



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**

**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**“Producción de etanol a partir de suero de leche hidrolizado”**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

**INGENIERO EN ALIMENTOS**

Autora:

Vanessa Alexandra Chimbo Peñaloza

Director:

Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

**CUENCA, ECUADOR**

**2015**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi madre, por ser el pilar más importante y demostrarme que lo que se hace con amor da buenos resultados, su apoyo incondicional es único sin importar nuestras diferencias de opiniones. A mi padre, a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre, y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento es tan especial para ti como lo es para mí.

A mis hermanos: Priscy, mi ejemplo a seguir, aunque no llegue a ser tan grande como tú, soy tus reflejos, y Pau mi impulso para mirar siempre adelante (dejando de llorar) y tomándolo todo tan relajado, los amo infinitamente

Al amor de mi vida Ricardo, mi motivación, por ser mi apoyo contante e incondicional, por enseñarme tantas cosas lindas

Sin ustedes no hubiese logrado esta meta.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. Thomas Chalmers

## AGRADECIMIENTOS

Ha sido un año lleno de esfuerzos y sacrificios, cerrada esta etapa, me queda agradecer principalmente a Dios por permitirme llegar a esta instancia del camino, en donde me vuelvo toda una profesional

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias mami por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio, fue lo mejor su compañía y la llegada de sus cafés era para mí como agua en el desierto, sus palabras de apresuro por hacerme el vestido gracias infinitas amiga mía; gracias papi por siempre desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias papi por ser tan celoso y no dejarme casar antes de ser toda una profesional, por cada consejo y por cada una de sus palabras que guiaron durante mi vida

De igual manera agradecer a mi profesor de Investigación y de Tesis de Grado, Ing. Claudio Sánchez por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formarte como persona e investigador, y sobre todo por ser mi buen amigo y ahora colegas.

A mi ñaña por darme el aliento necesario en los momentos en que todo se veía negro, y mi gordo gracias por esas sonrisas y aquella malanoche en la que te quedaste junto a mí.

Finalmente, a mi novio quien lloró y sonrió en cada momento junto a mí y fue capaz de contenerme cuando todo iba mal. Gracias por amarme como solo tú lo puedes hacer, desde ahora empiezan nuestros sueños y metas juntos

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>II</b>
AGRADECIMIENTO.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	IV
INDICE DE ANEXOS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS.....	IX
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 1 SUERO LÁCTEO.....</b>	<b>2</b>
1.1. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES .....	2
1.2. EXTRACCIÓN .....	3
1.3. COMPOSICIÓN Y VALORES ENERGÉTICOS.....	4
1.4. TIPOS DE LACTOSUERO .....	4
1.4.1. Suero dulce de leche .....	5
1.4.2. Suero ácido de leche .....	5
1.4.3. Suero de leche concentrado .....	6
1.5. COMPOSICIÓN VALORES ENERGÉTICOS Y ALIMENTICIOS .....	6
1.5.1. Proteínas.....	7
1.6. APLICACIÓN DEL SUERO LÁCTEO .....	9

1.6.1.	Lactosuero como producto post desecho .....	9
1.6.2.	Aplicaciones industriales .....	9
1.7.	PROTEÍNA UNICELULAR.....	12
1.7.1.	Fermentación alcohólica .....	13
1.7.2.	Biomasa .....	13
1.7.3.	Microorganismos .....	14
1.7.4.	Sustratos para la obtención de biomasa .....	15
1.7.5.	Pretratamiento del suero .....	15
1.7.6.	Saccharomyces Cerevisiae.....	16
1.8.	ENZIMOLOGÍA .....	17
1.8.1	PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR FERMENTACIÓN.....	17
1.9.	LA LACTOSA .....	17
1.9.1	ENZIMA B-GALACTOSIDASA .....	17
1.10.	HIDRÓLISIS DE LA LACTOSA.....	18
1.11.	GLUCOSA Y GALACTOSA.....	19
1.12.	Ruta Metabolica .....	20

## **CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA ..... 21**

2.1.	MÉTODOS Y TÉCNICAS .....	21
2.1.1	Metodología general del trabajo .....	21
2.2.	UBICACIÓN.....	23
2.2.1.	Toma de muestras .....	23
2.2.2.	Estudio de laboratorio.....	24
2.3.	DESARROLLO.....	24

2.3.1.	Control microbiológico de crecimiento de cepas LAB .....	24
2.4.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	25
2.5.	MATERIA PRIMA Y TRATAMIENTO TÉRMICO DEL SUERO DE LECHE.....	27
2.5.1.	Primer tratamiento térmico .....	27
2.5.2.	Segundo tratamiento térmico.....	28
2.6.	ANÁLISIS DEL SUERO DESPROTEINIZADO .....	28
2.6.1.	Determinación del porcentaje de hidrólisis .....	29
2.6.2.	Determinación del contenido de glucosa.....	29
2.7.	SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	33
2.7.1.	Inóculo .....	33
2.8.	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	34
2.8.1.	Aislamiento de levaduras.....	34
2.8.2.	Condiciones del cultivo .....	36
2.9.	DESTILACIÓN.....	36
2.9.1.	Determinación de la pureza de la disolución (grado alcohólico).....	37
2.9.2.	Determinación de metanol y alcoholes superiores en el etanol destilado, por cromatografía de gases .....	38
2.10.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
2.10.1.	Diseño factorial 2 <sup>3</sup> .....	42
2.10.2.	Desarrollo experimental.....	43
2.11.	ANÁLISIS SENSORIAL.....	46

<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
3.1. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS DE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICA DEL SUERO DE LECHE .....	47
3.1.1 Suero hidrolizado durante el proceso de fermentación.....	48
3.2. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS DE PORCENTAJES DE LACTOSA INICIAL Y FINAL.....	53
3.3. DESARROLLO Y COMPORTAMIENTO DE LAS LEVADURAS ....	54
3.4. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS EN CUANTO A LA PUREZA DEL GRADO ALCOHÓLICO.....	55
3.5. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS EN CUANTO A CUANTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE ALCOHOL.....	56
3.6. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE DETERMINACIÓN .....	56
3.7. RESULTADOS DE LAS INTERACCIONES DOBLES Y TRIPLES ENFOCADAS EN EL DISEÑO FACTORIAL.....	60
3.8. ELABORACION: SYRUP .....	62
3.9. ANALISIS DE LA BEBIDA ALCOHOLICA .....	64
Interpretación de resultado y análisis sensorial: Syrope con maracuyá para bebidas alcohólicas. ....	64
<b>Capítulo 4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>66</b>
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES .....	68
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>69</b>

Índice de anexos .....	73
Anexos.....	73
ANEXO 1: Suero de leche. Requisitos NTE INEN 2594:2011 .....	74
ANEXO 2: FICHA TECNICA AGAR SABOURAD .....	78
ANEXO 3: DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA .....	80
ANEXO 4: PROPIEDADES DE LAS SOLUCIONES ACUOSAS DE ETANOL.....	81
ANEXO 5: NORMA TECNICA INEN 1837:2015 SOBRE BEBIDAS ALCOHOLICAS (LIMITE MAXIMO DEL CONTENIDO DE ETANOL METANOL, FURFURAL, ALDEHIDOS Y ALCOHOLES SUPERIORES) .....	87
ANEXO 6: FICHA DE CATAACION.....	90
ANEXO 7: IMÁGENES .....	91

## ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla N° 1. Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido.....	4
Tabla N° 2. Origen y principales características de los lactosueros derivados de la elaboración de quesos.....	4
Tabla N° 3. Composición de lactosuero dulce y ácido.....	6
Tabla N° 4. Contenidos en vitaminas del lactosuero.....	7
Tabla N° 5. Composición proteínica del lactosuero dulce y ácido.....	8
Tabla N° 6. Propiedades funcionales de la leche y el lactosuero.....	12
Tabla N° 7. Reacción general para la producción de biomasa microbiana	14
Figura 1. Propiedades de diferentes $\beta$ -galactosidasas.....	18
Figura 2. Proceso de hidrólisis de la lactosa.....	19
Figura 3. Ruta metabólica de la glucosa y galactosa.....	20
Tabla N°8.	
Tabla N° 9. Hidrólisis de la lactosa.....	28
Tabla N° 10. Resultados del análisis del suero desproteinizado.....	29
Tabla N° 11. Ficha del reactivo utilizado.....	30
Tabla N° 12. Esquema de pipeteo.....	31
Tabla N° 13. Uso de reactivos en laboratorio.....	31
Tabla N° 14. Lectura en el espectrofotómetro.....	32
Tabla N° 15. Equivalencias.....	33
Diagrama N° 2. Diluciones de muestras para cuantificación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35

Tabla N° 16. Valores de punto de ebullición.....	37
Tabla N° 17. Ajuste de cromatógrafo.....	41
Figura N° 4. Diseño factorial 2 <sup>3</sup> y su representación geométrica.....	43
Tabla N° 18. Variables de diseño experimental.....	44
Tabla N° 19. Respuestas del diseño experimental.....	44
Tabla N° 20. Cantidades estándar respecto de las variables.....	44
Tabla N° 21. Matriz del diseño experimental de mezclas con las variables identificadas.....	45
Tabla N° 22. Inóculos de acuerdo al diseño experimental.....	45
Tabla N° 23. Variables de respuesta en los diferentes experimentos.....	46
Tabla N° 24. Datos del suero antes del proceso de hidrólisis.....	48
Tabla N° 25. Porcentaje de hidrólisis alcanzado.....	48
Tabla N° 26. Siembra de levaduras en el día 0.....	49
Tabla N° 27. Proceso de fermentación.....	49
Gráfico N° 1. Porcentaje de sólidos solubles.....	50
Gráfico N° 2. Desarrollo del grado alcohólico en relación a sus días de fermentación.....	51
Gráfico N° 3. Variación del pH.....	52
Gráfico N° 4. Producción de CO <sub>2</sub> .....	53
Tabla N° 28. Datos de lactosa inicial y final.....	53
Gráfico N° 5. Comportamiento de las levaduras durante el proceso de fermentación.....	56
Tabla N° 29. Pureza del grado alcohólico.....	55
Tabla N° 30. Concentración de metanol.....	56

Gráfico N° 6. Contenido de metanol presente en las muestras.....	57
Tabla N° 31. Concentración de aldehídos.....	57
Gráfico N° 7. Contenido de aldehídos presente en las muestras.....	58
Tabla N° 32. Concentración de alcoholes superiores.....	58
Gráfico N° 8. Contenido de alcoholes superiores presente en las muestras.....	59
Gráfico N° 9. Contenido de etanol presente en las muestras.....	60
Tabla N° 33. Resultado del diseño factorial y su efecto de interés.....	61
Tabla N° 34 y 35. Resultados según ficha de catación.....	65
Gráfico N° 10. Normal Plot.....	65

# “PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE SUERO DE LECHE HIDROLIZADO”

## RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue obtener etanol con un alto grado alcohólico, buscando optimizar las condiciones de hidrólisis en el suero, utilizando  $\beta$ -galactosidasa; se cuantificó las moléculas de glucosa convertidas en alcohol. Se desarrolló un diseño factorial, en donde se plantean variables: azúcar, porcentaje de levadura y tiempo, en relación a los °Brix, cantidad de CO<sub>2</sub> y °GL como variables de respuesta.

Además del aprovechamiento del suero, el etanol cumple con los requisitos para consumo humano; razón por la que fue ingrediente principal en la elaboración de la bebida alcohólica sabor a maracayá, contiene 15°GL. Mediante técnicas de catación fue de buena aceptación por los consumidores. Se logró la disminución de la contaminación ambiental que este desecho produce.

**Palabras Clave:** hidrólisis, suero,  $\beta$ -galactosidasa, °Brix, etanol



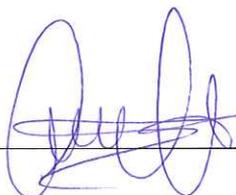
Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

**Director de Tesis**



Fausto Tobías Parra Parra

**Director de Escuela**



Vanessa Alexandra Chimbo Peñaloza

**Autora**

## "ETHANOL PRODUCTION FROM HYDROLYZED WHEY"

### ABSTRACT

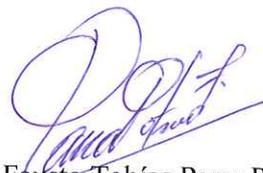
The purpose of this study was to obtain ethanol with high alcohol content to optimize the hydrolysis conditions in whey by using  $\beta$ -galactosidase. The glucose molecules converted to alcohol were quantified. A factorial design, where the following variables: sugar, yeast percentage and time were proposed in relation to °Brix, CO<sub>2</sub> and °GL amounts as response variables.

In addition to the use of whey, ethanol meets the requirements for human consumption; being this the reason why it was the main ingredient in the production of a passion-fruit flavored alcoholic beverage which contains 15°GL. Through cupping or tasting techniques, it was determined that the product was well-accepted by consumers. Moreover, this contributed to reduce the environmental pollution produced by this waste.

**Keywords:** Hydrolysis, Whey, B-Galactosidase, °Brix, Ethanol



Claudio Esteban Sánchez Jáuregui  
**Thesis Director**



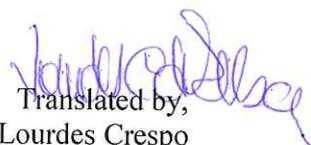
Fausto Tobías Parra Parra  
**School Director**



Vanessa Alexandra Chimbo Peñaloza  
**Author**



UNIVERSIDAD DEL AZUAY  
Dpto. Idiomas



Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

## **INTRODUCCIÓN**

La industria láctea alrededor del mundo es una de las principales de la industria alimenticia de origen animal. Genera grandes recursos, y su forma de producción depende de las tecnologías utilizadas, produciendo leche y derivados. En el marco ecuatoriano, la leche es producida principalmente por pequeños ganaderos, quienes venden su producción láctea a las marcas de expendio y procesamiento de lácteos.

De esta manera, se ha establecido en el desarrollo de este trabajo, que el suero de leche es el producto residual más abundante de la industria láctea, y por ende, un residuo que puede causar daños al ambiente. Su desecho, representa un serio impacto ecológico, entre los más grandes de la industria láctea. Por este motivo, se ha propuesto obtener etanol apto para el consumo humano, el cual servirá como un producto alternativo que puede servir para el desarrollo de pequeñas industrias lácteas; se presenta las condiciones óptimas para obtener un alto grado alcohólico por medio de un proceso biotecnológico, la obtención de este, es de uso específico para el desarrollo de una bebida alcohólica.

