homogenizó. Esta solución se dejó caer gota a gota utilizando un gotero con el agar conteniendo las células de levaduras sobre aceite refrigerado a 6 °C contenida en un vaso precipitado, se procurara que las perlas obtenidas sean del mismo

tamaño; se colocó las perlas inmovilizadas sobre el papel filtro estéril para el lavado tres veces con agua destilada con el fin de eliminar los restos de aceite. Finalmente se trasladó a una solución de cloruro de sodio 0.025 M donde se mantendrá hasta su uso en refrigeración.

3.7.1 Metodología de monitoreo y control de operación

En el monitorio y control de operación se aplicó el método utilizado por (Román, 2009), describiendo de la siguiente forma.

- La agitación se realizó en un Matraz Erlenmeyer 250 ml en condiciones asépticas. Se acondiciono al Matraz 250 ml de suero desproteinizado y posteriormente se agregó las perlas que contienen *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415; estas perlas van a variar según la concentración de agar.
- Una vez puesto en funcionamiento el agitador, se procedió a realizar 9 ensayos, en cada ensayo se realizó 4 lecturas de 30 minutos cada uno.
- Para el control del proceso se determinó los valores más adecuados transcurridos durante las primeras 3 horas de la hidrólisis.
- Las concentraciones de agar en la presente investigación son de 3.5 %; 4 % y 4.5 %, que corresponden al inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas de 10 %; 12.5 % y 15 % v/v respectivamente.

3.7.2 Metodología para la medición de la actividad de la célula inmovilizada

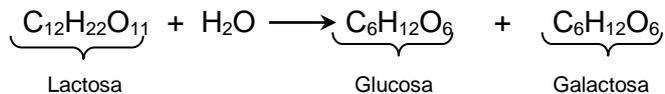
En la medición de la actividad de la célula inmovilizada se aplicó el método utilizado por (Román, 2009), describiendo de la siguiente forma.

- Se utilizó una solución de suero desproteinizado como sustrato. La hidrólisis enzimática se llevó a temperatura ambiente a 1.5 h en un Matraz Erlenmeyer 250 ml en agitador magnético con una relación de 1 a 7 *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas: el contenido de lactosa se cuantifico mediante el método de glucosa oxidasa.

3.7.3 Metodología para la determinación de la hidrólisis de la lactosa

Para la determinación de la hidrólisis de la lactosa se aplicó el método utilizado por (Arellano, 1993) citado por (Román, 2009), describiendo de la siguiente forma.

- De tal manera que una molécula de lactosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$; 342 g) produce una molécula de glucosa ($C_6H_{12}O_6$; 180 g).



- La cantidad de lactosa hidrolizada (Lh) se obtendrá realizando un análisis específico de glucosa (gramos/litro) y siguiendo la reacción estequiométrica.

$$Lh = (\text{Glucosa} \times 1.9) \dots \dots \dots \text{Ec.}(04)$$

- Donde el factor 1.9 indica que por cada gramo de glucosa obtenida se ha hidrolizado 1.9 g de lactosa según la fórmula estequiométrica (Arellano, 1993).

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\text{Lactosa Hidrolizada}}{\text{Lactosa Inicial}} \times 100 \dots \dots \dots \text{Ec.}(05)$$

- Se determinó la cantidad de glucosa en el lactosuero desproteinizado, utilizando el método de glucosa oxidasa (Anexo 04).

3.7.4 Análisis estadístico

Para el hidrólisis de lactosa, se utilizó un diseño factorial 3^2 , debido a que se manipulan dos factores, concentración de agar en tres niveles y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas en tres niveles. La interacción de las variables (tratamientos) se analizarán mediante el análisis de varianza (ANOVA), coeficiente de determinación R^2 y error medio absoluto (Gutiérrez y De la Vara, 2008), los valores óptimos de la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas se analizaron mediante la función objetiva y las restricciones del modelo matemático (Taha, 2004).

Teniendo como variables de entrada o independientes la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas, variables de salida o dependientes porcentaje de hidrólisis.

Tabla 7: Matriz de diseño experimental.

Nº Tratamiento	Concentración de agar (%)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas % (v/v)	% de hidrólisis
1	3.5	10	Y ₁₁
2	3.5	12.5	Y ₁₂
3	3.5	15	Y ₁₃
4	4	10	Y ₂₁
5	4	12.5	Y ₂₂
6	4	15	Y ₂₃
7	4.5	10	Y ₃₁
8	4.5	12.5	Y ₃₂
9	4.5	15	Y ₃₃

Para el análisis de los resultados se utilizará software *Statistica* 8.0.

a) Análisis de diseño factorial 3²

El modelo estadístico para el diseño 3² se puede escribir considerando el efecto individual de cada factor y de la interacción entre ambos (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

$$Y_{ij} = \mu + \gamma_i + \delta_j + (\gamma\delta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Con: $i = 1, 2, 3$; $j = 1, 2, 3$; $k = 1, \dots, n$.

Dónde:

μ : Es el efecto global que mide el nivel medio del resultado para la variable de salida (porcentaje de Hidrólisis).

γ_i : Es el efecto (positivo o negativo) sobre la respuesta debido al nivel de la variable concentración de agar.

δ_j : Es el efecto (positivo o negativo) sobre la respuesta debido al nivel de la variable de la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-241 inmovilizadas.

$(\gamma\delta)_{ij}$: Es el error experimental o perturbación, medidas como desviación aleatorias alrededor de las medias de la interacción de concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-241 inmovilizadas.

ε_{ijk} : Es el error experimental o perturbación, medida como desviación aleatoria alrededor de las medias.

n : Número de repeticiones en cada tratamiento.

Tabla 8: ANOVA factorial con interacción.

Suma de cuadrados totales	$SC_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c y_{ijk}^2 - \frac{Y^2}{N}$
	$SC_A = \sum_{i=1}^a \frac{Y_{i..}^2}{bn} - \frac{y_{...}^2}{N}$
Suma de cuadrados de efectos	$SC_B = \sum_{j=1}^b \frac{Y_{.j.}^2}{bn} - \frac{y_{...}^2}{N}$
	$SC_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{y_{ij.}^2}{n} - \frac{y_{...}^2}{N} - SC_A - SC_B$
Suma de cuadrados del error	$SC_E = SC_T - SC_A - SC_B - SC_{AB}$

Dónde: $N = abn$ es el total de observaciones en el experimento

Tabla 9: Cálculo de los elementos del ANOVA.

FV	SC	GL	CM	F_o	Valor-p
A	SC_A	$a-1$	CM_A	CM_A/CM_E	$P(F>F_0)$
B	SC_B	$b-1$	CM_B	CM_B/CM_E	$P(F>F_0)$
AB	SC_{AB}	$(a-1)(b-1)$	CM_{AB}	CM_{AB}/CM_E	$P(F>F_0)$
Error	SC_E	$ab(n-1)$	CM_E		
Total	SC_T	$abn-1$			

Dónde: a nivel de variable A, b nivel de variable B, n número de réplicas, F_0 valor F calculado en distribución F, P probabilidad.

Fuente: Gutiérrez y De la Vara, (2008).

b) El planteamiento de las hipótesis estadístico para ANOVA será:

Respecto a la concentración de agar

- **Hipótesis nula (H₀):** si el *valor-P* de la concentración de agar es igual a 0.05, no influye significativamente la concentración de agar sobre el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteinizado.

- **Hipótesis alterna (H_a):** si el *valor-P* de la concentración de agar es menor a 0.05, si influye significativamente la concentración de agar sobre el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.

Respecto a *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas

- **Hipótesis nula (H_0):** si el *valor-P* de la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas es igual a 0.05, no influye significativamente la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas sobre el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.
- **Hipótesis alterna (H_a):** si el *valor-P* de la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas es menor a 0.05, si influye significativamente la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas sobre el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.

Respecto a la interacción de *Kluyveromyces fragilis* inmovilizadas y la concentración de agar en la hidrólisis.

- **Hipótesis nula (H_0):** si el *valor-P* de la interacción (la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas y la concentración de agar) es igual a 0.05, no influye significativamente en el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.
- **Hipótesis alterna (H_a):** si el *valor-P* de la interacción (la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas y la concentración de agar) es menor a 0.05, si influye significativamente en el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.

Nivel de significancia (α): Para el caso de comparaciones de tratamientos habitualmente se emplea $\alpha = 0.05$ (Gutiérrez y De la Vara, 2008).