## SUERO LÁCTEO

### 1.1. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES

Es uno de los residuos más abundantes en las industrias lácteas. Se define como “un subproducto líquido obtenido después de la precipitación de la caseína y de la grasa durante la elaboración del queso (Parra Huertas, 2009, pág. 4967)”; lo cual quiere decir que es un residuo que queda de la elaboración de quesos, el mismo que “(...) representa del 80% a 90% del volumen total de leche procesada (Superintendencia de Industria y Comercio, 2013, pág. 10)”.

En el documento emitido por la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (2013) se señala que el suero lácteo “(...) contiene el 50% de los nutrientes de la leche y una alta proporción de proteínas hidrosolubles”. Además de esto, por la aplicación de nuevas tecnologías, “se obtienen concentrados de proteína de suero con un 40% a 80% de proteínas, y aislados de proteínas de suero con porcentajes proteínicos mayores al 80% (...) (pág. 9)”.

Pueden existir tres clases de lactosuero, las cuales dependen del producto primario con el que fue elaborado el producto; estas son: el suero dulce, el suero semiácido y el ácido. Los primeros pueden ser reutilizados por su alta concentración de proteínas, que va de un 25 a 80% (García-Morales, Álvarez Gallego, & Paredes Gil, 2014), para elaborar alimentos de consumo humano o animal; lo que no puede ocurrir con el suero ácido, que necesitaría un proceso adicional para regular su pH por lo que es desechado, generalmente.

Existe una caracterización positiva del suero como para explorar y experimentar en la búsqueda de productos alternativos. Sin embargo, el desecho del suero lácteo ha sido y sigue siendo uno de los grandes problemas de la industria alimentaria, ya que éste representa una ingente fuente de recursos que simplemente son desechados a las alcantarillas en la mayor parte de los casos, llegando también a sumar en el impacto causado por la contaminación ambiental.

El vertido directo de estas aguas residuales a las redes de saneamiento urbanas suele ocasionar problemas graves en el funcionamiento de las estaciones depuradoras. En estos efluentes se pueden encontrar elevadas concentraciones de sales, por ejemplo en las salmueras de las industrias del aderezo o en el caso del lactosuero de las queserías, pesticidas no degradados (...). Por ello, se suele exigir un tratamiento in-situ en las instalaciones que las generan que suelen ser sometidas al correspondiente control y regulación por las autoridades competentes. (García-Morales, Álvarez Gallego, & Paredes Gil, 2014)

Se crearon nuevas tecnologías. Estos aspectos son abordados en la siguiente cita:

Identificamos la evolución de las tecnologías del suero y sus aplicaciones en alimentos y encontramos que desde 1977 y hasta 1982 esta tecnología estuvo en una etapa emergente. Desde ese año y hasta la actualidad la tecnología se encuentra en una etapa de crecimiento, caracterizada por una alta actividad de patentamiento, un alto impacto competitivo de las tecnologías que se desarrollan y un gran número de competidores (Superintendencia de Industria y Comercio, 2013, pág. 16).

## **1.2. EXTRACCIÓN**

Se puede obtener la proteína, de la mejor calidad a través de procesos químicos, como es el intercambio iónico y la microfiltración. Es posible aislarla de otras formas; sin embargo, las fórmulas resultan muy elevadas en lactosa, grasa y ceniza. Las medidas para su tratamiento, (Moya Mora, 1995):

- Oxidación de la materia orgánica suministrando grandes cantidades de oxígeno.
- Producción de biocombustible por fermentación anaeróbica.
- Utilización directa de la materia orgánica como alimento.
- Coagulación/floculación de partículas en suspensión.

El queso, además de proteínas, contiene entre un 20 % a 30 % de grasa dependiendo del tipo de queso elaborado, sin embargo, aún queda grasa remanente en el suero de leche. Por último, la concentración de lactosa que permanece en el suero de leche es igual o muy

similar a la concentración de lactosa presente en la leche de partida para la elaboración del queso (Franchi M., 2010).

### 1.3. COMPOSICIÓN Y VALORES ENERGÉTICOS

**Tabla N° 1. Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido**

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	
Lactosa, % (m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15
Proteína láctea, % (m/m) (1)	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Grasa láctea, % (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	--	0,7	--	0,7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41

(1) el contenido de proteína láctea es igual a 6,38 por el porcentaje de nitrógeno total determinado.

FUENTE: INEN 2594: 2011

### 1.4. TIPOS DE LACTOSUERO

Ácidos y los dulces. Su origen y características se describen a continuación:

**Tabla N° 2. Origen y principales características de los lactosueros derivados de la elaboración de quesos**

	LACTOSUEROS ÁCIDOS	LACTOSUEROS DULCES
<b>ORIGEN</b>	Proviene de la fabricación de quesos fresco y de pasta blanda	Proviene de la fabricación de quesos de pasta cocida y prensada
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	Una parte de la lactosa se ha transformado en ácido láctico y son ricos en Ca y P	Pobres en ácido láctico y en calcio y fósforo

FUENTE: Revista AIDIS, 2012

#### 1.4.1. Suero dulce de leche

Posee mayor concentración de lactosa respecto al contenido de acidez. En la siguiente cita se describe la forma en que se produce: “Si en la coagulación de la leche se utiliza

enzimas de lactosuero se denomina dulce (Parra Huertas, 2009, pág. 4967)". Se acota sobre el tipo de enzimas utilizadas que: "(...) se obtiene de la elaboración del queso mediante el uso de enzimas proteolíticas o cuajo, las cuales actúan sobre las caseínas de la leche y las fragmentan, haciendo que éstas se desestabilicen y precipiten (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014, pág. 14)".

En otra cita, se dice que el suero de leche "(...) se obtiene en el proceso de elaboración del queso cuando a la leche líquida, previamente pasteurizada, se la añade el cuajo, fermento natural contenido en el estómago de los rumiantes que posee una enzima que hace coagular la leche (Discovery Salud, 2001)".

El suero dulce en su composición "está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5 (Parra Huertas, 2009, pág. 4968)", aunque la temperatura ambiente baja hasta un pH 4,5. Como se indicó anteriormente, el suero dulce "tiene mayor lactosa y mayor proteína respecto al ácido (ibíd.)".

#### **1.4.2. Suero ácido de leche**

A diferencia del suero dulce, tiene mayor cantidad de acidez con referencia al contenido de lactosa, y se deriva de la elaboración de "(...) queso, caseína o productos similares (INEN, 2594:2011, p. 1)". Se anota en la siguiente cita:

(...) se genera mediante la precipitación ácida de la caseína, la cual se logra disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4.5 o 4.6. A este pH se alcanza el punto isoeléctrico de la mayoría de las caseínas presentes; en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas de tipo séricas (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014, pág. 14).

### 1.4.3. Suero de leche concentrado

Su composición básica se define de la siguiente manera: “Es el producto obtenido por la remoción parcial de agua de los sueros, mientras permanecen todos los demás constituyente en las mismas proporciones relativas (INEN, 2594:2011, pág. 1)”.

## 1.5. COMPOSICIÓN VALORES ENERGÉTICOS Y ALIMENTICIOS

Las proteínas aportan nutricionalmente, es así que son parte de la alimentación y dieta de las personas.

Contiene más de la mitad de los sólidos presentes en la leche original, incluyendo alrededor del 20% de las proteínas (lactoalbúminas y lactoglobulinas), la mayor parte de la lactosa, minerales (calcio, fósforo, sodio y magnesio) y vitaminas hidrosolubles (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina y ácido ascórbico) (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014, pág. 15).

Distribución de los componentes que se encuentran en el suero:

**Tabla N° 3. Composición de lactosuero dulce y ácido**

COMPONENTE	SUERO DE LECHE DULCE (g/L)	SUERO DE LECHE ÁCIDO (g/L)
Sólidos totales	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Lactosa	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Grasa	0,0 – 5,0	0,0 – 5,0
Proteína	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fósforo	0,4 – 0,7	0,5 – 0,8
Potasio	1,4 – 1,6	1,4 – 1,6
Cloruros	2,0 – 2,2	2,0 – 2,2

FUENTE: Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fuente que a su vez cita el cuadro de Panesar (2007) y Callejas (2012).

Este gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 3,5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero líquido (Muñi et al., 2005), siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Cahuasquí, 2013, pág. 12).

**Tabla N° 4. Contenidos en vitaminas del lactosuero**

VITAMINAS	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	NECESIDADES DIARIAS (mg)
Tiamina	0,38	1,5
Riboflavina	1,2	1,5
Ácido nicotínico	0,85	10-20
Ácido pantoténico	3,4	10
Piridoxina	0,42	1,5
Cobalamina	0,03	2
Ácido ascórbico	2,2	10-75

FUENTE: Parra Huertas, 2009

### 1.5.1. Proteínas

El contenido proteínico que es presentado en la Tabla N° 5, es el más alto en volumen después de la lactosa, siendo el principal componente nutricional presente en este líquido, como ya se ha mencionado anteriormente. El suero dulce contiene entre 6 g/L y 10 g/L de proteínas, mientras que el suero ácido tiene entre 6 g/L y 8 g/L. El tipo de proteínas que contiene el lactosuero se absorben de manera inmediata, se argumenta en la siguiente cita: “Las proteínas de suero de leche son proteínas rápidas, llegan al yeyuno casi inmediatamente después de entrar en el estómago (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014, pág. 16)”, es decir, son bastante aprovechadas por el cuerpo humano. Además, estas proteínas tienen un alto valor biológico, como se anota a continuación: “Debido a su contenido de aminoácidos esenciales, el valor biológico de las proteínas de suero de leche es alto comparado con el de otras proteínas (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014, pág. 16)”.

Las cuatro proteínas principales que aporta el suero de leche a la nutrición son:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), albúmina de suero sanguíneo (BSA) e inmunoglobulina (Ig). Además otras proteínas que se presentan en menor proporción, las

cuales se enumeran en la siguiente cita: “lactoferrina, transferrina y la fracción lactolin proteosa-peptona (PP) (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014, pág. 16)”. Funciones que cumplen estas proteínas:

**Tabla N° 5. Composición proteínica de lactosuero dulce y ácido**

PROTEÍNA	FUNCIÓN BIOLÓGICA
$\beta$ -Lactoglobulina	Transportador (retinol, palmitol, ácidos grasos, vitamina D y colesterol) Aumento de la actividad esterasa pregástrica Transferencia de inmunidad pasiva Regulación de la glándula mamaria en el metabolismo del fósforo
$\alpha$ -Lactoalbúmina	Prevención del cáncer Síntesis de lactosa Tratamiento de la enfermedad inducida por el estrés crónico
Albuminas del suero	Función antimutagénica Prevención del cáncer Inmunomodulación
Inmunoglobulinas	Prevención y tratamiento de diversas infecciones microbianas (infecciones de las vías respiratorias superiores, gastritis, caries dental, diarrea, entre otras)
Lactoferrina	Actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas Evita varias infecciones microbianas y varios tipos de cáncer Actividad prebótica
Lactoperoxidasa	Biosidas y actividades biostáticas Prevención de cáncer de colon y cáncer de piel
Glicomacropéptidos	Interacción con toxinas, virus y bacterias (mediada por la fracción de carbohidratos) Control de la formación de ácido en la placa dental Actividad inmunomoduladora
Osteopontina	Mineralización ósea, se utiliza para el tratamiento del cáncer
Proteasas peptonas	Efectos inmunoestimulantes Prevención de la caries

FUENTE: Hernández-Rojas, Vélez-Ruiz, 2014<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Adaptado por los autores por Mendes da Silva, 2011.

## **1.6. APLICACIÓN DEL SUERO LÁCTEO**

Varias empresas y organizaciones educativas de diversos países han desarrollado múltiples aplicaciones al suero. Muchas de estas, han sido ya patentadas para su uso legal en diversos productos.

Las aplicaciones más comunes pueden encontrarse en la elaboración de alimentos como “bebidas, el yogur, los quesos untables, en la industria cárnica en embutidos, la panificación, la confitería e, inclusive, en la industria farmacéutica (Superintendencia de Industria y Comercio, 2013, pág. 10)”.

### **1.6.1. Lactosuero como producto post desecho**

Casi la mitad del líquido se desecha hacia drenajes, a través de los cuales se llega a contaminar los ríos, considerado entre los productos alimenticios más contaminantes. Por ejemplo, representa un gran desgaste para los suelos por la presencia de nitrógeno el cual es soluble en agua, por lo cual este “disminuye el rendimiento de las cosechas, pero además se observa el fenómeno de lixiviación (Valencia Denicia & Ramírez Castillo, 2009, pág. 27)”, pudiendo llegar a descomponer varios minerales y filtrándose en las aguas subterráneas, un verdadero peligro para la salud y los ecosistemas.

Para reducir el impacto se sugiere un tratamiento *in situ* anterior a la eliminación en el alcantarillado normal.

### **1.6.2. Aplicaciones industriales**

“Los productos del suero, incluyendo la lactosa, mejoran la textura, realzan el sabor y color, emulsifican y estabilizan, mejoran las propiedades de flujo y muestran muchas otras propiedades funcionales que aumentan la calidad de los productos alimenticios (Parra Huertas, 2009, pág. 4967)”.

Entre los usos que se han podido investigar, se enumeran: concentrados, hidrolizados, aislados, fórmulas infantiles, producción de etanol, biomasa, levadura para panificación, producción de exopolisacáridos, ácidos orgánicos, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, quesillo, quesos, bebidas fermentadas, bebidas refrescantes, etc.

**a) Concentrados.**

Puede ser aplicado en varios productos alimenticios, dependiendo del porcentaje de proteína que contenga; entre los más comunes, están: sustituto de leche descremada, yogurt, queso procesado, algunas bebidas, salsas, fideos, galletas, helados, pasteles, derivados lácteos, panadería, carne, fórmulas para el consumo infantil (siendo este último aspecto bastante útil debido a las propiedades proteínicas y nutricionales del suero de leche). Por otra parte, el concentrado con un 80 % de proteína, es utilizado “como gelificación, emulsificantes y formación de espuma (Parra Huertas, 2009, pág. 4971)”. Así, se define al concentrado de proteína de suero de leche en la cita a continuación:

(...) es definido por el Código de Estados Unidos de Regulaciones Federales como la sustancia obtenida por la eliminación de suficiente constituyente no proteico a partir de lactosuero para que el producto seco final contenga no menos del 25% de proteína (Parra Huertas, 2009, pág. 4970).