Criterio para la prueba de hipótesis

Se rechaza H_0 si *p-value* > α ; se acepta H_a si *p-value* < α

Para la evaluación ANOVA, superficie de respuesta se utilizó el Software *Statistica* 8.0 y Excel 2013 (el aplicativo solver).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recuperación de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 liofilizado

En la recuperación de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 liofilizado se evaluaron tres medios de cultivo, extracto de levadura, caldo papa glucosa y caldo peptonado; el medio idóneo se realizó, mediante el seguimiento del crecimiento macroscópico, donde el crecimiento más apropiado fue en extracto de levadura por incubación a 30 °C durante 65 horas, según (Ludeña, 2000) menciona que a los 96 horas a 30 °C por incubación observo un crecimiento macroscópico; cabe mencionar existe mucha diferencia con respecto al tiempo, debido a que se trabajó con caldos de cultivo de 15 ml en tubos de ensayo y (Ludeña, 2000) trabajo en medios de cultivo liquido de 25 ml en matraz Erlenmeyer de 250 ml. De igual modo, se evaluaron dos medios de cultivo solidos agar extracto de levadura y agar sabouraud dextrose, observándose un mejor crecimiento en el medio agar sabouraud dextrose, sobre la base de los resultados obtenidos, se determinó que el microorganismo no es tan exigente en sus condiciones de cultivo. Por tanto, se eligió como medio de propagación y conservación el cual fue sembrado por estrías en tubos con agar inclinado e incubado a 30 °C por 24 horas, al cabo del cual fue almacenado en refrigeración 4 °C.

4.2 Obtención de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en lactosuero desproteinizado.

En la obtención de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 donde se empleó como medio de cultivo lactosuero desproteinizado con un pH 4.5 a temperatura ambiente, a 150 rpm por 24 h, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa. Luego se centrifugo a 3 300 rpm por 10 minutos, obteniendo una concentracion celular de 2.25×10^8 células/ml (Román y Linares, 2011) afirma que el lactosuero desproteinizado es un medio adecuado para la obtención de biomasa encontrándose una concentración celular 1.1×10^9 células/ml de *Kluyveromyces sp.*, (Ludeña, 2000) obtuvo una concentración de 7.4×10^7 células/ml de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en un tiempo de 11 h a 30 °C, (Santiago, Marquez, Cardoso y Ribeiro, 2004) considero que la fermentacion de suero de queso a pH 5.5 en una incubadora rotatorio a 30 °C a 150 rpm por 24 h obtuvo una

concentración celular de 1×10^7 células/ml de *Kluyveromyces maxianus*, de otra parte (Arellano, Quicaña, Flores y Obeso, 2012) utilizo como medio de caldo lactosado mas fosfato de amonio en aireación por 24 h obteniendo una población 1×10^7 células/ml de *Kluyveromyces sp*, concluyo que el lactosuero desproteinizado como medio de cultivo más económico para obtener la cantidad de inóculo dio mejores resultados.

4.3 Resultados de la inmovilización de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en agar.

La temperatura más adecuada para la célula inmovilizada en la formación de perlas de agar es de 45 a 50 °C (Espinoza, 2001) e (Lizarraga, 2012) indica que al mantener la temperatura se evita la solidificación del agar, (Román, 2009) lo cual es cierto ya que se da una mejor formación de gel. La inmovilización permitió obtener esferas de agar de diámetro igual a 3.84 ± 0.12 mm la cual se muestra en la Tabla 10. Este tamaño fue menor al obtenido por (Sánchez et al., 2014) en perlas de alginato 4.596 ± 0.452 mm, según (Román y Linares, 2011) obtuvieron 2.77 mm en esferas de agar. Las celulas inmovilizadas fueron almacenadas en refrigeracion 24 y 48 horas antes de ser utilizadas. Esto contribuyo a estabilizar la formacion de gel de agar notandose una mayor dureza de las esferas de gel (Linares, 2006). El peso promedio de las esferas con célula inmovilizada obtenidas fue de 36.8 ± 1.77 mg la cual se muestra en la Tabla 10 valor mayor a lo reportado por (Linares, 2006) quien obtuvo esferas de agar 19.31 ± 0.81 mg muestran resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 10: Resultados de la inmovilización en agar.

Unidades	Inmovilización de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 en agar		
	$(\bar{x}$	\pm	S)
Peso (mg)	36.80	\pm	1.77
Diámetro (mm)	3.84	\pm	0.12

\bar{x} : Promedio de 6 repeticiones, S desviación estándar.

4.4 Resultados de la hidrólisis de la lactosa

En el tabla 11, se puede apreciar de manera general el mayor porcentaje de la lactosa hidrolizada en el tratamiento 8 con la concentración de agar al 4 % y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas de 15 % (v/v) con la hidrólisis de lactosa 98.99 % en lactosuero desproteinizado y a la vez se puede observar la muestra con menor porcentaje de la lactosa hidrolizada entre los tratamientos 01 en concentraciones de agar al 3.5 % y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas de 10 % (v/v) con el hidrólisis de lactosa 28.81 %.

- Agar al 4.5 % y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 de 10 % (v/v) con la hidrólisis de lactosa de 89.90 %.
- Agar al 4.5 % y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 de 12.5 % (v/v) con la hidrólisis de lactosa de 87.94 %.
- Agar al 4 % y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 de 15 % (v/v) con la hidrólisis de lactosa de 98.99 %.

Tabla 11: Resultados del porcentaje de la lactosa hidrolizada en lactosuero desproteinizado.

Nº	X ₁	X ₂	\bar{x}	±	S
1	3.5	10	28.81	±	1.13
2	4	10	52.14	±	1.20
3	4.5	10	89.90	±	1.08
4	3,5	12,5	68.64	±	0.81
5	4	12,5	79.72	±	1.28
6	4.5	12,5	87.94	±	0.54
7	3.5	15	83.29	±	0.87
8	4	15	98.99	±	0.15
9	4.5	15	83.74	±	1.25

Dónde: N° es número de tratamientos, X₁ es la concentración de agar %; X₂ es *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 % (v/v); \bar{x} Porcentaje de lactosa hidrolizada y S es la desviación estándar.

Los resultados de análisis estadístico mediante el análisis de varianza (ANOVA) en la que mostraron el valor-*P* es menor que 0.05, entonces la concentración de agar, cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas así como la interacción (1*2) tiene un efecto estadístico significativo con nivel de confianza del 95 % de probabilidades, cuyos efectos asociados influenciaran en la hidrólisis de lactosa. Apreciándose que según el análisis estadístico el valor de *P* para los tratamientos es menor que 0.05, es decir que los nueve tratamientos tienen efectos significativos entre ellos; este hecho puede ser apreciable también en la Figura 10 de efectos principales, que la concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas tienen efecto en el porcentajes de hidrólisis de lactosa.

Tabla 12: Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de la lactosa hidrolizada.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
(1) X ₁ L + Q	3329,41	2	1664,703	1133,725	0,000000
(2) X ₂ L + Q	4742,71	2	2371,353	1614,980	0,000000
INTERACCIONES					
1*2	3414,78	4	853,695	581,399	0,000000
RESIDUOS	26,43	18	1,468		
TOTAL (CORREGIDO)	11513,32	26			

*evaluados a $\alpha = 0.05$, X₁ concentración de agar, X₂ *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, L lineal, Q cuadrática.

En los estudios de hidrólisis enzimática de la lactosa en la leche, (Antezana, 2015) obtiene un 80 % de hidrólisis en 67 minutos con la enzima Ha – Lactose 3 000 LAU, (Antezana, 2015) indica que el reglamento técnico Colombiano para ser denominado leche deslactosada debe ser mayor a un grado de hidrólisis de 85 %, según (Linares, 2006) alcanzo un mayor porcentaje de lactosa hidrolizada, siendo el máximo valor obtenido el de 33.79 % de lactosa hidrolizada en un tiempo de retención de 8 horas con

una producción de 37.5 ml/h en continuo a 21 °C, en un bioreactor enzimático continuo de lecho fluidizado.

En la hidrólisis de lactosuero desproteínizado con un pH 4.5, en un biorreactor de lecho fluidizado con *Kluyveromyces* sp., (Román, 2009) determino que la concentración más adecuada de agar es 4 %, relación células inmovilizadas/sustrato de 12.6 % alcanzando el mayor porcentaje de lactosa hidrolizada de 98.33 %, de la misma manera (Wolf, Gasparin, y Tadeu, 2018) manifiesta que la hidrólisis de la lactosa es más eficaz inmovilizando la lactasa Beta-d-galactosidasa que la enzimas libres, (Román y Linares, 2011) afirma que a menor concentración de agar y mayor concentración de inóculo de *Kluyveromyces* sp., se obtiene un mejor porcentaje de lactosa hidrolizada.

Según Espinoza (2001), la temperatura optima de actividad enzimática de la lactasa es de 45 °C logrando una hidrólisis mayor al 80 % en 1.5 h., por lo que deberían hacerse pruebas a esta temperatura lo que debe disminuir los tiempos de retención y aumentar la capacidad productiva del reactor, tomando en cuenta que a estas temperaturas el gel de agar se vuelve más blando y puede permitir la pérdida de enzimas.

Para el porcentaje de lactosa hidrolizada se determinaron 2 modelos matemáticos mediante la regresión lineal, el porcentaje de lactosa hidrolizada en función al % de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v %, por lo cual de estos 2 modelos matemáticos se escogió el modelo más adecuado tomando en cuenta que este modelo tenga un R^2 (coeficiente de determinación) mayor cercano a 1, (Gutiérrez y De la Vara, 2008) menciona para fines de predicción se recomienda un coeficiente de determinación ajustado de al menos 0.7, por lo tanto según la tabla 13 los dos modelos matemáticos con el R^2 ambos son aceptados cercanos a 1 siendo estos valores indicativos de buen ajuste del modelo, el modelo número 2 es el que mejor describe el proceso de hidrólisis de la lactosa con una respuesta de significancia de 98.64 %.

Tabla 13: Resultado de la determinación de los modelos matemáticos para el porcentaje de lactosa hidrolizada.

Nº	MODELO MATEMÁTICO	R ²
1	$Y_1 = -1068,34 + 281,97 X_1 - 12,92 X_1^2 + 78,68 X_2 - 0,95 X_2^2 - 12,12 X_1X_2$	94.07
2	$Y_1 = -2752,64 + 848,01 X_1 - 48,79 X_1^2 + 658,75 X_2 - 35,65 X_2^2 - 258,37 X_1X_2 + 15,65 X_1X_2^2 + 25,04 X_1^2X_2 - 1,72 X_1^2X_2^2$	99.77

Dónde:

Y₁: Lactosa hidrolizada %

X₁: Concentración de agar %

X₂: cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v %

R²: Coeficiente de determinación

La gráfica de superficie de respuesta (tridimensional), se elaboró a partir de modelo lineal cuadrático (Ecuación 02) para ilustrar los efectos principales e interacciones de las variables independientes sobre la variable de respuesta (% de hidrólisis de la lactosa). El objetivo principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes de manera eficiente para maximizar la respuesta (Mendoza, 2017).

En la figura 10, el análisis de superficie de respuesta permite definir las condiciones más adecuadas que maximizan el rendimiento del porcentaje de lactosa hidrolizada, en ella se aprecia claramente que a medida que aumenta el % de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v % se incrementa mayor porcentaje de hidrólisis, donde la región de color rojo representa la combinación de concentración de agar % y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v % óptimas para la hidrólisis de la lactosa en lactosuero desproteinizado, presentando una correlación R² del 99.77 %.

Los coeficientes de regresión para el rendimiento Y, en la Tabla 11 permitieron un modelo matemático se segundo orden, donde fueron considerados todos los factores.

$$Y_1 = -2752,64 + 848,01 X_1 - 48,79 X_1^2 + 658,75 X_2 - 35,65 X_2^2 - 258,37 X_1X_2 + 15,65 X_1X_2^2 + 25,04 X_1^2X_2 - 1,72 X_1^2X_2^2$$

Dónde:

Y_1 = Lactosa hidrolizada %

X_1 = Concentración de agar %

X_2 = cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v %

Donde se obtuvo que el mejor modelo que soluciona los datos experimentales de hidrólisis de lactosa %, fue el modelo de segundo orden, modelo de términos lineales y cuadráticos de los efectos principales y las interacciones del segundo orden.

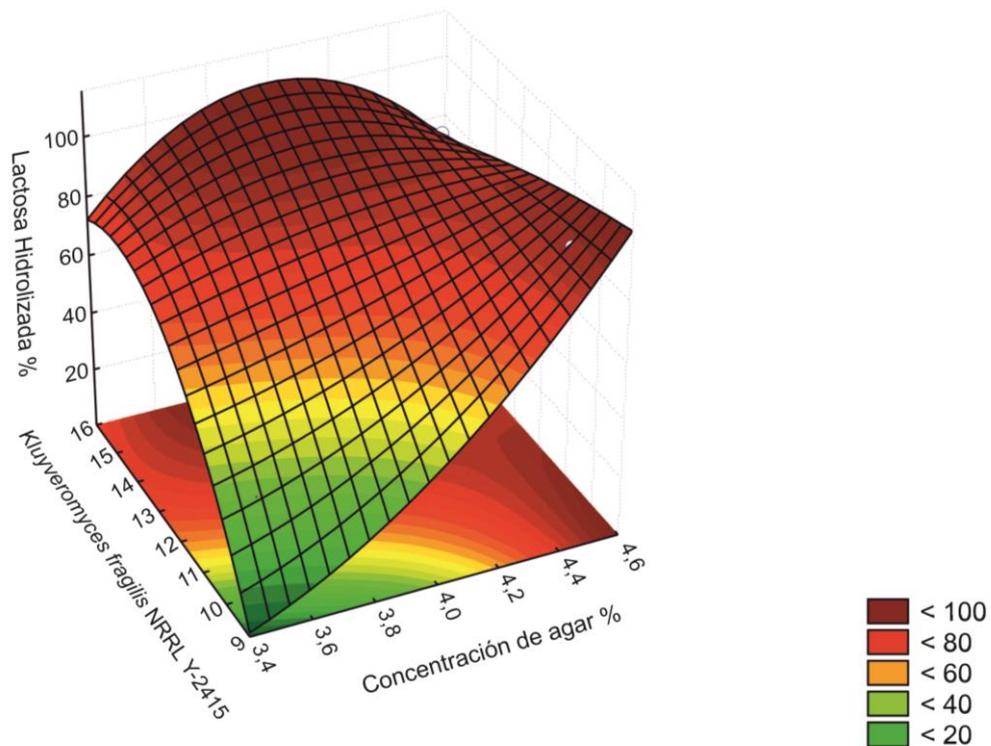


Figura 8: Superficie de respuesta para el porcentaje de lactosa hidrolizada.

Haciendo uso del software *statistica* 8.0 se determinó la gráfica de contorno para cada tratamiento que permite seleccionar la región óptima de la interacción de concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v %, en función al porcentaje de hidrólisis de la lactosa; de acuerdo al modelo matemático de regresión lineal

múltiple se optimizo el porcentaje de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v %, en la gráfica muestra los puntos experimentales obtenidos con la concentración de agar 4 % y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v de 15 % se obtiene una región óptima corroborando con la (Ecuación 02) hasta 98.99 % de hidrólisis de la lactosa.

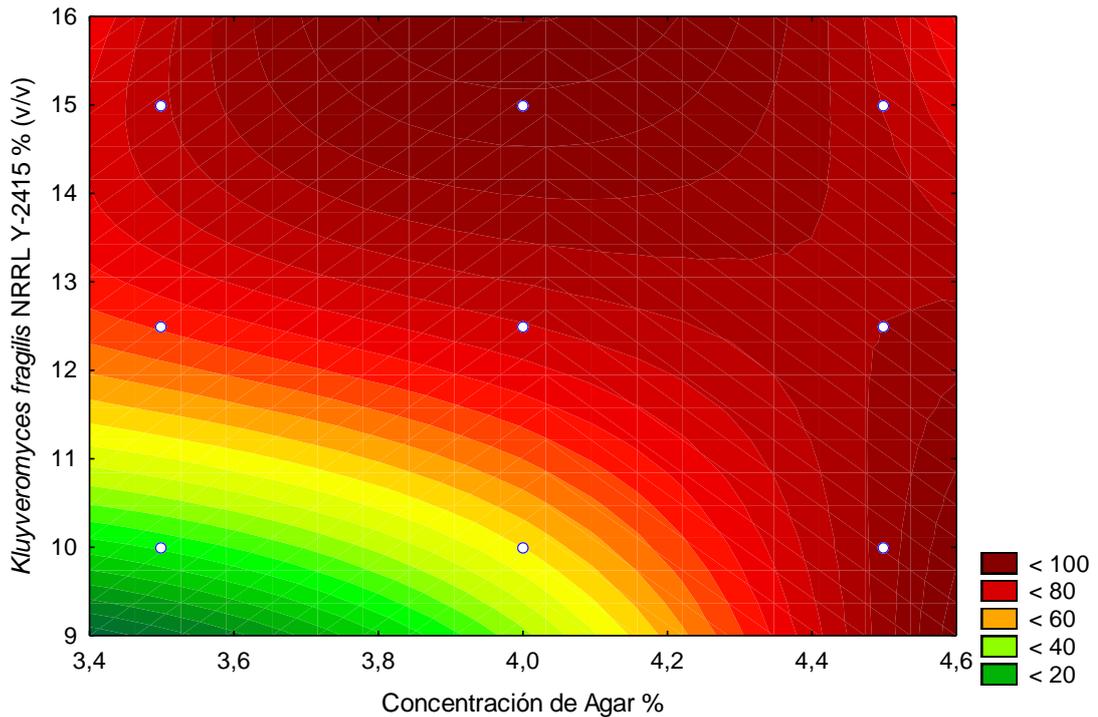


Figura 9: Grafica de contornos para el porcentaje de lactosa hidrolizada.