**b) Hidrolizados.**

Sirven en varios casos, “como suplementación dietética o necesidades fisiológicas, para personas de la tercera edad, bebés prematuros, atletas que controlan el peso a través de dietas y niños con diarrea (Parra Huertas, 2009, pág. 4972)”.

En esta otra cita, se define sobre los beneficios de la hidrólisis: “Las proteínas de suero hidrolizadas contienen un alto nivel de péptidos bioactivos y complejos minerales de leche. Estos dos ingredientes muestran ciertos componentes promisorios para el desarrollo de alimentos funcionales, destinados a mejorar la salud cardiovascular (Hernández-Rojas & Vélez-Ruiz, 2014, pág. 20)”.

**c) Aislados.**

Este contiene “por lo menos un 80% de proteína, es extremadamente bajo o libre de lactosa y no contiene grasa (Sevilla Chávez, 2005, pág. 11)”.

**d) Etanol.**

Debido a las características propias del lactosuero, es posible a través de un proceso químico, la producción de etanol, utilizando tratamientos de diferentes índoles, entre los cuales, se utiliza la fermentación del líquido (Araujo, y otros, 2015, pág. 305):

- Fermentación por carga con microaeración.
- Fermentaciones continuas a diferentes tasas de dilución.
- Métodos de inmovilización de levaduras termotolerantes.
- “Cultivos por lote alimentado con ciclos repetidos”.

Sobre el tipo de preparación de este producto, la siguiente cita señala que “la producción de etanol es una alternativa viable, tanto si se utiliza suero con dilución normal como concentrado, aunque con esta última el proceso es más eficiente (...) (Garibay, Ramírez, & Munguía, 2004, pág. 199)”. En cambio, sobre el tipo de suero, hay algunos que consideran que “es imprescindible trabajar con suero concentrado para evitar destilar grandes volúmenes de caldo con baja concentración de etanol (Garibay, Ramírez, & Munguía, 2004, pág. 199)”.

Sobre el margen de ganancias, para que una planta de producción de etanol las genere de manera significativa y sustentable, se debería por lo menos procesar 500000 litros de suero de leche diarios, por lo que se necesitaría de una inversión considerable para este fin (Garibay, Ramírez, & Munguía, 2004).

**Tabla 6. Propiedades funcionales de la leche y lactosuero.**

<b>PROPIEDADES</b>	<b>CASEÍNAS</b>	<b>PROTEÍNAS DE LACTOSUERO</b>
Hidratación	Muy alta capacidad de retención de agua (CRA) con formación pegante a alta concentración	CRA incrementándose con desnaturalización de proteína
Solubilidad	Insoluble a punto isoeléctrico (pI)	Insoluble a pH 5 si es termo desnaturalizado
Gelificación	No gelificación térmica excepto en presencia de calcio. Gelificación micela por quimosina	Gelificación térmica desde 70°C: influencia de pH y sales
Viscosidad	Soluciones muy viscosas a pH básico y neutral. Viscosidad más baja a pH	Soluciones no muy viscosas excepto si son termo desnaturalizadas
Propiedades emulsificantes	Excelentes propiedades emulsificantes a pH básico y neutral Baja estabilidad espumante	Buenas propiedades emulsificantes excepto a pH 4-5 si es termo desnaturalizada
Retención de sabores	Buena retención de sabores	Retención muy variable con la desnaturalización
Propiedades espumado	Baja estabilidad espumante	Excelente estabilidad espumante

Fuente: Hui (1993)

## 1.7. PROTEÍNA UNICELULAR

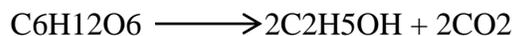
Sirve para que los componentes puedan aumentar su composición química. Para su producción se requiere algún tipo de microorganismo que sirva como “agente biológico” para que sea posible producir proteínas mediante la fermentación (Taron Dunover, Pérez Mendoza, & Martínez Zambrano, 2012). En la siguiente cita, se conceptualiza:

Se denomina proteína unicelular o bioproteína (Molk et al. 2002), a aquella obtenida de la biomasa microbiana de algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones fermentativas apropiadas y controladas que garanticen una adecuada tasa de crecimiento, por medio del aprovechamiento de sustratos baratos compuestos por o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo (Chacón Villalobos, 2004, pág. 94).

### 1.7.1. Fermentación alcohólica

En términos generales “indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un sustrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras y algunas bacterias que producen enzimas para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP (Garzón Castaño & Hernández Londoño, 2009, pág. 30)”. Se requieren diferentes lapsos de fermentación, los cuales dependen del microorganismo utilizado en la experimentación y del resultado que el investigador espera (Taron Dunover, Pérez Mendoza, & Martínez Zambrano, 2012, pág. 190).

Entre las fermentaciones de mayor uso está la fermentación alcohólica, “que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono (...) (Garzón Castaño & Hernández Londoño, 2009, pág. 30)”. Se presenta conforme a la siguiente reacción química:



Para llegar a este tipo de degradación, se utilizan diversos tipos de levadura, siendo la más utilizada la *Saccharomyces cerevisiae*. Acerca del nivel estequiométrico de la fermentación, se cita:

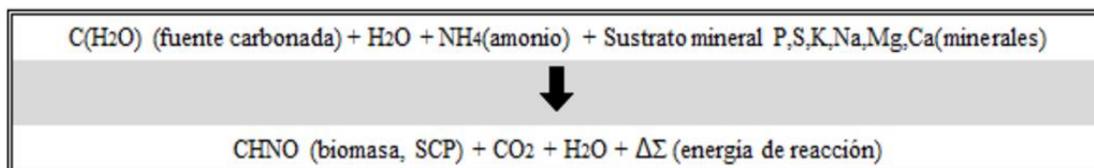
“(...) la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, puesto que al mismo tiempo la levadura debe utilizar la glucosa y otros nutrientes adicionales para poder reproducirse (Garzón Castaño & Hernández Londoño, 2009, pág. 31)”.

### 1.7.2. Biomasa

Descrita en su uso y función, es el incremento de la masa celular, la cual sirve para la reproducción de proteína a partir de un sustrato (como lo es en este caso la levadura). A través de un proceso de reacción bioquímica entre células y lactosa, se producen las células microbianas, y depende de varios factores para que esta aumente, entre estos: el uso de

microorganismos, condiciones de ambiente, entre otros (Parra Huertas, 2009). La ecuación a través de la cual se expresa la biomasa es, según Chacón Villalobos (2004) citando a su vez a Rojas (1995) y Suharto & Redyowatu (2003):

**Tabla 7. Reacción general para la producción de biomasa microbiana**



**FUENTE:** Chacón Villalobos (2004)

Para la obtención de biomasa se “requiere de una fuente de carbono a fermentar<sup>3</sup> (...) Algunas de estas fuentes suelen ser pobres en nitrógeno y minerales, por lo cual es necesaria una suplementación con sales de amonio ó otras fuentes de nitrógeno (Chacón Villalobos, 2004, pág. 102)”. La misma cita señala que “se libera energía y gases como el CO<sub>2</sub>”. Requiere además de una fuente de oxígeno para que pueda incrementarse la masa del cultivo. La masa final tiene un mayor valor proteico.

### 1.7.3. Microorganismos

Existen diversas especies de bacterias, actinomicetes, mohos y levaduras, los cuales pueden utilizar el carbono y la energía existentes para su crecimiento. Entre los microorganismos capaces de fermentar el disacárido están (Parra Huertas, 2009):

- *Candida lipolytica* (cuyo sustrato de conversión son los n-alcanos)
- *Candida novellus* (cuyo sustrato de conversión son los n-alcanos)
- *Candida utilis* (cuyo sustrato de conversión es el etanol y licores sulfúricos)
- *Fusarium graminearum* (con un sustrato de glucosa de calidad alimentaria)

<sup>3</sup> Los cuales son una serie de sustratos, como los descritos en el presente trabajo investigativo.

- *Gliocladium deliquescens* (con un sustrato de licores de maíz)
- *Kluyveromices fragilis* (cuyo sustrato de conversión es el suero de quesería)
- *Saccharomyces cerevisiae* (cuyo sustrato son las melazas)

#### **1.7.4. Sustratos para la obtención de biomasa**

Para los procesos metabólicos, es necesario encontrar fuentes de carbono, por ser materias primas de bajo costo. “Dentro de las fuentes de carbono fósiles se encuentran los hidrocarburos o compuestos petroquímicos que han sido empleados y/o estudiados para la producción de proteína unicelular, algunos de estos son los n-alcanos que contienen el metano, metanol, etanol, entre otros (Zumbado Rivera, 2005, pág. 15)”.

#### **1.7.5. Pretratamiento del suero**

Es necesario tomar en cuenta que se debe esterilizar el suero de leche para luego pasar a la fermentación del mismo para eliminar todo vestigio de microorganismos que pudieran contaminar el producto. En la etapa de pretratamiento, normalmente se realiza la clarificación, el desnatado y el pasteurizado “para que el suero que será utilizado luego como materia prima de productos de mayor valor agregado cumpla con las condiciones y características requeridas por los distintos procesos a los que será sometido (Parzanese, 2011, pág. 5)”.

“El fraccionamiento del suero lácteo proporciona una interesante posibilidad comercial en la fabricación de productos alimenticios (Parzanese, 2011, pág. 1)”.

Con la finalidad de “eliminar al máximo las sustancias grasas presentes en forma de microagregaciones de manera que no perjudiquen el proceso de UF posterior”, para luego acondicionar el suero, “de tal manera que se hayan removido los finos de caseína (...) y las sustancias grasas”; en otras palabras, puede declarárselo como “libre de grasa (Parzanese, 2011, pág. 6)”.

Se sigue con la ultrafiltración, donde “las membranas de ultrafiltración son capaces de retener las proteínas mientras que las sales y lactosa se eliminan junto con el agua que atraviesa la membrana” (Parzanese, 2011, pág. 6)”.

#### **1.7.6. Saccharomyces Cerevisiae**

Es una levadura, un hongo unicelular, del grupo de los ascomicetos. En la naturaleza se encuentra sobre sustratos ricos en azúcares o en los exudados y savias dulces de algunas plantas. El término "levadura" (de "levare" en la acepción de subir o levantar) remite a la experiencia visual de la masa del pan que se "levanta" cuando se añade levadura a la harina. Su nombre alternativo de "fermento" viene del latín *fervere*, que quiere decir hervir y proviene del movimiento del mosto durante la producción de vino o cerveza. Los nombres anglosajones y germánicos (*yeast*, *heffe*) también se refieren a la acción de hervir o hacer espuma. El conocimiento y percepción de la levadura está absolutamente condicionado por sus propiedades de fermentación del pan, el vino o la cerveza. Se entiende por levadura seca a aquella cultivada y separada del líquido nutritivo, sometida a prensado para quitarle el exceso de humedad.

Según la cita, *Saccharomyces cerevisiae* “(...) ha sido ampliamente estudiada, pero se conoce poco acerca de su capacidad como microorganismo probiótico, ya que las investigaciones se han enfocado en otros microorganismos de mayor uso (Ortiz, y otros, 2008, pág. 139)”. Por ser un producto natural, durante muchos años esta especie de levadura ha formado parte de la dieta del hombre, y es utilizada en muchos alimentos y bebidas fermentadas debido a que mejora el perfil nutricional de los mismos. Su contenido en treonina e isoleucina no es superado por ningún otro alimento vegetal. Sólo tiene niveles relativamente bajos de metionina y cisteína. (Pérez, 2010).

## **1.8. ENZIMOLOGÍA**

Las enzimas tienen la capacidad de producir reacciones químicas, además cumplen funciones como catalizadores biológicos y son de naturaleza proteica, influyendo en ciertas ocasiones sobre la calidad del suero

### **1.8.1 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR FERMENTACIÓN**

La biosíntesis de la enzima b-galactosidasa (conocida también como lactasa) se produce gracias al uso de la levadura *Kluyveromyces fragilis*, la cual permite utilizar la lactosa como fuente de carbono y energía. Así, estas enzimas pueden ayudar a obtener lactosa.

## **1.9. LA LACTOSA**

La lactosa es un disacárido, abundante en la naturaleza. Está presente en la leche de los animales y su nivel depende de la especie, por ejemplo su concentración en la leche de vaca es de 4.7% a 5.2% y en la leche humana es de 6.5%. (Garibay, Ramírez, & Munguía, 2004) Se la conoce como azúcar de la leche. (Ege, 2004) La lactosa está formada por “glucosa y galactosa, es prácticamente el único carbohidrato presente en la leche (Garibay, Ramírez, & Munguía, 2004)”.

### **1.9.1 ENZIMA B-GALACTOSIDASA**

Conocidas como lactasas su sustrato es la lactosa, y son capaces de separarla en los dos azúcares que la componen. Al momento de ser hidrolizada se desdoblán sus azúcares que son glucosa y galactosa, los productos poseen mayor dulzor. Los factores, Figura N° 1, que influyen son la temperatura y el pH, sus rangos óptimos varían. (Bustamante Gavilanes, 2014, pág. 13)”.

Las primeras presentan una actividad óptima en un pH entre 3 a 5 y una temperatura entre 46 y 55 °C, mientras que las otras tienen rango de pH de 6,5 a 7,3 y temperaturas entre 35 y 40 °C.