4.5 Resultados de la concentración adecuada de agar y la cantidad optima del inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas.

Aplicando las restricciones al modelo matemático N° 2, según el modelo estadístico se buscó maximizar el rendimiento encontrándose la concentración de agar 4 %, cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v de 15 % y con un rendimiento óptimo de 98.99 % de lactosa hidrolizada, estudios como el de (Román y Linares, 2011) afirman que la concentración optima de agar es de 4 %, concentración optima de células inmovilizadas/sustrato de 12.6 %, con un rendimiento óptimo de 98.33 % de lactosa hidrolizada, la variación de la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v % fue obtenida de la colección

National Collection of Yeast Cultures (NCYC), (Román, 2009) indica que se ha trabajado con *Kluyveromyces sp.*, y no existe mucha diferencia en lo obtenido, en el rendimiento se obtuvo un mejor porcentaje de 98.99 % de la lactosa hidrolizada.

Tabla 14: Nivel óptimo de las variables de proceso y del rendimiento óptimo.

X_1	X_2	\bar{x}
4.0	15.0	98.99

Dónde: X_1 es la concentración de agar %; X_2 es *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 % (v/v) y \bar{x} Porcentaje de lactosa hidrolizada.

4.6 Resultados de la interacción de concentración de agar y la cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas.

Según la tabla 12 el análisis de varianza podemos observar el valor- P prueba la significancia estadística de cada uno de los valores y la interacción, puesto que los tres valores- P son menores a 0.05, así como la interacción (1x2) resultaron significativos sobre el porcentaje de la hidrólisis de la lactosa que fue corroborado por el análisis del coeficiente de determinación R^2 de 99.77 %, con el nivel del 95 % de confiabilidad, por lo tanto la interacción de concentración de agar % y cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 v/v % inmovilizadas influyen en el porcentaje de hidrólisis de la lactosa, de manera que fue reportado por (Román, 2009) en lo cual manifiesta que la interacción de concentración de agar y la relación de células inmovilizadas/sustrato con *Kluyveromyces sp.*, resultan significativos en la hidrólisis del lactosuero desproteinizado alcanzando un rendimiento óptimo de 98.33 % de lactosa hidrolizada, de la misma manera (Mogrovejo y Urgiles, 2009) afirma que la interacción de alginato de sodio y β -galactosidasa inmovilizada tienen una influencia significativa sobre el resultado de hidrólisis residual en la leche, (Linares, 2006) menciona también que la interacción de concentración de agar y la enzima β -galactosidasa inmovilizada resultó significativo en la hidrólisis de la leche de vaca en un biorreactor enzimático continuo de lecho fluidizado, (Olano, 2004) manifiesta que la interacción de tiempo y concentración resultó significativo en la capacidad fermentativa para la producción de

etanol con *Sacharomyces serevisiae* var *ellipsoideus* MIT-L51 inmovilizada en agar.

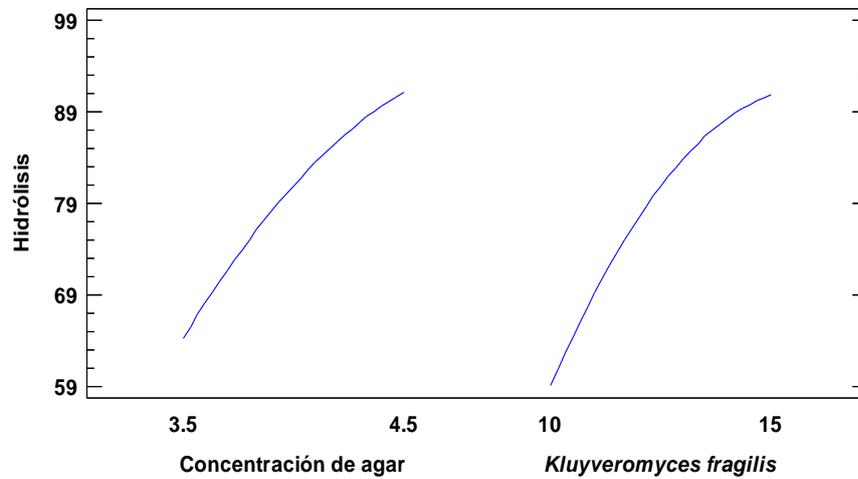


Figura 10: Efectos principales de la concentración de agar y cantidad de inóculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas sobre la hidrólisis.

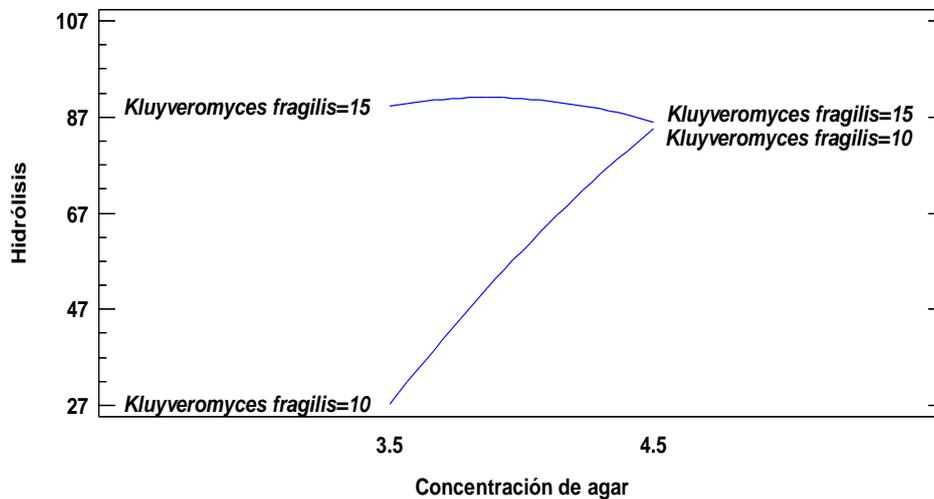


Figura 11: Efecto de interacción de concentración de agar y *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas sobre la hidrólisis.

CONCLUSIONES

- La concentración de agar adecuada es de 4 % presentando efecto significativo ($p\text{-value} < 0.05$) en la hidrólisis de la lactosa obteniendo un mayor porcentaje de la lactosa hidrolizada de 98.99 % en lactosuero desproteinizado.
- la cantidad óptima de inculo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 es de 15 % presentando efecto significativo ($p\text{-value} < 0.05$) en la hidrólisis de la lactosa obteniendo un mayor porcentaje de la lactosa hidrolizada de 98.99 % en lactosuero desproteinizado.
- los efectos de interacción de la concentración de agar y la cantidad optima de inculo *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas, influyen significativamente ($p\text{-value} < 0.05$) en el porcentaje de hidrólisis de la lactosa en lactosuero desproteinizado.

RECOMENDACIONES

- En cuanto al lactosuero, se debe preparar de acuerdo a la cantidad que se va a trabajar durante el día, es decir fresco, para que así se den mejores resultados de glucosa que es lo que se quiere obtener, ya que al hacer en cantidad y tenerlo en refrigeración por varios días se puede alterar el contenido de glucosa.
- Realizar investigaciones sobre la optimización de inmovilización de células con otras cepas (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares DSMZ, Colección Española de Cultivos Tipo CECT y Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC), empleando otros soportes para la inmovilización como alginato de sodio, evaluando otras variables de estudio; determinación de la actividad enzimática, determinación de temperatura óptima para el hidrólisis, rendimiento y eficiencia.
- Después del estudio realizado con lactosuero que en la actualidad está muy difundida por su valor nutritivo, menor costo y medio de cultivo adecuado para *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 se ha logrado hidrolizar la lactosa como alternativa de solución para aquellos productos sin lactosa, un porcentaje significativo de la población es intolerante a la lactosa.

SUGERENCIAS

- Al momento de hacer la inmovilización de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415, se debe mantener el agar a temperatura entre los 45 °C y 50 °C con la finalidad de poder inmovilizar con mucha facilidad y obtener perlas del mismo diámetro, debido a que el agar tiende a gelificarse por debajo de los 40 °C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almécija, M. C. (2007). *Obtención de Lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Antezana, C. I. (2015). *Efecto de la hidrólisis enzimática de la lactosa en el perfil de textura de queso fresco normal y bajo en grasa*. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima.
- Arellano, J. (1993). Inmovilización de β -galactosidasa (3.2.1.23) de *Kluyveromyces* sp. en cascara de arroz. *Tesis Bachiller Universidad Nacional de Trujillo*. Trujillo, Perú.
- Arellano, J. C. (2010). Inmovilización de β -galactosidasa (3.2.1.23) de *Kluyveromyces* sp. en cascara de arroz. *Tesis Maestro en Microbiología Universidad Nacional de Trujillo*. Trujillo, Perú.
- Arellano, J., Quicaña, M., Flores, M., & Obeso, C. (2012). Actividad de la β -galactosidasa en células de *kluyveromyces* sp. Permeabilizadas con etanol a diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos. *SCIENDO*, 15(1), 43 - 51.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de Enzimas, Fundamento, Métodos y Aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (4ta ed.). México: PEARSON Educación.
- Barham, D., & Trinder, P. (1997). *Determinación enzimática de glucosa y sacarosa en alimentos*. España: Acribia S.A.
- Barrios, A. D., & Quispe, K. (2014). *Evaluación del uso de un soporte de inmovilización para la producción de bioetanol 1.5g a partir de lactosuero por un consorcio de Kluyveromyces spp. Aislados de kéfir empleando un solvente extractivo en un reactor batch*. Tesis Biotecnología, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Arequipa.
- Boyer, R. (2000). *Conceptos en bioquímica*. Mexico: Internacional Thomson Editores.

- Chibata, I. (1978). Immobilized Enzymes – Research and Development. *Biochemical Education*, 7(3), 133-138.
- Chinappi, I., & Sánchez, J. (2000). Producción de biomasa de *Kluyveromyces fragilis* en suero de leche desproteinizado. *Acta Cientif. Venezol.*, 51(1), 223-230.
- Coultate, T. P. (2002). *Manual de química y bioquímica de los alimentos* (Vol. 4ta Ed.). España: Acribia , S.A.
- Espinoza, L. (2001). *Hidrólisis enzimática de la lactosa en la leche de vaca*. Tesis Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res.*, 1-19.
- Ferreira, R. (2006). *Producción de etanol por levaduras en biorreactores con células libres e inmovilizadas utilizando suero de queso*. Tesis Grado de Maestro en Microbiología Agrícola y Medio Ambiente, Universidad Federal del Río Grande del Sur, Brasil.
- Firebaugh, J. D., & Daubert, C. R. (2005). Emulsifying and foaming properties of a derivatized whey protein ingredient. *Int. J. Food Prop.*, 8(2), 243.
- García, M., Quintero, R., & López-Munguía, A. (1999). *Biotechnología Alimentaria* (2da ed.). México: LIMUSA.
- Garibay, M., & Quintero, R. (1993). *Biotechnología Alimentaria*. Mexico: Limusa Noriega.
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (2da ed.). Mexico: McGraw-Hill.
- Inda, C. (2000). *Optimización de rendimiento y aseguramiento de inocuidad de la industria de quesería*. Organización de Estados Americanos, Mexico.
- Julca, G. E. (2013). *Efecto de dos soportes de inmovilización de microorganismos eficaces en la degradación de materia orgánica de aguas residuales domésticas*. Tesis de Biólogo - Microbiólogo, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.

- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study* (5ta ed., Vol. 2). New York USA: ELSEVIER B.V.
- Linares, G. A. (2006). Efecto de la variación del caudal de entrada de leche en un bioreactor enzimático continuo de lecho fluidizado con β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) inmovilizada en el rendimiento productivo de lactosa hidrolizada y caracterización. *Tesis Maestro en Ciencias Escuela de Post Grado Universidad Nacional de Trujillo*. Trujillo, Perú.
- Lipa, Y., & Maquera, M. N. (2013). *Hidrólisis enzimática del almidón de chuño y tunta para la obtención de jarabe de glucosa*. Tesis Pre-grado, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Peru.
- Lizarraga, E. A. (2012). *Evaluación de la inmovilización de Zymomonas mobilis CECTB-4286 en dos tipos de soporte para la producción de etanol, utilizando como sustrato jugo de Saccharum officinarum "caña de azúcar"*. Tesis de Biólogo - Microbiólogo, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Londoño, M., Sepúlveda, J., Hernández, A., & Parra, J. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculado con lactobacillus casei. *Revista de la Facultad de Agraria de Medellín*, 61(1), 13.
- Ludeña, F. (2000). Recuperación de suero de quesería para la producción de una bebida alcohólica en un sistema en lote. *Anales Científicos*, 7(2), 124-133.
- Madrid, A. (1999). *Tecnología Quesera* (2da ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Mammarella, E. J. (2005). *Estudio del sistema de Inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa*. Universidad Nacional de Litoral.
- Masschelein, C. (1994). Immobilized Cell Technology in beer Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 155-177.
- Mendoza, R. M. (2017). *Hidrólisis química y enzimática de un extracto de yacón (Smallanthus sonchifolius) para la obtención de fructosa*. Tesis de Ingeniero en Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.

- Mogrovejo, P. K., & Urgiles, G. C. (2009). *Optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando β -galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual*. Universidad de Azuay, Cuenca, Ecuador.
- Montiel, X., Carruyo, I., Marcano, L., & Mavárez, M. (2005). Optimización del proceso de extracción de la lactasa de *Kluyveromyces Marxianus* ATTC 8554, para su aplicabilidad en la industria láctea. *REDALYC*, XV(5), 476 - 482.
- Multon, J. L. (2000). *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias* (2da ed.). España: ACRIBIA S.A.
- Murray, K. (1999). Bioethics in the Laboratory Synthesis and Interactivity. *The American Biology Teacher*, 61(9), 662-667.
- Nieto, I., Santacruz, I., & Moreno, R. (2013). Consolidación de materiales cerámicos por gelificación de polisacáridos. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.*, 34(1), 2-27.
- Olano, C. M. (2004). *Efecto de la concentración de agar en la inmovilización de *Sacharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* MIT-L51 y su capacidad fermentativa*. Tesis de Biólogo - Microbiólogo, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Piñeros, Y., Carrión, S. M., & Molina, D. E. (2002). Producción de etanol a partir de suero de leche. Bogotá, Colombia.
- Revillion, J. P., Brandelli, A., & Záchia, M. A. (2003). Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(1), 121-127.
- Román, J. C. (2009). Efecto de la concentración de agar y relación células inmovilizadas/sustrato en la hidrólisis de lactosuero desproteínizado en un biorreactor de lecho fluidizado con *Kluyveromyces* sp. *Tesis Universidad Nacional de Trujillo*. Trujillo, Perú.
- Román, J., & Linares, G. (2011). Efecto de la concentración de agar y relación células inmovilizadas/sustrato en la hidrólisis de lactosuero

desproteínizado en un biorreactor de lecho fluidizado con *Kluyveromyces* sp. *Agroindustrial Science*, 2(2011), 56-63.

Rubiolo, A. C. (2010). Estudio de la inmovilización de la β -galactosidasa para la reutilización de la lactosa del suero de quesería. *Tesis Doctor en Tecnología Química Universidad Nacional del Litoral*.

Sánchez, J. A., Echeverría, C., Bazan, G., Gabrielli, R., Gonzalez, K., Acosta, D., & Velasquez, B. (2014). Efecto del tamaño de perla y concentración de alginato de sodio en la difusividad efectiva de los azúcares solubles y en la producción alcohólico a partir de mosto de uva (*Vitisvinífera*) variedad cardinal con biorreactor estático utilizando células inmov. *Agroindustrial Science*, 53 - 64.

Santiago, P. A., Marquez, L. D., Cardoso, V. L., & Ribeiro, E. J. (2004). Estudio da produção de β -galactosidasa por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Cienc. Technol. Aliment.*, 24(4), 567-572.

Solís, L. (1990). Hidrólisis de lactosa mediante *Kluyveromyces* sp. permeabilizada e inmovilizada. *Colección general. Fac. Cs. Química y Farmacéutica Universidad de Chile*. Chile.