La principal levadura utilizada para la obtención de lactasa es la *Kluyveromyces lactis*. (McSWEENEY.2000)

**Figura 1: Propiedades de diferentes  $\beta$ -galactosidasas.**

Fuente	pH óptimo	T (°C)	P. Molecular	Activadores
<i>A. niger</i>	3,0-4,0	55-60	124 KD	Mg <sup>2+</sup>
<i>A. oryzae</i>	5,0	50-55	90	Mg <sup>2+</sup>
<i>K. fragilis</i>	6,6	37	201	Mn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup>
<i>K. lactis</i>	6,9-7,3	35	135	Mn <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup>
<i>E. coli</i>	7,2	40	540	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup>
<i>L. thermophilus</i>	6,2-7,1	55-57	530	-
<i>S. thermophilus</i>	7,5	55	500-600	-

**Fuente:** McSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. Thomson Science, 2000.

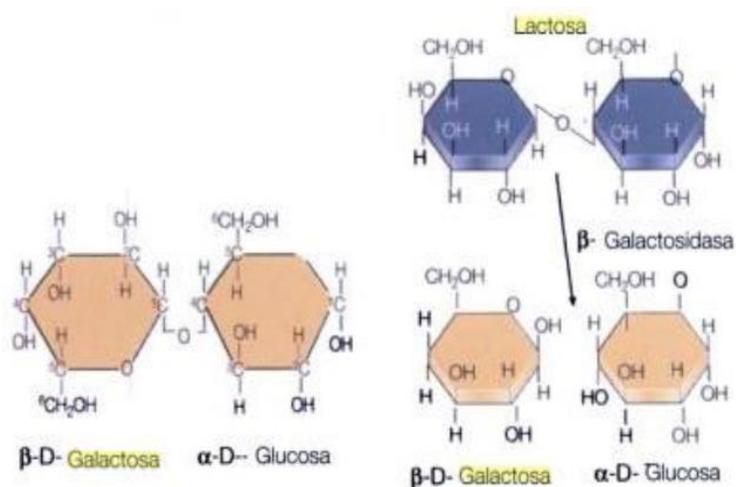
## 1.9. HIDRÓLISIS DE LA LACTOSA

Proceso en el cual; el agua actúa como disolvente. Es producida por la enzima lactasa ( $\beta$ -galactosidasa) que se encuentra de manera natural en el intestino delgado de los mamíferos. Actúa mediante “la inclusión de una molécula de agua que rompe el enlace glucosídico que une los dos monosacáridos (Garibay, Ramírez, & Munguía, 2004)”.

Se puede añadir enzimas  $\beta$ -galactosidasas a la leche para lograr la hidrólisis. El problema con este proceso es la obtención, aislamiento, inmovilización y transporte de lactasa desde hongos, levadura y bacterias. Ángela Moya presenta dos procesos por los

cuales se puede inmovilizar y aislar de manera efectiva y económica dichas enzimas: “se ha conseguido hidrolizar la lactosa mediante lactasa inmovilizada. También ha sido posible la hidrólisis inmovilizando  $\beta$ -galactosidasa sobre silocromo C-80 (Moya Mora, 1995)”. Concluye señalando que se pudo, mediante el último proceso, conseguir una efectividad del 80%.

**Figura 2: Proceso de Hidrólisis de lactosa.**



Fuente: GÖSTA BYLUND, Manual de industrias lácteas, 2003.

## 1.10. GLUCOSA Y GALACTOSA

Son azúcares simples o monosacáridos formados por seis átomos de carbono, el momento de ser ingerido se convierte en glucosa en el hígado como aporte energético, su principal fuente proviene de la ingesta de lactosa de la leche.

Su fórmulas molecular  $C_6H_{12}O_6$ , igual para estos dos azúcares, la galactosa difiere de la glucosa por ser un epímero de esta en el Carbono número 4, es decir, que el grupo de alcohol de este carbono está dirigido hacia la izquierda.

Para lograr un proceso óptimo con la mayor producción de glucosa y galactosa es necesario un tiempo largo de reacción lo que encarece su producción.

### 1.11. Ruta Metabólica

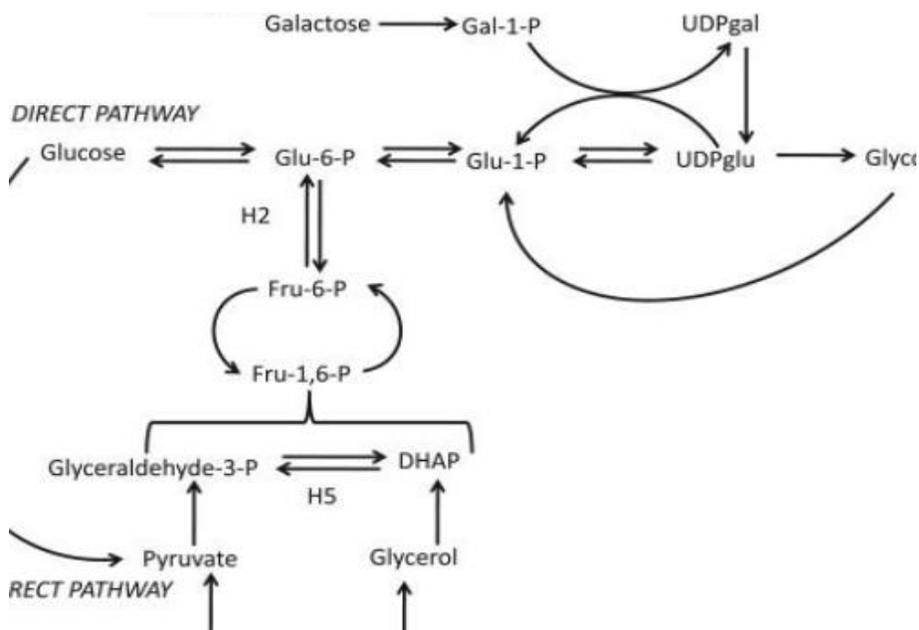
Inicialmente, la galactosa es fosforilada por la galactoquinasa para formar galactosa-1-fosfato. La epimerización de la galactosa-1-fosfato a glucosa-1-fosfato requiere la transferencia de UDP desde la uridinafosfoglucosa (UDP-glucosa) catalizada por la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, esto genera UDP-galactosa y glucosa-1-fosfato.

La UDP-galactosa es epimerizada a UDP-glucosa por la UDP-galactosa 4 Epimerasa y el resultado es aumento de la síntesis de glucógeno.

En ayunas la UDP-glucosa formada se utiliza para metabolizar a la galactosa dando glucosa-1-fosfato, que entonces es convertida a glucosa-6-fosfato por la fosfoglucomutasa.

La epimerasa cataliza una reacción reversible la glucosa puede convertirse en galactosa, para la síntesis de lactosa (en glándula mamaria), proteoglicanos, glicolípidos y glicoproteínas. (Stephanopoulos G , Aristidou A , Nielsen J. 2006)

**Figura 3. Representación de la ruta metabólica de síntesis de glucosa y galactosa**



**Fuente:** Stephanopoulos G , Aristidou A , Nielsen J, 2006.

## CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

### 2.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS

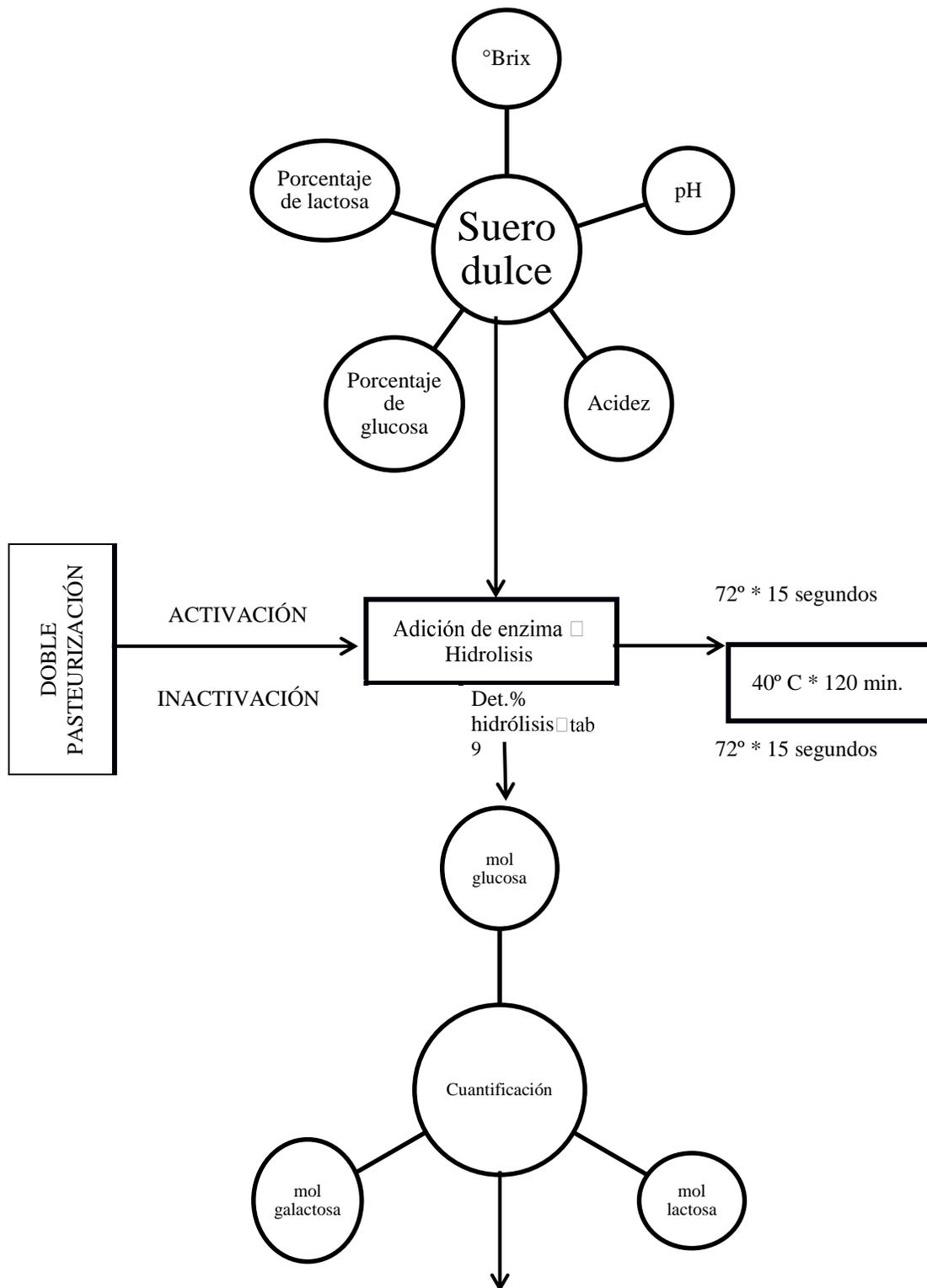
Los métodos que son los que guían los procedimientos para la presente investigación son: por un lado el cuali-cuantitativo y por otro el experimental. Esto porque en el trabajo se procesan datos específicos (estadísticos, numéricos) sobre una base experimental propia del tema, la cual está determinada en cierto punto por la calidad del producto final (tanto en estructura como en sabor) que será tomado en cuenta. Con esta finalidad, se realizaron los experimentos conforme se indica en los apartados correspondientes para que los catadores pudieran degustar y discriminar qué productos son los que más aceptación tienen.

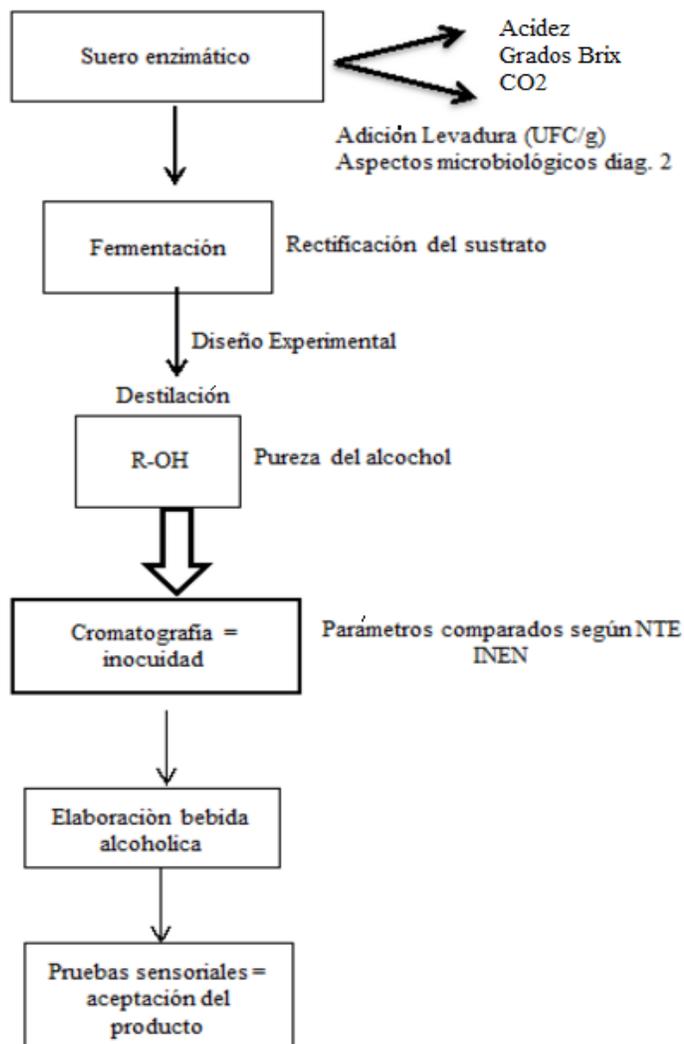
#### 2.1.1 Metodología general del trabajo

Para alcanzar los objetivos que se han trazado en este estudio, ha sido necesario aplicar una metodología general basada en los siguientes pasos:

- Desarrollo de estudios dirigidos a la producción de etanol por vía fermentativa.
- Sometimiento a un tratamiento térmico para su pasteurización, pudiendo de esta manera activar las proteínas.
- Inoculación de la muestra con la enzima  $\beta$ -galactosidasa en un tiempo y temperatura adecuados, donde la cantidad de enzima está relacionada con el volumen del suero.

DIAGRAMA 1. ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO





ELABORACIÓN: ChimboVanessa

## 2.2. UBICACIÓN

### 2.2.1. Toma de muestras

Las muestras del suero fueron tomadas de la Planta de Lácteos Vásquez de la ciudad de Cuenca (Avenida Don Bosco y Avenida 12 de Octubre). El cultivo utilizado en la fermentación fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuyas células fueron mantenidas en refrigeración a  $-15^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2. Estudio de laboratorio**

El estudio de las muestras fue realizado principalmente en los laboratorios de la Universidad del Azuay.

## **2.3. DESARROLLO**

### **2.3.1. Control microbiológico de crecimiento de cepas LAB**

Para que se lleve a cabo el control biológico, fue necesario que las muestras que fueran envasadas en un frasco completamente estéril. Con esta condición dada, se planificaron dos controles:

**Control de crecimiento de cepas LAB (probióticas).**- Se preparó para esto agua peptonada, con la cual se realizó diluciones de entre  $10^1$  hasta  $10^8$ . El medio en el cual se sembraron las muestras fue el agar MRS, el cual sirve para el crecimiento de microorganismos.