Suca, C. A., & Fernández, B. (2011). *Guía de Laboratorio Química General* (1 Edición ed.). Lima, Perú: Corporación MERÚ E.I.R.L.

Taha, H. A. (2004). *Investigación de operaciones* (7a Edición ed.). (G. Truja Mendoza, Trad.) Mexico: Pearson Educación.

TETRA PACK, P. S. (2003). *Manual de industrias lácteas para su mejoramiento de cadena productiva de ganado en la ciudad Lima, Cusco y Arequipa*. Madrid: Mundi-Prensa.

Tinoco, D. J. (2010). *Tecnología de los Quesos Artesanales*. Cusco, Perú: Caritas Arquidiocesana Cusco.

Torres, P. (2012). Desarrollo de sistemas enzimáticos en fase sólida para la biotransformación de lactosa de sueros de quesería. *Tesis de Doctorado en Química Universidad de la República*. Montevideo, Uruguay.

- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología* (9na ed.). España: Médica Panamericana S.A.
- Urribarrí, L., Vielma, A., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, M., & Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *REDALYC*, XIV(4), 297 - 302.
- Valtek. (2014). *GLUCOSA - LS Reactivo líquido para la determinación enzimática de Glucosa en suero plasma y otros fluidos biológicos*. Recuperado el 16 de Junio de 2015, de www.valtekdiagnostics.com
- Villarreal, D. F. (2010). Efecto de la concentración de almidón de Moyno (*Anthurium macrorrhiza*), concentración y tiempo de hidrólisis de la Glucoamilasa sobre el rendimiento de etanol fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1319. *Tesis Universidad Nacional de Trujillo*. Trujillo, Perú.
- Wiseman, A. (1991). *Manual de biotecnología de las enzimas*. España: Acribia S.A.
- Wolf, M., Gasparin, B. C., & Tadeu, A. (2018). Hydrolysis of lactose using β -d-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. *International Journal of Biological Macromolecules*(115), 157-164.
- Zalashko, M., & Grushenko, M. (2001). Utilización del suero de leche en la industria. 3(25 - 28).

ANEXOS

Anexo 1: Composición del suero de leche.

Parámetros	Suero de leche fresco	
	X ± S	
Lactosa (kg/m ³)	44.20	0.1290
Nitrógeno (%)	0.21	0.0050
Proteínas (%)	1.34	0.0032
Fosforo (%)	0.34	0.0221
pH	5.45	0.0023

X: valor promedio *suplementado y ajustado su pH a 5.9

Fuente: A.O.A.C. "Officials Methods of analysis". 1990
citado por Román, (2009).

Anexo 2: Ficha técnica de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415.

National Collection of Yeast Cultures Certificate of analysis

Name *Kluyveromyces marxianus*

Depositor NRRL

deposit_name *Kluyveromyces fragilis*

Month of Deposit August

Year of Deposit 1982

Equivalent Strain Designations ATCC 46537, CBS 397, CCRC 21477,
DBVPG 6164, IFO
1735, NCYC 85, NRRL Y-2415, UCD 71-58.

References Tijssen JP, et al. Isolation and characterization of polyphosphates from the yeast cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* 760: 143-148, 1983.
Lodder J, ed. *The yeasts: a taxonomic study*. 2nd ed. Amsterdam: North-Holland; 1970, p. 345.
Moulin G, Galzy P. Alcohol production from whey. *Adv. Biotechnol.* 2: 181-187, 1981.
Rapin JD, et al. Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 143-150, 1994.
Freer SN, Detroy RW. Characterization of cellobiose fermentations to ethanol by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 541-557, 1983.
Vaughan Martini et al., *Biotechnol. Tech.* 2: 293-296, 1988 (killer).

Habitat Yoghurt.

PHYSICAL CHARACTERISTICS:

Optimum_Temp 39
Min_Temp 14
Max_Temp 52

Cells:

Min_Broth_Breadth		Min_Agar_Breadth	1
Max_Broth_Breadth	5	Max_Agar_Breadth	5
Min_Broth_Length	4	Min_Agar_Length	4
Max_Broth_Length	20	Max_Agar_Length	20

Anexo 3: Ficha técnica de glicemia enzimática.



LINEA LIQUIDA

Glicemia

enzimática AA

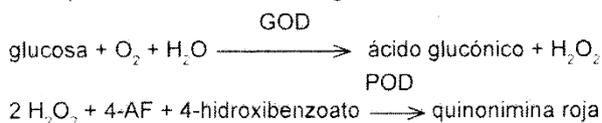
Para la determinación de glucosa en suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo

SIGNIFICACION CLINICA

La patología más común relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono es la diabetes mellitus. El diagnóstico precoz y el control de los pacientes diabéticos, tienen por objeto evitar la cetoacidosis y las complicaciones resultantes de la hiperglicemia, mediante el tratamiento adecuado. Dado que existen múltiples factores causales de hiper o hipoglicemia, debe considerarse en cada caso la condición fisiológica y/o la patología presente en el paciente.

FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

El esquema de reacción es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

S. Standard*: solución de glucosa 100 mg/dl (1 g/l).

A. Reactivo A: solución conteniendo glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF), buffer fosfatos pH 7,0 y 4-hidroxibenzoato en las siguientes concentraciones:

GOD (microbiana)	≥ 10 kU/l
POD (rábano)	≥ 1 kU/l
4-AF	0,5 mmol/l
Fosfatos	100 mmol/l, pH 7,0
Hidroxibenzoato	12 mmol/l

REACTIVOS NO PROVISTOS

Calibrador A plus de Wiener lab.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos Provistos: listos para usar.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Durante el uso, el Reactivo A puede colorearse ligeramente no afectando su funcionamiento siempre que se procese un Blanco con cada lote de determinaciones y un Standard periódicamente. Desechar cuando las lecturas del Blanco sean superiores a 0,160 D.O.

MUESTRA

Suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR)

a) Recolección:

- Suero o plasma: se debe obtener suero de la manera usual o plasma recolectado con anticoagulantes comunes.
- Orina: si se trata de una muestra aislada, utilizar preferentemente orina fresca. En caso de no poder realizar el ensayo de forma inmediata, conservar la muestra en refrigerador (2-10°C). Puede realizarse el ensayo en orina de 24 horas. En este caso, recolectar la muestra en un recipiente oscuro conteniendo 5 ml de ácido acético glacial y conservarlo en hielo.

- LCR: en caso de utilizar LCR, el ensayo debe realizarse en forma inmediata a la obtención de la muestra.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda el uso de **Anticoagulante G** (EDTA/ fluoruro) para su obtención.

c) Sustancias interferentes conocidas: no se observan interferencias por: bilirrubina hasta 10 mg/dl, triglicéridos hasta 500 mg/dl y hemoglobina hasta 350 mg/dl. El ácido ascórbico interfiere en la determinación en orina en cualquier concentración.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la destrucción enzimática de la glucosa sanguínea (glucólisis) por hemáties y leucocitos es proporcional a la temperatura a la que se conserva la sangre, siendo máxima a 37°C. Este proceso no se inhibe aún en estado de congelación, por lo que la sangre debe centrifugarse dentro de las 2 horas de la extracción. El sobrenadante límpido se transfiere a otro tubo para su conservación. De esta forma la glucosa es estable 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas refrigerada. En caso de no poder procesarse la muestra de la forma indicada, deberá adicionarse un conservador en el momento de la extracción.

El LCR puede contaminarse con bacterias y otras células por lo que la determinación debe realizarse de inmediato. En caso de no poder procesarse de esta manera, centrifugar el LCR y conservarlo 3 días a 2-10°C o 5 horas a 20-25°C.

* No provisto en todas las presentaciones

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de Reactivo A: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

Los volúmenes de Muestra y de Reactivo A pueden variarse proporcionalmente (Ej.: 20 ul Muestra + 2 ml Reactivo A).