## 2.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 8. Operacionalización de variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTE	DESCRIPCIÓN	INDICADOR
Análisis del suero de leche	Acidez	Análisis de los mínimos requeridos de ácido láctico para la experimentación mediante titulación volumétrica con sosa 0,1 y como indicador fenftaleína	Porcentaje, que puede alcanzar un máximo de 0,16 %
	Glucosa	Análisis de la glucosa siguiendo el método <i>Glucose Liquidor Human</i>	Porcentaje de glucosa medido en miligramos
	Lactosa	Determinación de la lactosa mediante la disminución del punto de congelación, utilizando un crioscopio	Porcentaje de lactosa, medida en miligramos
	pH	Determinación del pH inicial	Porcentaje de pH: calidad entre 6 y 6,7 grados Brix
Pretratamiento del suero de leche	Esterilización	Realización de clarificación, desnatado y pasteurizado	Se eliminan los microorganismos patógenos
	Cuantificación del REP	Recuento de placa de la muestra para diseñar mezclas y para determinar la distribución de las variables para los experimentos	Comportamiento de las levaduras en sus etapas de crecimiento
	Inoculación	Inoculación de la muestra con la enzima $\beta$ -galactosidasa con una cantidad relacionada con el volumen del suero	Porcentaje de hidrólisis
	Tratamientos térmicos	Dos tratamientos térmicos para la esterilización del suero de leche de posibles microorganismos patógenos o contaminantes	Temperatura: 72° C Tiempo: 15 seg. Temperatura: 40° C Tiempo: 2:30 horas Generación de productos químicos, tales como: ácido acético, ácido fórmico, ácido pirúvico, además de alcoholes y adefidos
er m en tac ió n	Siembra de levaduras	Empieza la fermentación	Temperatura: 40° C Tiempo: 4 horas Generación de CO <sub>2</sub>

	Propagación de levaduras	Propagación de levaduras sobre la muestra, donde se determinan las variables		Grados Brix, grados GL, temperatura, pH, CO <sub>2</sub> y presión
	Hidrólisis durante la fermentación	Hidrólisis para la disolución con agua que rompe el enlace glucosídico dada en varios lapsos		Porcentaje de hidrólisis
	Control microbiológico de crecimiento de cepas	Control de crecimiento de cepas LAB y de microorganismos patógenos		Tiempo y temperatura
	Determinación del porcentaje de hidrólisis	Lectura por duplicado de las muestras en el crioscopio, aplicando fórmula		Determinación de porcentaje de error
	Determinación del contenido de glucosa	Determinación del contenido de glucosa mediante la prueba GOD-PAD		Concentración de glucosa de 400mg/dl Si es mayor a 400mg/dl, diluir la muestra 1 + 2 con agua destilada
Desarrollo del grado alcohólico	Producción del alcohol	Determinación de la producción de alcohol	Temperatura: de 27° C a 28° C	Variaciones según fermentación
	Producción del CO <sub>2</sub>	Variaciones del comportamiento del CO <sub>2</sub> dependiendo de su comportamiento en el proceso de fermentación		Volúmenes
	Producción de etanol, furfural entre otros	Cromatografía de gases		Según la Norma NTE-INEN 1837:2015
Diseño experimental	Factorial	Optimización de la mayor producción y alto grado alcohólico de etanol		Matrices experimentales

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

## **2.5. MATERIA PRIMA Y TRATAMIENTO TÉRMICO DEL SUERO DE LECHE**

Como se anotó con anterioridad, fue utilizado como cultivo para la fermentación la levadura *Sascharomyces cerevisiae*, con unas células mantenidas en refrigeración a -15° C. De esta manera, se procedería a dar los tratamientos térmicos, los cuales se desarrollan a continuación:

### **2.5.1. Primer tratamiento térmico**

Antes de la fermentación, es necesario esterilizar el suero de leche previo a la fermentación para eliminar cualquier tipo de posibles microorganismos patógenos o microorganismos contaminantes que puedan dificultar el éxito en el experimento por alterarse la reacción enzimática. De esta manera, se da lugar a la separación de proteínas y a la activación enzimática. La temperatura y tiempo de pasteurización fue de 72° C / 15 seg. Luego de esto, se dejó reposar el suero para realizar más adelante una filtración al vacío utilizando papel de filtro (Wathman N° 1) para poder conservarlo refrigerado.

#### **Adición e inoculación de la enzima.**

Aplicados los tratamientos descritos, se mantuvo en refrigeración las muestras. De esta manera, fue posible dar paso a la adición de la enzima líquida  $\beta$  – galactosidasa (Ha – Lactase 5200), con un tiempo de inoculación de dos horas y media a 40° C, por lo cual se pudo obtener suero hidrolizado con un contenido de glucosa de 20 g/L. La cantidad de enzima utilizada se describe en la siguiente tabla:

**Tabla 9. Hidrólisis de la lactosa**

<b>Dosis de Ha-Lactase (ml/L)</b>	<b>Tiempo de Reacción (horas)</b>	<b>Temperatura de reacción (°c)</b>	<b>Grado de Hidrólisis</b>
0.3 – 0,5	10	5	20 %
0.5 – 0.8	4	30	50 %
2.9 – 4.4	1	40	80 %

**FUENTE:** Diseño experimental

Estas dosis son las recomendadas por el proveedor, y probadas con anterioridad en el presente estudio para el respectivo proceso de hidrólisis de la lactosa, el cual es previo al proceso de fermentación.

### **2.5.2. Segundo tratamiento térmico**

Ya realizada la hidrólisis, se procede a dar un tratamiento térmico para inactivar a la Ha –Lactase 5200, pues refrigerada, la lactosa continúa trabajando. En este caso, el proceso térmico del suero se da a 72 o C por el lapso de 15 segundos.

### **Reacción**

La lactosa es sensible al calor, dándose un proceso de generación de productos ácidos como el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido pirúvico, así como de alcoholes y aldehídos.

## **2.6. ANÁLISIS DEL SUERO DESPROTEINIZADO**

Al momento de analizar el suero desproteínizado, se determinaron los siguientes resultados:

**Tabla 10. Resultados del análisis del suero desproteinizado**

DENOMINACIÓN	DESCRIPCIÓN
Acidez	Mediante titulación volumétrica con sosa 0,1 N y como indicador fenoftaleína.
<sup>a</sup> Brix	Lectura directa del brixómetro (marca <i>Atago</i> , modelo <i>Pocket Refractometer</i> ).
pH	Lectura directa del potenciómetro (marca <i>Mettler Toledo</i> , modelo <i>Seven Compact</i> ).
CO <sub>2</sub>	Lectura directa del equipo (modelo <i>Can Need</i> , modelo <i>Beverage KXJ-BCC 200</i> )
Cantidad de glucosa	Según los métodos descritos ( <i>Glucose Liquid Human</i> ).

FUENTE: Diseño experimental

### 2.6.1. Determinación del porcentaje de hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó mediante el análisis de descenso en el punto crioscópico.

Este método se fundamenta en la disminución del punto de congelación, momento en que se da la hidrólisis de la lactosa, esta se desdobra formándose, glucosa y galactosa incrementando el contenido solutos en la solución. (Bustamante Gavilanes, 2014, pág. 13)".

Se utilizó un crioscopio de la marca *Funke Gerber*, modelo *Cryostar I*, el cual fue calibrado antes de ser utilizado. En este equipo fue posible leer cada una de las muestras por duplicado, evitando de esta manera alterar el resultado en cuanto a porcentaje de error. se determinó el porcentaje de hidrólisis aplicando la siguiente fórmula (Bustamante Gavilanes, 2014):

$$\text{Porcentaje de hidrólisis alcanzada} = \frac{3350,77 * \text{Crioscopía final} - (\text{Crioscopía Inicial} / 0,00285)}$$

### 2.6.2. Determinación del contenido de glucosa

Para llegar a conocer el contenido de lactosa, se tomó como referencia la normativa mexicana NMX-F-219 (Dirección General de Normas, 1972)<sup>4</sup>, aunque no pudo cumplirse este procedimiento a cabalidad por no haber contado con el nitrato de cobre, el cual no fue facilitado por los laboratorios donde se realizó el estudio.

Por este motivo, se procedió a aplicar una técnica diferente: se determinó el contenido de glucosa mediante GOD-PAD (prueba enzimática colorimétrica por glucosa). Así se aplicó una técnica de espectrofotometría con un compuesto enzimático denominado glucoperoxidasa, utilizando el espectrofotómetro de marca *Thermo Scientific*, modelo *Espectroco*.

#### Método.

El reactivo utilizado se denomina *Glucose Liquicolor*, y a continuación se expone una ficha con las especificaciones del método utilizado:

**Tabla 11. Ficha del reactivo utilizado**

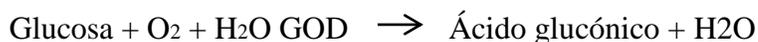
<b>Nombre</b>	Glucose Liquicolor
<b>Método</b>	GOD-PAD
<b>Denominación</b>	Método sin desproteinización
<b>Tipo de prueba</b>	Prueba enzimática colorimétrica por glucosa

**Fuente:** HUMAN Diagnostics

En el instructivo que se muestra adjunto en el empaque de este reactivo de marca comercial Liquicolor<sup>a</sup>, se cita la manera en que se desarrolla el método: “La glucosa se determina después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la catálisis de peroxidasa con fenol y 4-

<sup>4</sup> Esta es la normativa que determina un “Método de Prueba para la determinación de lactosa en leche”.

aminofenazona formando un complejo rojo-violeta usando quinoneimina como indicador (HUMAN Diagnostics, 2012)”. El principio la reacción refleja la manera en que se desarrolla este método:



### Características de la prueba.

Este método facilita realizar varios procesos importantes para determinar los valores buscados para un óptimo producto y así desarrollar un sirope para bebidas alcohólicas de buena calidad. De esta manera, se desarrolla como parte de la información del producto la siguiente descripción:

La prueba es lineal hasta una concentración de glucosa de 400 mg/dl ó 22.2 mmol/l. Sí la concentración de glucosa en la muestra es superior a estos límites, diluir la muestra 1+2 con agua destilada y repetir la determinación. Multiplicar el resultado por 3 (HUMAN Diagnostics, 2012).

### Preparación de reactivos.

Fueron preparados en el laboratorio de biotecnología los reactivos RGT y STD, haciendo una muestra patrón, utilizando el siguiente esquema de pipeteo:

**Tabla 12. Esquema de pipeteo**

ACCIÓN	MACRO		SEMI-MICRO	
Pipetear en las cubetas	STD ó muestra	Blanco de reactivo	STD ó muestra	Blanco de reactivo
STD ó Muestra	20 µl	---	10 µl	---
RGT	2000 µl	2000 µl	1000 µl	1000 µl
Mezclar, incubar por 10 minutos de 20 a 25° C ó 5 minutos a 37° C. Medir la absorbancia del STD y las muestras frente a un blanco de reactivo antes de 60 minutos (ΔΔ).				

**FUENTE:** HUMAN Diagnostics (2012)

**ELABORACIÓN:** Vanessa Chimbo

Además, se utilizaron en este proceso los siguientes componentes:

Tabla 13. Uso de reactivos en laboratorio

<b>RGT</b>	<b>MEDIDA</b>
Buffer fosfato (pH 7,5)	0,1 mol/l
4-aminofenazona	0,25 mmol/l
Fenol	0,75 mmol/l
Glucosa oxidasa	> 15 KU/l
Perosidasa	> 1,5 KU/l
<b>STD</b>	3 ml estándar
Glucosa	100 mg/dl o 5,55 mmol/l

FUENTE: Diseño experimental

### Muestras a cuantificar.

En las cubetas se colocaron dos diferentes tipos de muestras para ser cuantificadas: 20  $\mu$ l de suero lácteo hidrolizado y 20  $\mu$ l de suero lácteo sin hidrolizar. Cada una de estas muestras fueron mezcladas e incubadas en un lapso de 10 minutos, a una temperatura de 15° C. Se midió así mismo la absorbancia para determinar la glucosa residual, el cual fue posible leerse en el espectrofotómetro (un *Thermo Scientific* de modelo *Espectrocom*), a una longitud de onda de 500nm.

A continuación, se describe la preparación de estas por cada una de las cubetas:

Tabla 14. Lectura en el espectrofotómetro

NÚMERO DE CUBETA	MUESTRAS		RGT	STD
	SUERO SIN HIDROLIZAR	SUERO HIDROLIZADO		
1	20 $\mu$ l		2000 $\mu$ l	
2			2000 $\mu$ l	20 $\mu$ l
3		20 $\mu$ l	2000 $\mu$ l	
4			2000 $\mu$ l	20 $\mu$ l
5	2000 $\mu$ l de agua destilada		0	0

FUENTE: Diseño experimental

Una vez tomadas las lecturas del espectrofotómetro, se procede a desarrollar el cálculo de concentración de glucosa, siguiendo la fórmula que se anota a continuación:

$$C = 100 \frac{\Delta A_{\text{muestra}}}{\Delta A_{\text{STD}}} (\text{mg/dl})$$

### Determinación cuantitativa de la glucosa.

Una vez determinado el contenido de glucosa en cada una de las muestras, será posible obtener la cantidad de galactosa por inferencia según moles de glucosa. Estos están desarrollados en la siguiente tabla, en la cual se muestran las respectivas equivalencias:

**Tabla 15. Equivalencias**

1 mol de lactosa	4 moles de ácido láctico
340,64 g de lactosa	360,4 g de ácido láctico
69,5 mg de lactosa	50 mg de glucosa
	7 mg de glucosa

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

## 2.7. SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se hizo un suplemento con la adición de 1 gramo de la enzima Ha-Lactase, así como 3 % de levadura.

### 2.7.1. Inóculo

Para preparar el inóculo se necesitaron como muestra 1000 ml de suero desproteinizado y suplementado, ajustándose el pH de este a 5; de esta manera, se fracciona en diferentes muestras en matraces de 500 ml de Erlenmeyer con tapón de algodón, a la mitad de los cuales les fue adicionada sacarosa comercial en cantidad suficiente para alcanzar los 16 °Brix. Estas fueron utilizadas en diferentes intervalos de tiempo, las cuales fueron agregadas al contenido celular. De esta forma, se mantiene esta mezcla durante 24 horas a una temperatura de 30° C en cuña de agar/sabourad combinando con agua peptona. Para la rectificación de este parámetro, fue utilizada la siguiente fórmula:

$$\text{Rectificación} = \frac{m(A-B)}{100-A}$$

De estos valores, se describen a continuación:

- m= masa del suero en gramos

- A= Brix al que deseamos llegar
- B= Brix inicial del suero

Se incubaron a  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ , en condiciones estáticas, a fin de que se produzca una fermentación espontánea predominantemente anaeróbica, efectuándose los análisis microbiológicos en tres momentos diferentes, como se ha venido anotando. Estos lapsos fueron:

- a. Transcurridas 24 horas, que es cuando empieza el desprendimiento del  $\text{CO}_2$ . En este momento, las condiciones aeróbicas declinaron por consume del  $\text{O}_2$  disuelto en el suero.
- b. Transcurridas las 48 horas, que es cuando se da el proceso denominado como fermentación tumultuosa.
- c. A los 5 días, que es cuando termina la fermentación.