PROCEDIMIENTO

En tres tubos marcados B (Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Incubar 5 minutos en baño de agua a 37°C o 25 minutos a 15-25°C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con el blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 30 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{glucosa (mg/dl)} = D \times f \quad f = \frac{100 \text{ mg/dl}}{S}$$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de glucosa, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

Se analizaron con **Glicemia enzimática AA líquida**, 120 muestras de individuos en ayunas, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 20 y 45 años, provenientes de la ciudad de Rosario (Argentina), sin síntomas de diabetes o cualquier otra enfermedad aparente. Se encontró que el 95% de los resultados cubrieron el siguiente rango:

Suero o plasma: 70 a 110 mg/dl

En la literatura (Tietz, N.W.) se menciona el siguiente rango de referencia:

Suero o plasma

Adultos: 74 - 106 mg/dl (4,11 - 5,89 mmol/l)
 Niños: 60 - 100 mg/dl (3,33 - 5,55 mmol/l)
 Neonatos: 1 día: 40 - 60 mg/dl (2,22 - 3,33 mmol/l)
 mayor a 1 día: 50 - 80 mg/dl (2,78 - 4,44 mmol/l)

Orina aislada fresca

1 - 15 mg/dl (0,06 - 0,83 mmol/l)

Orina de 24 horas

< 0,5 g/24 hs (< 2,78 mmol/24 hs)

LCR

Niños: 60 - 80 mg/dl (3,33 - 4,44 mmol/l)
 Adultos: 40 - 70 mg/dl (2,22 - 3,89 mmol/l)

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia, teniendo en cuenta sexo, edad hábitos alimenticios y otros factores.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

Glucosa (mg/dl) x 0,0555 = Glucosa (mmol/l)
 Glucosa (g/24 horas) x 55,5 = Glucosa (mmol/24 hs)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

PERFORMANCE

Los ensayos fueron realizados en analizador automático Express Plus[®].

a) **Reproducibilidad:** procesando 20 replicados de una misma muestra en 5 días diferentes, se obtuvo:

Precisión intraensayo

Nivel	D.S.	C.V.
90,7 mg/dl	± 1,26 mg/dl	1,39 %
278 mg/dl	± 3,08 mg/dl	1,11 %

Precisión interensayo

Nivel	D.S.	C.V.
90,1 mg/dl	± 1,73 mg/dl	1,92 %
299 mg/dl	± 4,86 mg/dl	1,62 %

b) **Recuperación:** agregando cantidades conocidas de glucosa a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 99 y 101%.

c) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 500 mg/dl. Para valores superiores, diluir la muestra con solución salina y repetir el ensayo, multiplicando el resultado final por el factor de dilución.

d) **Correlación:** se determinó el valor de glucosa en 154 muestras de suero en un rango comprendido entre 23 y 503 mg/dl, con **Glicemia enzimática AA líquida** de Wiener lab. y un kit comercial basado en el mismo principio, obteniéndose el siguiente coeficiente de correlación:

r = 0,9997; pendiente b = 1,0257; intersección a = 1,9485

e) **Sensibilidad:** el mínimo límite de detección es 0,54 mg/dl y la sensibilidad analítica es de 4,2 mg/dl.

[®] Marca registrada de Ciba Corning Diagnostics

Anexo 4: Valores de glucosa, lactosa hidrolizada y % de lactosa hidrolizada (repetición numero 1).

Tratamientos	Tiempo (h)	Glucosa (g/l)	Lactosa Hidrolizada (g/l)	% L.H.
1	0	3.18	6.03	13.65
	0.5	6.65	12.63	28.57
	1	8.05	15.30	34.62
	1.5	10.18	19.34	43.76
2	0	3.18	6.03	13.65
	0.5	15.91	30.22	68.37
	1	21.93	41.66	94.25
	1.5	--	--	--
3	0	3.18	6.03	13.65
	0.5	19.09	36.28	82.08
	1	22.65	43.04	97.37
	1.5	--	--	--
4	0	2.82	5.37	12.14
	0.5	12.22	23.23	52.55
	1	14.29	27.15	61.43
	1.5	16.56	31.46	71.19
5	0	2.82	5.37	12.14
	0.5	18.57	35.29	79.84
	1	17.14	32.56	73.66
	1.5	14.77	28.06	63.48
6	0	2.82	5.37	12.14
	0.5	22.99	43.68	98.82
	1	20.49	38.92	88.06
	1.5	18.36	34.88	78.92

7	0	2.34	4.45	10.06
	0.5	21.24	40.35	91.29
	1	22.98	43.66	98.78
	1.5	--	--	--
8	0	2.34	4.45	10.06
	0.5	20.56	39.06	88.36
	1	22.42	42.60	96.38
	1.5	--	--	--
9	0	2.34	4.45	10.06
	0.5	19.09	36.27	82.06
	1	22.01	41.82	94.62
	1.5	--	--	--

Anexo 5: Valores de glucosa, lactosa hidrolizada y % de lactosa hidrolizada (repetición numero 2).

Tratamientos	Tiempo (h)	Glucosa (g/l)	Lactosa Hidrolizada (g/l)	% L.H.
1	0	2.85	5.41	12.23
	0.5	7.05	13.39	30.29
	1	8.80	16.72	37.82
	1.5	9.73	18.48	41.82
2	0	2.85	5.41	12.23
	0.5	16.22	30.83	69.74
	1	21.01	39.92	90.32
	1.5	--	--	--
3	0	2.85	5.41	12.23
	0.5	19.47	36.99	83.69
	1	22.69	43.12	97.55
	1.5	--	--	--
4	0	2.74	5.21	11.78
	0.5	11.75	22.33	50.51
	1	13.90	26.41	59.76
	1.5	17.00	32.31	73.09
5	0	2.74	5.21	11.78
	0.5	18.90	35.90	81.23
	1	17.66	33.55	75.91
	1.5	13.90	26.41	59.74
6	0	2.74	5.21	11.78
	0.5	23.07	43.84	99.18
	1	19.00	36.10	81.67
	1.5	18.76	35.64	80.63

7	0	2.29	4.34	9.83
	0.5	20.87	39.66	89.73
	1	23.23	44.14	99.87
	1.5	--	--	--
8	0	2.29	4.34	9.83
	0.5	20.28	38.53	87.17
	1	22.25	42.27	95.63
	1.5	--	--	--
9	0	2.29	4.34	9.83
	0.5	19.56	37.17	84.09
	1	22.18	42.14	95.34
	1.5	--	--	--

Anexo 6: Valores de glucosa, lactosa hidrolizada y % de lactosa hidrolizada (repetición numero 3).

Tratamientos	Tiempo (h)	Glucosa (g/l)	Lactosa Hidrolizada (g/l)	% L.H.
1	0	2.97	5.65	12.78
	0.5	6.41	12.18	27.56
	1	8.18	15.54	35.16
	1.5	9.28	17.63	39.88
2	0	2.97	5.65	12.78
	0.5	15.77	29.97	67.81
	1	20.88	39.67	89.75
	1.5	--	--	--
3	0	2.97	5.65	12.78
	0.5	19.57	37.18	84.11
	1	21.89	41.59	94.09
	1.5	--	--	--
4	0	2.55	4.85	10.97
	0.5	12.41	23.58	53.35
	1	14.47	27.49	62.19
	1.5	17.87	33.95	76.80
5	0	2.55	4.85	10.97
	0.5	18.17	34.52	78.09
	1	16.72	31.78	71.89
	1.5	14.97	28.43	64.33
6	0	2.55	4.85	10.97
	0.5	23.03	43.75	98.98
	1	18.27	34.71	78.52
	1.5	17.41	33.09	74.86

7	0	2.36	4.49	10.15
	0.5	20.63	39.19	88.67
	1	22.52	42.79	96.82
	1.5			
8	0	2.36	4.49	10.15
	0.5	20.54	39.02	88.28
	1	21.66	41.15	93.09
	1.5	--	--	--
9	0	2.36	4.49	10.15
	0.5	19.79	37.60	85.06
	1	22.40	42.56	96.28
	1.5	--	--	--

Anexo 7: Imágenes de la investigación realizada.



Imagen 01: Agar extracto levadura, Extracto de levadura, agar Sabouraud Dextrose, caldo Papa Glucosa y caldo Peptonado.



Imagen 02: Cepa *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 liofilizado de la colección NCCY.



Imagen 03: Recuperación de líofilo de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en tres medios de cultivo, extracto de levadura, caldo papa glucosa y caldo peptonado.