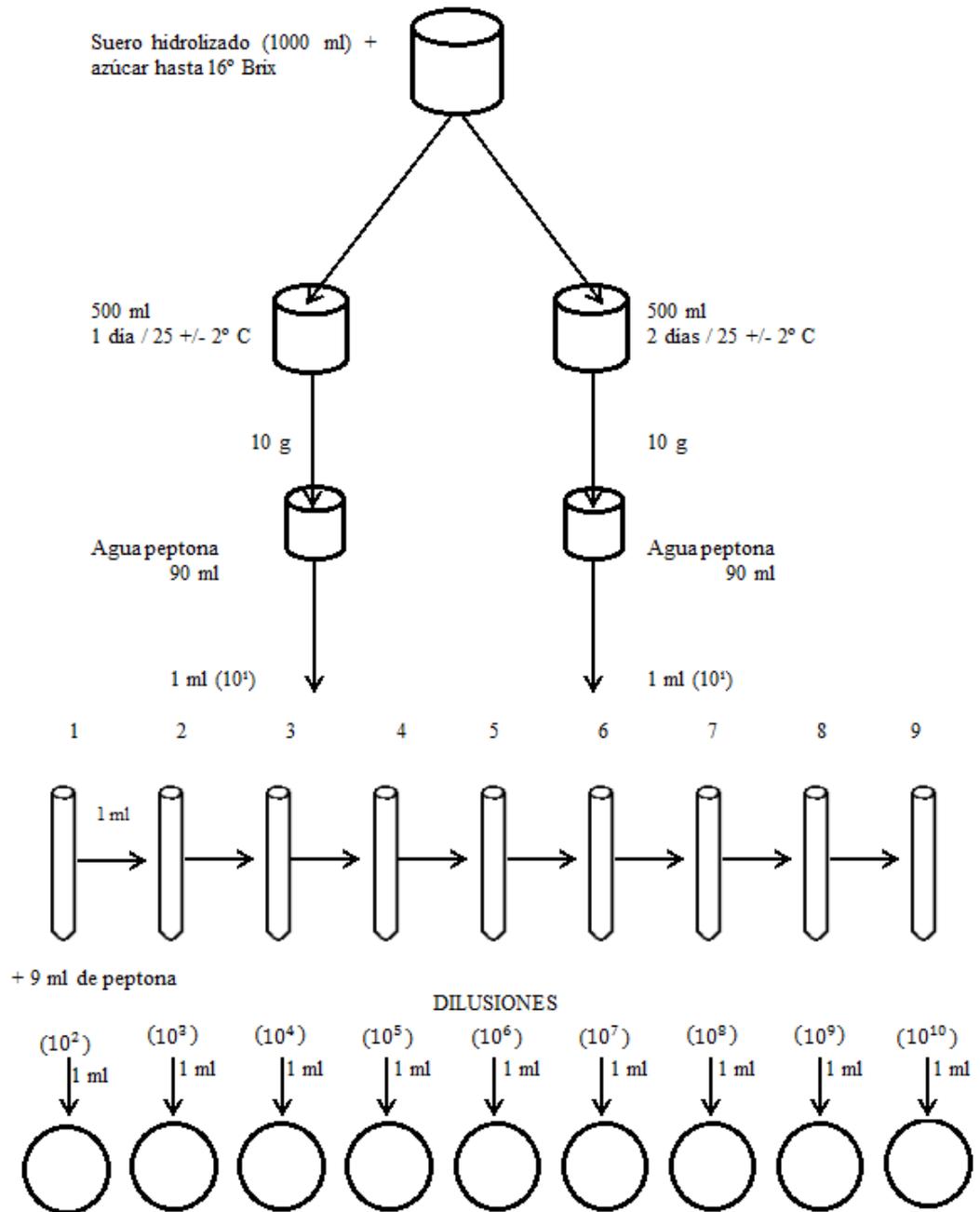
## **2.8. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**

### **2.8.1. Aislamiento de levaduras**

Fueron tomadas alícuotas de 1 ml de cada suero natural examinado, y se sembraron por triplicado con el método de cultivo por extendido en placa. El medio de cultivo utilizado para este procedimiento fue el agar Sabouraud con un 4 % de glucosa. Las placas inoculadas se incubaron a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  con lapsos que oscilan de tres a cinco días. Finalizado este período, se procedió a examinar macro y microscópicamente a las colonias desarrolladas, que presentaron alguna diferencia entre ellas (por ejemplo: tamaño, forma y color de colonias, forma, tipo de agrupación).

El objetivo es desarrollar un recuento de células viables de levaduras, practicando diluciones sucesivas de la muestra para sembrar un determinado volumen de agar Sabouraud. Conociendo el número de colonias que crecen en el medio, el inóculo utilizado y la dilución, es posible determinar las UFC/ml de la muestra inicial-separadas.

**DIAGRAMA 2. DILUCIONES DE MUESTRAS PARA CUANTIFICACIÓN DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***



Fuente: Ferreyra, 2006

### 2.8.2. Condiciones del cultivo

Las variables utilizadas fueron: CO<sub>2</sub>, grados Brix y tiempo de fermentación. Además, se realizó un diseño factorial de tres niveles para los tres factores antes mencionados; es decir, un factorial 2<sup>3</sup>.

## 2.9. DESTILACIÓN

Una vez obtenido el líquido previo a su destilación, se utilizó el evaporador rotatorio marca Buchi R 210/215, junto a un controlador de vacío, el cual ayudó con sus aspiraciones. De esta manera es posible tener certeza de obtener las soluciones completas. Al momento de encender y hervir este líquido, los vapores ascendieron para recorrer un tubo con forma de cuello de cisne hacia el serpentín, el cual estuvo sumergido en un depósito de agua fría, donde se condensan estos componentes. En este proceso, se ha tomado en cuenta las colas de destilación, las cuales se describen a continuación:

- Cabezas (55 %): esta primera fracción fue desechada, ya que había estado constituida por los compuestos más volátiles que el etanol, ya sea acetato de etilo, el etanol y acetales. Además, aquí se pudo también encontrar restos de SO<sub>2</sub> de soluciones inadecuadas. Cabe recalcar que en esta fase se arrastran las colas procedentes de la última destilación realizada.
- Flemas (26 % – 28 %): llamado también “corazón”, es la proporción de alcohol puro, pues la temperatura a la que se destila es de alrededor 78,5° C, basada en los valores de punto de ebullición para algunos disolventes comunes. Estas representan alrededor del 40 % del volumen recogido.
- Colas (2 %): esta es la última fracción, la cual contiene bastante agua. Las colas representan 1,5 % del volumen recogido.

Tabla 16. Valores de punto de ebullición

COMPUESTOS	PUNTO DE EBULLICIÓN
Éter etílico	34,6° C
Metanol	64,7° C
Hexano	69,0° C
Acetato de etilo	77,0° C
Etanol	78,4° C
Ciclohexano	80,7° C
Heptano	98,4° C
Tolueno	110,6° C
Etilbenceno	136° C

Fuente: Enríquez García, Raquel

Luego de realizada esta destilación, en todas las muestras se puede percibir un olor característico, el cual es sumamente profundo. Estas muestras fueron guardadas en envases de vidrio para evitar la evaporación hasta que haya sido posible determinar su concentración en cuanto al grado alcohólico.

### 2.9.1. Determinación de la pureza de la disolución (grado alcohólico)

Para poder determinar la pureza de la disolución, es necesario analizar la densidad de la mezcla, para lo cual se requirió de un picnómetro donde se alojó la muestra. De esta manera, se aplica la siguiente fórmula para determinar el volumen en el picnómetro:

$$v. \text{ picnómetro} = \frac{(m. \text{ picnómetro} + \text{aguadestilada} - m. \text{ picnómetro})}{p. \text{ agua}(215^{\circ}\text{C})}$$

Así, aplicando a la muestra una temperatura de 21,5° C, se determinó que existió un volumen de 998,2 kg/m<sup>3</sup>. Se midió, así mismo, la masa del picnómetro con agua destilada, dando unos 23,933 g, cuando la masa del picnómetro vacío es de 16,179 g. Esto dio como consecuencia, luego de aplicada la fórmula, que el volumen del picnómetro es de 7,768 ml.

Entonces, desde este punto, se obtienen ya con dos elementos importantes para continuar con el estudio: el volumen del picnómetro y la masa del etanol. Ahora, hace falta obtener con estos datos la densidad del etanol, la cual se la ha determinado mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$p. \text{disolución} = \frac{(m. \text{picnómetro} + \text{aguadestilada}) - m. \text{picnómetro}}{v. \text{picnómetro}}$$

Como se puede deducir de la fórmula presentada, la masa del etanol se obtiene de la resta de la masa del picnómetro, más la disolución, menos a masa del picnómetro. De esta manera, se obtiene una densidad de 804,3 kg/m<sup>3</sup>. Este dato es contrastado con la tabla anexa (¿?) (tomada de Perry), y así se puede determinar la concentración en masa del grado alcohólico.

### **2.9.2. Determinación de metanol y alcoholes superiores en el etanol destilado, por cromatografía de gases**

Tras la obtención de etanol luego del proceso de hidrólisis del suero, se administró un estricto control en el proceso de destilación y producción del compuesto que se deseaba obtener, con la finalidad de que las posibilidades de contaminación fueran mínimas, de que no existan adulteraciones en el resultado final, ni que se produjera metanol. El metanol es un compuesto cuya detección en los productos para el consumo humano resulta inconveniente ya que tiene una alta toxicidad. Se ha registrado casos en los que, testeando productos de consume humano, se ha encontrado metanol en su composición; esto ha derivado en la manifestación de varias complicaciones orgánicas como intoxicaciones, ceguera y, en casos extremos, se ha producido la muerte por insuficiencia respiratoria. Es necesario tomar en cuenta estas consecuencias al momento de desarrollar cualquier tipo de bebida. A continuación, se dice en la siguiente cita:

La toxicidad por ingestión es de 0,1g metanol/kg peso corporal o más, es considerada como grave, la ingestión de más de 1 g metanol/kg peso corporal siendo potencialmente letal. La exposición por inhalación de una concentración de más de 1309 mg/m<sup>3</sup> (1000 ppm) o el contacto prolongado o extenso de la piel puede causar también toxicidad sistémica (Luna, 2012)

Por estas razones se ha tomado las debidas precauciones durante el proceso llevado a cabo, asegurando que la presencia del metanol y de los alcoholes superiores se encuentre por

debajo del límite tolerado de acuerdo a las Normas INEN 1837:2015 (Martin, Burggraff, Dyer, & Buscemi, 1981).

### **Fundamentos del método.**

La cromatografía de gases hace uso de temperaturas altas para volatilizar compuestos, los cuales se separan conforme pasan a través de la fase estacionaria de una columna y son detectados para su cuantificación. La cromatografía de gases se define y caracteriza de la siguiente manera:

Es una técnica analítica que permite separar mezclas de compuestos fácilmente volatilizables y térmicamente estables en sus componentes individuales. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza con una fase móvil, a través de una fase estacionaria con la que es inmisible fijada a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre ambas. (...). (Abelló Linde, S.A., 2006)

Cabe resaltar que esta técnica permite separar los componentes de una muestra debido a la diferente afinidad entre dos fases que resultan inmiscibles entre sí: una estacionaria (líquida o sólida) y otra móvil (gas o líquida).

### **Reactivos.**

Las disoluciones anotadas a continuación requieren que su preparación se lleve a cabo de una manera precisa y con las precauciones pertinentes:

- Etanol del 16 % (v/v) en agua desionizada destilada (dd), 100 ml.
- Etanol de 50 % (v/v) en agua (dd), 500 ml.

### **Disoluciones de reserva**

Las siguientes disoluciones necesitan ser preparadas con cantidades conocidas de etanol y de alcoholes de fusel o metanol:

- 10 g de metanol completados a 1000 ml con etanol del 50 % (v/v).
- 5 g de alcohol n-propílico, completados a 1000 ml con etanol de 50 % (v/v).
- 5 g de alcohol isobutílico, completados a 1000 ml con etanol del 50 % (v/v).

### **Disoluciones patrones de trabajo.**

Estas son preparadas a partir de las disoluciones de reserva con la finalidad de que contengan distintas cantidades de cada uno de los alcoholes de fusel; se utiliza alícuotas de estas para obtener las curvas de calibración. Es así que se procede a preparar cuatro disoluciones de patrones de trabajo, a saber:

- 0,5 ml de las disoluciones de reserva 1, 2 y 3 con 4,5 ml de etanol del 50 % (v/v) y completada a 100 ml con etanol del 16 % (v/v).
- 1 ml de las disoluciones de reserva 1, 2 y 3 con 3 ml del 50 % (v/v) y completada a 100 ml con etanol del 16 % (v/v).
- 1,5 ml de las disoluciones de reserva 1, 2 y 3 con 1,5 ml de etanol del 50 % (v/v) y completada a 100 ml con etanol del 16 % (v/v).
- 2 ml de las disoluciones de reserva 1, 2 y 3, completado a 100 con etanol del 16 % (v/v).

### **Materiales.**

- Pipeta mecánica de 1  $\mu$ l, con sus puntas.
- Matraz de fondo redondo de 500 ml.
- Jeringuilla para el cromatógrafo de GC.
- 6 matraces aforados de 100 ml.
- 4 matraces aforados de 1000 ml.

**Equipos.**

- Balanza analítica.
- Una unidad de destilación con un elemento de calefacción que se ajuste al matraz de fondo redondo de 500 ml.
- Un refrigerante de agua fría.
- Una unidad de cromatografía de gases.

Se requiere ajustar el cromatógrafo bajo las siguientes especificaciones:

**Tabla 17. Ajuste de cromatógrafo**

Temperatura del inyector	200° C
Temperatura de columna	De 70 a 170° C/min
Gas portador de las columnas	He a 2 ml/min <sup>5</sup>
Detector:	Ionización de llama
Atenuación:	8 (para todos los desarrollos)

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

**Proceso de preparación de la muestra.**

- 1) Llenar hasta el enrase un matraz aforado de 100 ml. con la muestra de alcohol destilado que se debe analizar.
- 2) Vertir el alcohol en un matraz de fondo redondo de 500 ml. y enjuagar varias veces el matraz aforado con agua destilada, para completar la transferencia. Si resulta necesario, se puede añadir más agua para alcanzar un volumen de la muestra más agua destilada de aproximadamente 150 ml.
- 3) Destilar la muestra y recoger el destilado en un matraz aforado de 100 ml. que esté limpio. Se continuará con la destilación hasta que el matraz volumétrico esté lleno hasta la línea de aforo.

<sup>5</sup> N2 a 20 ml/min en el caso de empaquetadas

- 4) Adicionar 1 ml de la disolución de reserva de alcohol bencílico, a los 100 ml. de cada una de las disoluciones de trabajo patrones y de la muestra de alcohol que va a ser analizada.

#### **Análisis de la muestra y de las disoluciones de trabajo en patrones.**

- 1) Inyectar 1µl. de la disolución de la muestra y de cada una de las disoluciones patrones de trabajo, en desarrollos separados, en la columna de cromatografía GC (con una relación de separación 1:20). En el caso de las columnas empaquetadas, inyectar 5µl.
- 2) Obtener los cromatogramas y los datos de la integración de los picos.

## **2.10. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **2.10.1. Diseño factorial $2^3$**

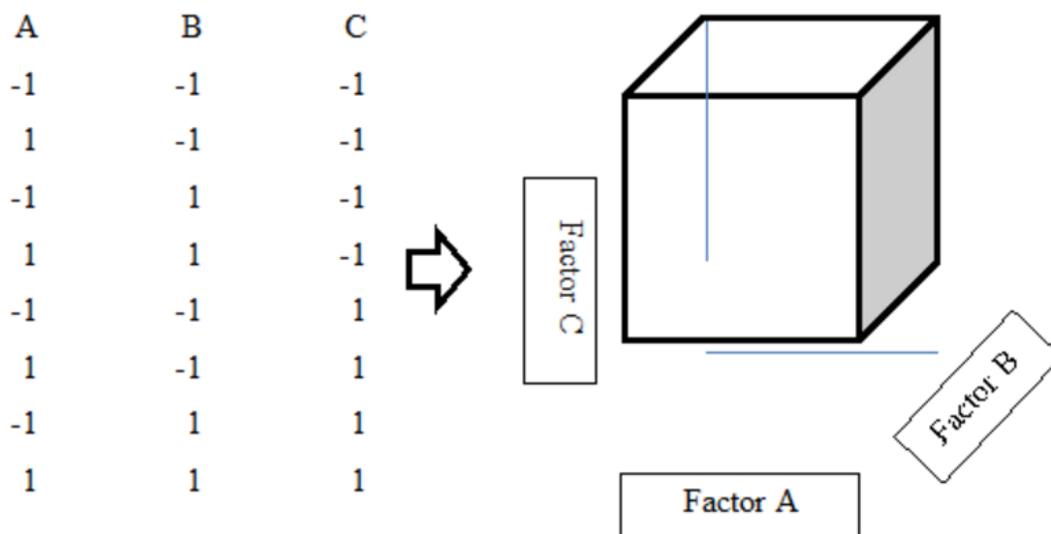
Los tratamientos a los que se someterán las muestras utilizadas en el presente estudio, serán analizados experimentalmente mediante un diseño factorial, a través del cual se busca investigar el comportamiento derivado de la interacción de las variables (azúcar, porcentaje de levadura y tiempo) contrastándolos con los factores de respuesta ( $\text{CO}_2$ , grados Brix, grados GL). Estas acciones ayudarán a determinar cuáles son las condiciones óptimas que se deben implementar para la producción de etanol.

Por otro lado, cabe señalar que el diseño factorial  $2^3$  sirve para estudiar el efecto de tres factores en dos niveles cada uno. Consta de  $2^3 = 2 * 2 * 2 = 8$ , es decir 8 tratamientos diferentes. Los tratamientos del diseño  $2^3$  y su representación geométrica pueden ser apreciados en la figura 4.

La región experimental ahora es un cubo regular centrado en el origen (0, 0, 0), cuyos vértices son los ocho tratamientos. La matriz de diseño se construye fácilmente alternando el signo menos y el signo más en la primera columna, dos menos y dos más en la segunda

columna, y cuatro menos en la tercera. El diseño resulta dispuesto en el orden estándar o de Yates.

**Figura 4. Diseño factorial  $2^3$  y su representación geométrica**



**ELABORACIÓN:** Vanessa Chimbo

Con este diseño se pueden estudiar 7 efectos que corresponden a la ecuación:  $2^3 - 1 = 7$ . De esto se deriva tres efectos principales: A, B, C; tres interacciones dobles: AB, AC, BC, y una interacción triple ABC.

De manera general, la parte que es de mayor interés para el estudio, se enfoca en los efectos principales y las interacciones dobles. Sin embargo, aunque de antemano se puede considerar la interacción triple ABC en el diseño  $2^3$  como un efecto que se puede ignorar, resulta recomendable asegurarse de que su valor sigue siendo de una minúscula cantidad. Se debe tomar en cuenta que incluirla en el análisis puede ayudar a mejorar la perspectiva e interpretación de algunos gráficos, como se podrá apreciar más adelante.

### 2.10.2. Desarrollo experimental

Para iniciar el diseño experimental se inocularon en cada una de las muestras de suero hidrolizado, determinadas cantidades de azúcar, levadura y tiempo. El desarrollo de este proceso experimental se llevó a cabo, en el laboratorio de biotecnología UDALAB de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

#### Variables.

Se determinó las variables para el diseño de las mezclas, con el cual fue posible establecer la distribución de las variables para las respuestas de los experimentos. Todos estos datos se pueden ver en las siguientes dos tablas:

**Tabla 18. Variables del diseño experimental**

Azúcar	X1
Porcentaje de levadura	X2
Tiempo	X3

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

**Tabla 19. Respuestas del diseño experimental**

X1	CO <sub>2</sub>
X2	Grados Brix
X3	Grados GL

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Partiendo del experimento 0, y según las cantidades cuyo soporte consta en la argumentación bibliográfica del presente trabajo, se derivan las cantidades estándar de las variables. Estas cantidades constan en la Tabla 20 que se muestra a continuación:

**Tabla 20. Cantidades estándar respecto de las variables**

x1	Azúcar	79 g
x2	Cepa	3 %
x3	Tiempo	5 días

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Las variables fueron ubicadas en la primera matriz experimental tal y como lo muestra la Tabla 21 a continuación:

**Tabla 21. Matriz del diseño experimental de mezclas con las variables identificadas**

	x1	x2	x3
Experimento	Azúcar	Cepa	Tiempo
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1
0	0	0	0

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Por otro lado, en la tabla 22 se exponen los inóculos para cada una de las 8 muestras, de acuerdo al diseño experimental propuesto. Es así que, por ejemplo, en el experimento 1, se adiciona 80 g de azúcar y un 4 % de levadura; este producto requiere ser fermentado durante 6 días en 1000 ml de sustrato. El mismo proceso aplica al resto de muestras, teniendo en cuenta las distintas especificaciones para cada caso.

**Tabla 22. Inóculos de acuerdo al diseño experimental**

	x1	x2	x3
Experimento	Azúcar (g)	Cepa (%)	Tiempo (días)
1	80	4	6
2	80	4	4
3	80	2	6
4	80	2	4
5	78	4	6
6	78	4	4
7	78	2	6

8	78	2	4
0	0	0	0

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Una vez adicionados los inóculos en cada una de las muestras (suero hidrolizado) y de acuerdo al diseño factorial propuesto, estos fueron incubados y posteriormente fermentados una temperatura de 38° C.

Consecutivamente, pasado el tiempo requerido, se llevó a cabo distintos análisis respecto al CO<sub>2</sub>, grados Brix y grados GL. Las variables de respuesta constan en la siguiente tabla 23:

**Tabla 23. Variables de respuesta en los diferentes experimentos**

	x1	x2	x3	Variables de respuesta		
Experimento	Azúcar (g)	Cepa (%)	Tiempo (días)	CO <sub>2</sub>	Brix	°Gl
1	80	4	6	0,35	3,9	40,04
2	80	4	4	0,38	5,9	21,00
3	80	2	6	0,33	4,1	28,00
4	80	2	4	0,34	6,6	39,00
5	78	4	6	0,37	3,7	15,00
6	78	4	4	0,36	6,0	28,70
7	78	2	6	0,31	3,3	48,70
8	78	2	4	0,40	6,2	33,80
0	0	0	0	0,41	6,1	40,00

**Elaboración:** Vanesa Chimbo

## 2.11. ANALISIS SENSORIAL

Para determinar la aceptación del producto, se reclutará un grupo de personas que realicen la catación del producto, este panel serán jueces semientrenados, es decir personas que han recibido un entrenamiento teórico similar, las cuales no requieren de una definición muy precisa de términos y escalas (Anzaldúa-Morales, 2005). Para realizar la catación, se elaborará una ficha de cata que consistió en dos puntos principales: un análisis olfativo y

de sabor, en la que se aplique una escala hedónica del 4 al 1, la cual mida el grado de satisfacción del catador en cuanto a aspecto, olor y sabor del producto

Ver Anexo 6. Ficha de catación

Finalmente se desarrollaron tablas que muestran los resultados obtenidos después de la valoración del mismo.

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Es necesario realizar varias tablas y gráficos, los cuales son complementarios a los gráficos, tablas y diagramas que han sido presentados en los capítulos anteriores, los cuales han facilitado interesantes resultados, los cuales permiten poder trabajar en la elaboración de bebidas alcohólicas partiendo del lactosuero, dándole a este producto que comúnmente desechado, un uso práctico. Todos estos recursos visuales permitirán al lector e investigador comprender los datos numéricos que ayudan a entender todo el proceso.

Es así que se encuentran a continuación datos iniciales de las muestras, o aquellos procesuales, así como los terminales de todo lo desarrollado, determinando así valores que pueden ser contrastados para el estudio. De la misma manera, se desarrollan los respectivos comentarios de la autora, quien llegó a varias conclusiones por la información de tipo cuantitativa que se dio de estos procedimientos del trabajo experimental, en función de las fórmulas, de la teoría y de las herramientas y suplementos que fue posible utilizar gracias a los laboratorios de la Universidad del Azuay.

### **3.1. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS DE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICA DEL SUERO DE LECHE**

En primer lugar los datos iniciales, corresponden a las propiedades físico-químicas, datos que fue necesario determinar antes del análisis y experimentación para contrastar estos datos con los del resto del trabajo experimental. Estas lecturas fueron realizadas por triplicado para así obtener resultados de mayor fidelidad, los cuales están basados en un cálculo promedial. En otras palabras, los datos que a continuación se presentan son un promedio de los que fueron anotados al momento de que dio por iniciada la experimentación. De esta manera, se anota en la siguiente tabla:

**Tabla 24. Datos del suero antes del proceso de hidrólisis**

Grados Brix	6,80
pH	5,84
Acidez	0,16

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Se presentan los resultados desarrollados en el diagrama 1, de planificación de trabajo.

Estos son presentados en las siguientes tablas:

**Tabla 25. Porcentaje de hidrólisis alcanzado**

Tiempo	Temperatura	Punto crioscópico inicial °H	Punto crioscópico final °H	Porcentaje de hidrólisis
3 horas	25° C	-0,544	0,780	82,72 %

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

### 3.1.1 Suero hidrolizado durante el proceso de fermentación

A continuación, se presentan las tablas correspondientes a los datos de fermentación tomados con el medidor de CO<sub>2</sub>; presenta los datos observados y anotados que correspondieron al día 0, es decir, el día en que se llevó las muestras al laboratorio para ser examinadas; tabla 26. En cambio la tabla 27 muestra los valores que se obtuvieron durante el proceso de fermentación correspondiente a 7 días.

Tabla 26. Siembra de levaduras en el día 0

Grados Brix	Grados Brix rectificado	Grados GL	Temperatura	pH	Medidor de CO <sub>2</sub>	
					CO <sub>2</sub>	Presión
6	16,2	0	28° C	5,6	0,14 vol	-4,1 psi

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Tabla 27. Proceso de fermentación

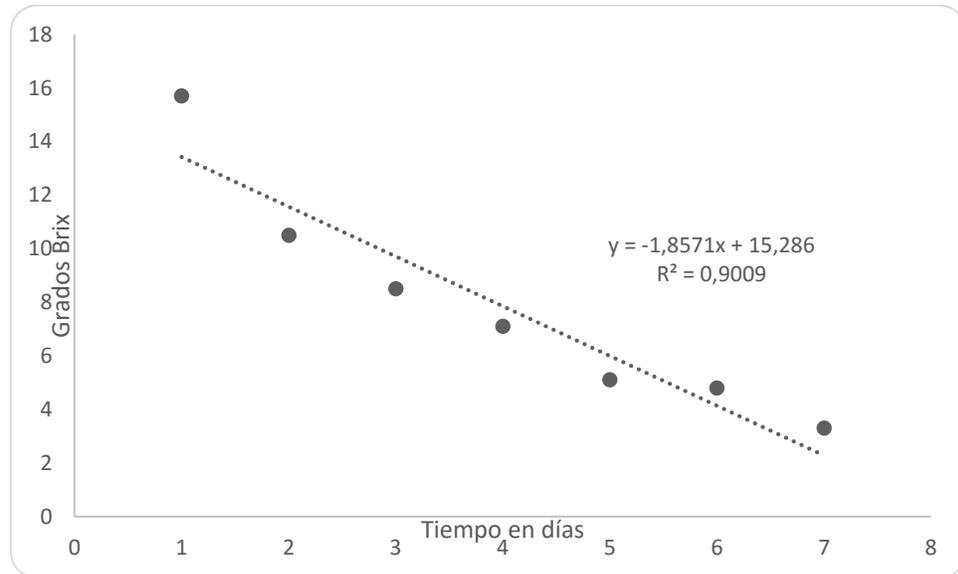
	Grados Brix	Grados GL	Temperatura	pH	Medidor de CO <sub>2</sub>	
					CO <sub>2</sub>	Presión
Día 1: Propagación de levaduras	15,7	2	27° C	5,3	0,38 vol	-4,3 psi
Día 2: Propagación máxima de levaduras	10,5	3,5	27° C	4,8	0,42 vol	-4,6 psi
Día 3: Producción de alcohol	8,5	8	27° C	4,64	0,36 vol	-4,9 psi
Día 4: Producción de alcohol	7,1	9	28° C	3,47	0,28 vol	-5,3 psi
Día 5: Producción de alcohol	5,1	10,5	27° C	3,24	0,21 vol	-5,7 psi
Día 6: Producción de alcohol	4,8	13	27° C	3,1	0,18 vol	-6,0 psi
Día 7: Producción de alcohol	3,3	15	27° C	3,04	0,16 vol	-6,3 psi

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

El gráfico 1, se indica la variación del porcentaje de sólidos solubles, se observa un descenso continuo-rápido hasta el día 5 de la fermentación alcohólica con un valor de 5.1; y a partir de este un descenso lento terminando la fermentación con un valor de 3.8 en el séptimo día.