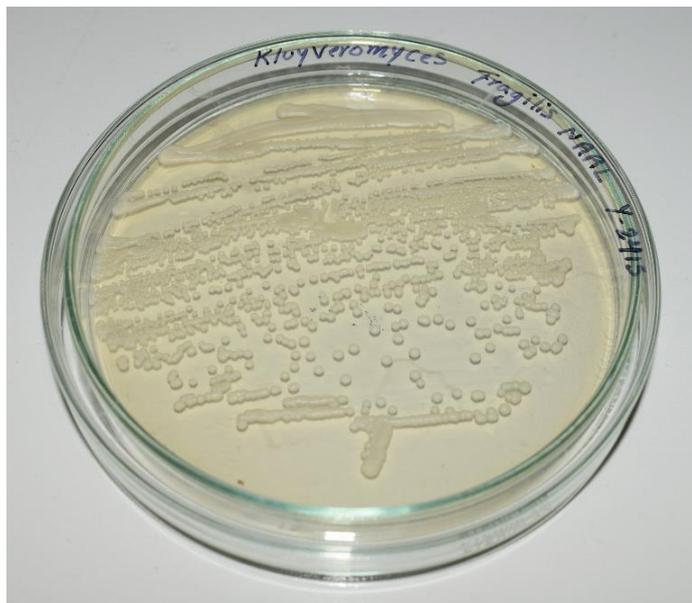


Imagen 04: Siembra por estrías de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en agar Sabouraud Dextrose.

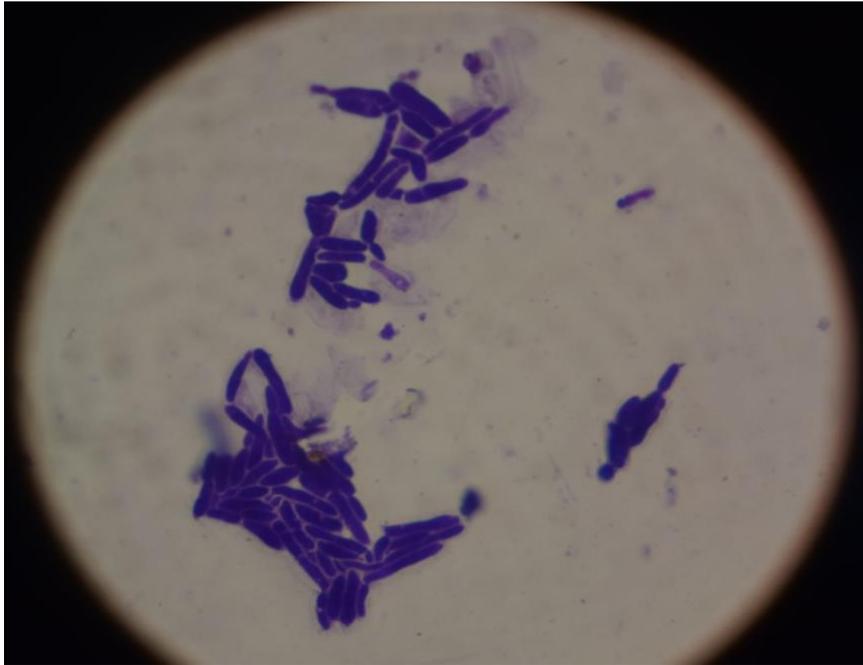


Imagen 05: Observación de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en Microscopio óptico a 100X.



Imagen 06: Cuajada de la leche para la separación de lactosuero.



Imagen 07: Obtención de lactosuero del primer desuerado de la elaboración de queso fresco en el laboratorio de industrias lácteas.



Imagen 08: Filtración de lactosuero desproteinizado para la hidrólisis.



Imagen 09: Obtención de mayor cantidad de biomasa de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en lactosuero desproteinizado.



Imagen 10: Centrifugación a 3300 rpm por 10 minutos el lactosuero desproteinizado para la obtención de biomasa.



Imagen 11: Obtención de biomasa de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 de 2.25×10^8 células/ml.



Imagen 12: Preparación de agar a 3.5 %, 4% y 4.5%, laboratorio de biotecnología UNAJMA

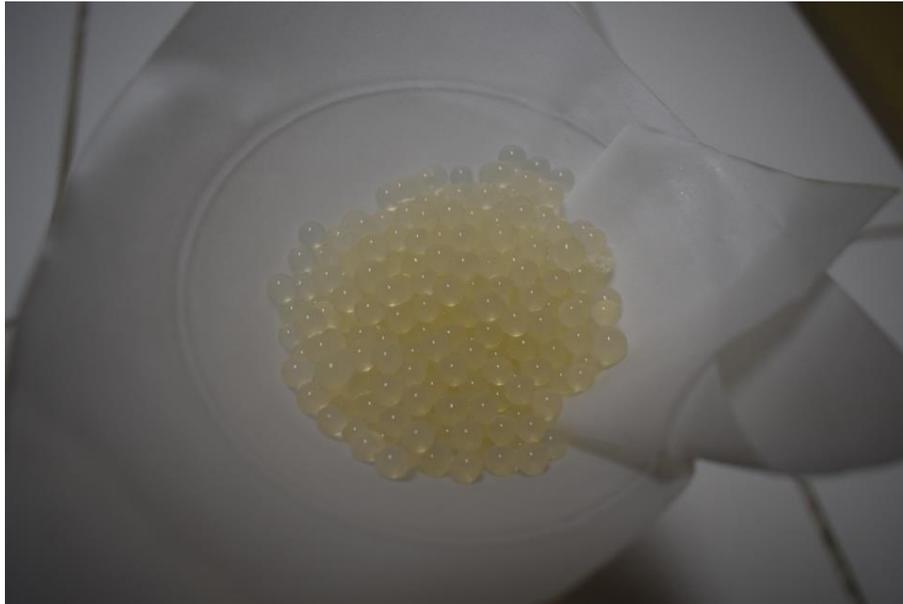


Imagen 13: Inmovilización de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en agar.



Imagen 14: Medición del diámetro de la Inmovilización de *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 en agar.



Imagen 15: Hidrólisis de lactosuero desproteinizado con *Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-2415 inmovilizadas en agar.

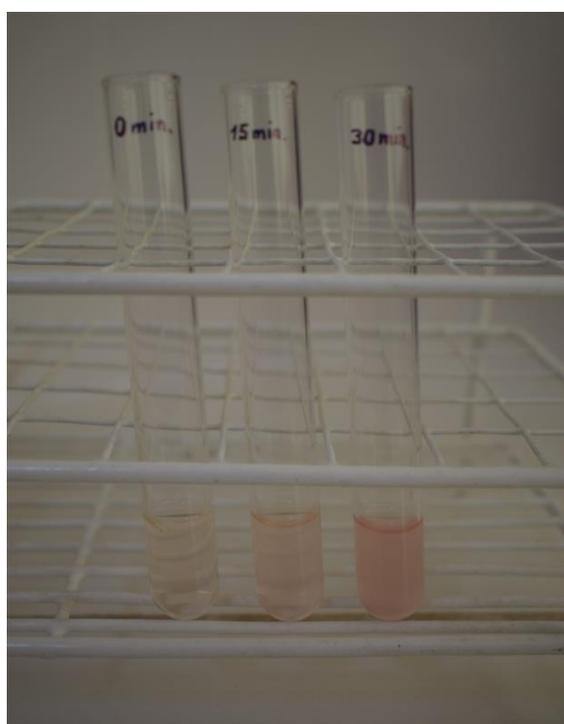


Imagen 16: Análisis de la glucosa en lactosuero desproteinizado por el método de glucosa oxidasa.

Anexo 8: Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	DEFINICIÓN DE OPERACIONES			RECOLECCIÓN DE DATOS	
			VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	MÉTODO	TÉCNICA	INSTRUMENTO
GENERAL ¿Cuál es el efecto de la concentración de agar y la cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas en el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado?	GENERAL Determinar el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado con la concentración de agar y la cantidad óptima del inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas.	GENERAL La concentración de agar y la cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas influyen significativamente en el porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.	DE ENTRADA	<i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415, es una levadura certificada.	Instrumental	Conteo	- Cámara de Neubauer
			- <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas (10, 12.5 y 15 %) v/v				
ESPECÍFICO - ¿Cuál es la concentración adecuada de agar para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado?	ESPECÍFICO - Determinar la concentración adecuada de agar para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.	ESPECÍFICO - La concentración de agar varía significativamente para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.	DE SALIDA	La hidrólisis enzimática es efectuado por la β -galactosidasa o lactasa, rompe el enlace glucosídico $\beta(1,4)$, formado glucosa y galactosa.	Instrumental	Lectura	- Espectrofotómetro
- ¿Cuál es la cantidad óptima del inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado?	- Determinar la cantidad óptima del inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.	- La cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas varía significativamente para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.	% de hidrólisis de lactosuero desproteínizado				
- ¿De qué manera influye la concentración de agar y la cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado?	- Comparar la interacción de la concentración de agar y la cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.	- La interacción de la concentración de agar y la cantidad de inóculo de <i>Kluyveromyces fragilis</i> NRRL Y-2415 inmovilizadas muestra diferencia significativa para obtener un mejor porcentaje de hidrólisis de lactosuero desproteínizado.					