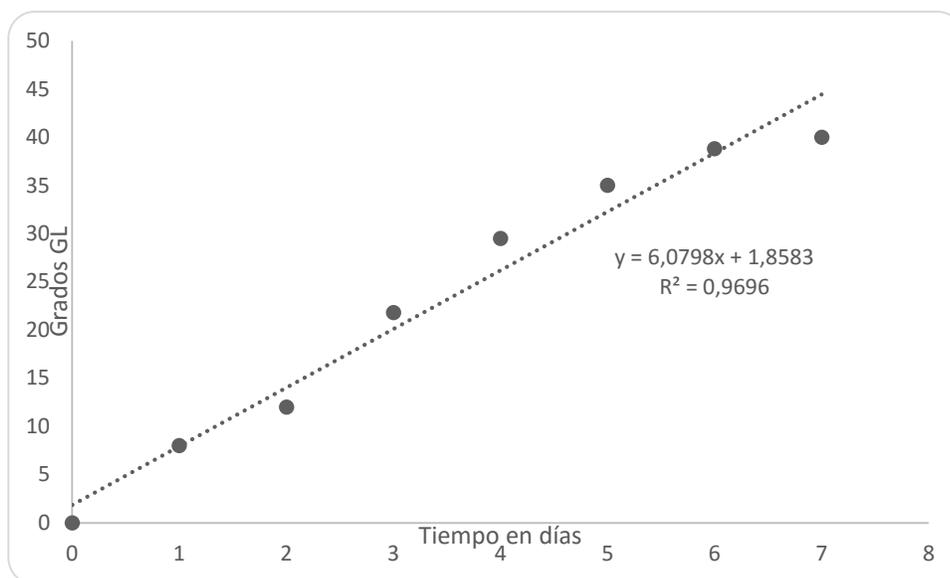
**Gráfico 1. Variación de los °Brix durante la fermentación**



**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Por otra parte, en el gráfico 2 se observan dos resultados del estudio: el incremento del volumen y la producción del alcohol. Conforme pasaron los siete días de la fermentación, se pudo contrastar algunos de estos datos, presentes en el gráfico señalado: por ejemplo, hasta el día 2 no se había notado un incremento significativo de volumen, mientras que ya en el tercer día, las muestras experimentaron un incremento de un 8° G, considerado elevado en comparación de la reacción anterior. Al finalizar la fermentación, esta terminó en unos 15° GL; esto es en el séptimo día.

**Gráfico 2. Desarrollo del grado alcohólico en relación a sus días de fermentación**

**Fuente:** Estudio de laboratorio

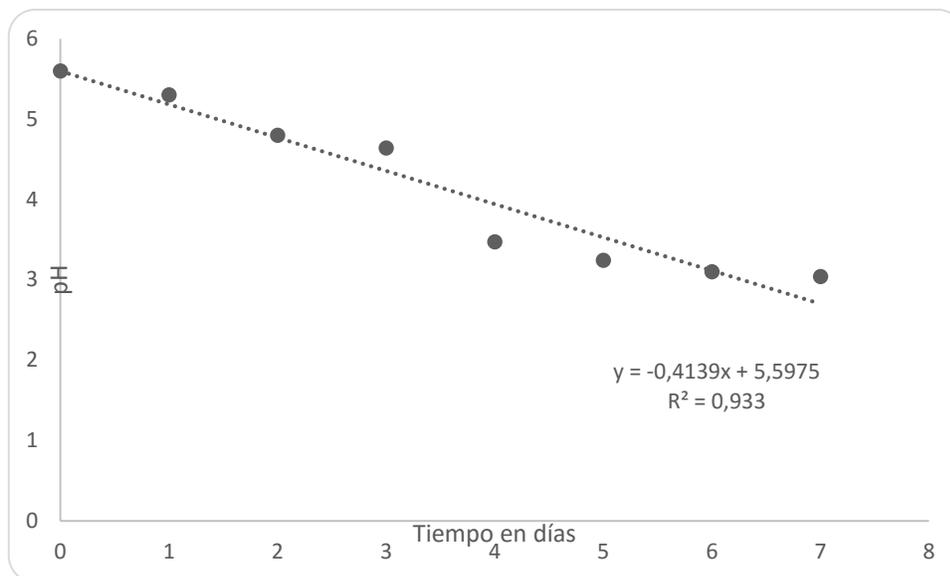
**Elaboración:** Vanessa Chimbo

A continuación, en la tabla 3 se presenta la variación del pH; este gráfico arroja, entre otros, los siguientes datos:

- La variación del pH muestra un descenso hasta el día 2, manteniéndose por 2 días con un valor de 4.
- Continúa bajando hasta el día 4 con un pH final de 3,5.

Esto podría indicar que la acidificación del medio producido por la fermentación que realizan las *Saccharomyces* al producir etanol, ya que es evidente la relación directa entre la producción de este y el descenso en el pH.

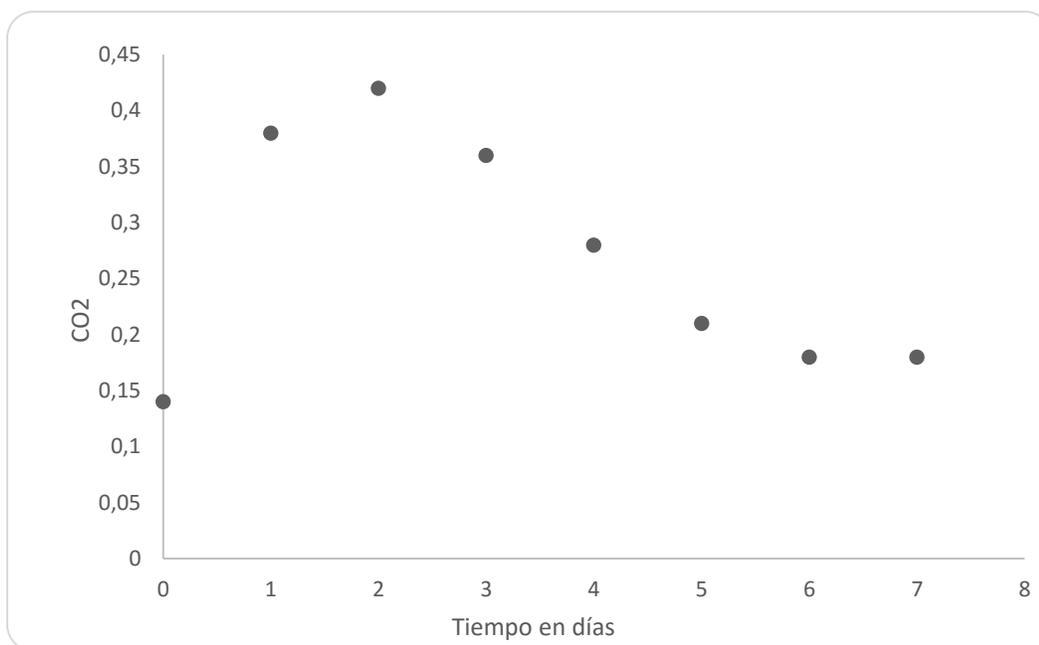
Gráfico 3. Variación del pH



**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Siendo el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) un indicador del proceso de fermentación (cuando la fermentación es proporcional a la rapidez del  $\text{CO}_2$ ), se debió anotar las variaciones de su comportamiento, según lo que se muestra en el gráfico 4. Se puede notar, por ejemplo, que hasta el día 2 del proceso de fermentación se da el incremento más alto y, aunque empiece a descender levemente el volumen, nunca deja de producirse fermento. Esta producción se termina en el día 7, con 0,18 vol de  $\text{CO}_2$ .

**Gráfico 4. Producción de CO<sub>2</sub>**

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

### 3.2. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS DE PORCENTAJES DE LACTOSA INICIAL Y FINAL

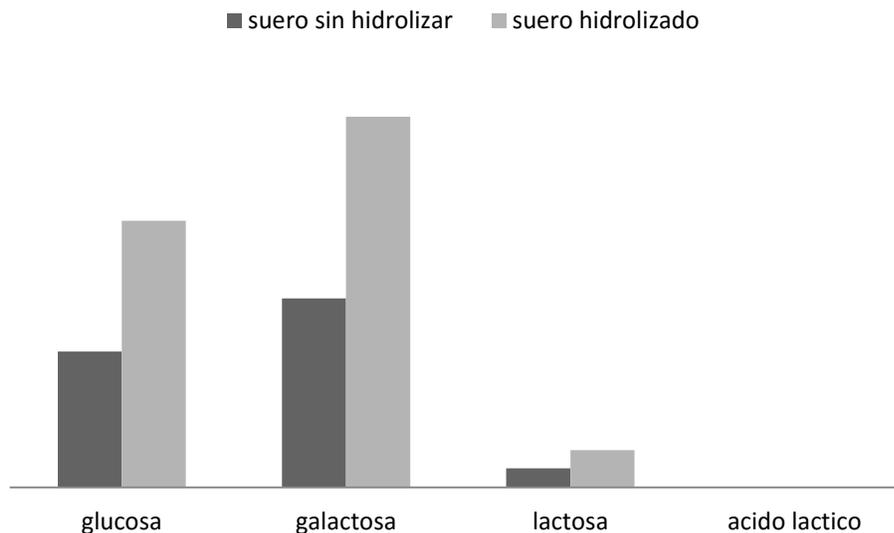
**Tabla 28. Datos de lactosa inicial y final**

Suero sin hidrolizar	Suero hidrolizado
164,45 mg glucosa	322,52mg glucosa
228,58 mg lactosa	448,30mg lactosa
23,022mg galactosa	45,15mg galactosa
0,2418g de ácido láctico	0,4743g ácido láctico

**Fuente:** Estudio de laboratorio

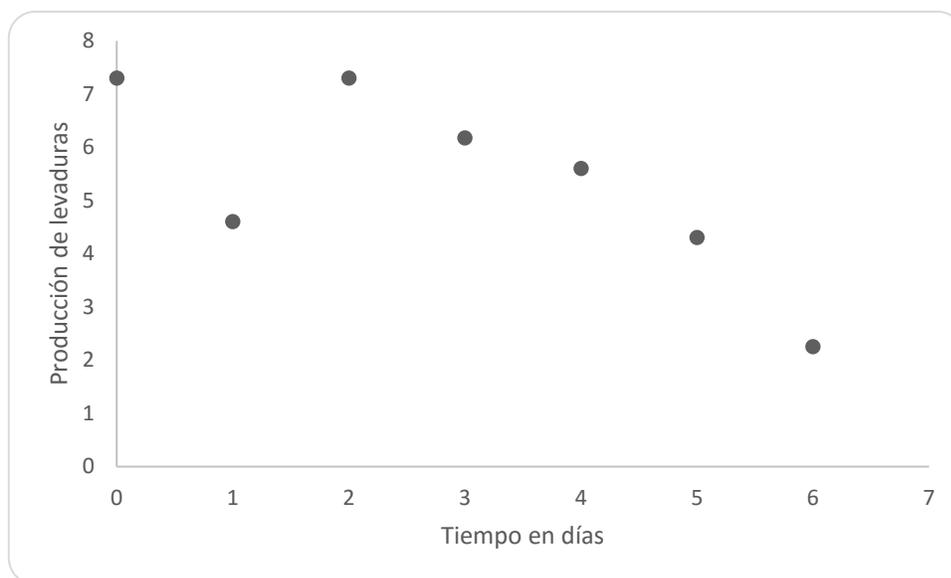
**Elaboración:** Vanessa Chimbo

**Figura 5: Contenido de lactosa inicial, ácido láctico, lactosa y glucosa producida luego del proceso de hidrolisis en el suero dulce**



### **3.3. DESARROLLO Y COMPORTAMIENTO DE LAS LEVADURAS**

En el estudio realizado en el día 0, se determinó la presencia de 7 log de levadura, indicando que hubo un incremento por la rectificación de sustrato. Al cabo de 24 horas, estas experimentan un decrecimiento, llegando hasta 4,5 log de levadura; sin embargo, al día siguiente empieza una etapa de crecimiento que termina al final del día con una etapa estacionaria que dura hasta el cuarto día. Empieza un descenso, llegando a 2 log de levadura.

**Gráfico 5. Comportamiento de las levaduras durante el proceso de fermentación**

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

### 3.4. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS EN CUANTO A LA PUREZA DEL GRADO ALCOHÓLICO

**Tabla 29. Pureza de grado alcohólico**

Experimento	Densidad (kg/l)	Grados GL
1	935,10	40,04
2	969,01	21,00
3	958,80	28,00
4	938,86	39,00
5	976,87	15,00
6	956,69	28,70
8	916,09	49,70
8	948,90	33,80
0	936,84	40,00

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

### 3.5. RESUMEN DE DATOS OBTENIDOS EN CUANTO A CUANTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE ALCOHOL

El rendimiento estequiométrico teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0,165 g de etanol y 0,158 g de dióxido de carbono por 0,32252 g de glucosa.

### 3.6. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE DETERMINACIÓN

Se aplicó un cálculo para la determinación de metanol, furfural, aldehídos, alcoholes superiores y alcohol etílico a través de una fórmula, que se reproduce a continuación:

$$\text{Porcentaje de metanol} = \frac{\text{Área de la muestra}}{\text{Área del Estándar}} * 0,01 \text{ mg/ml} * 100 * 100 \%$$

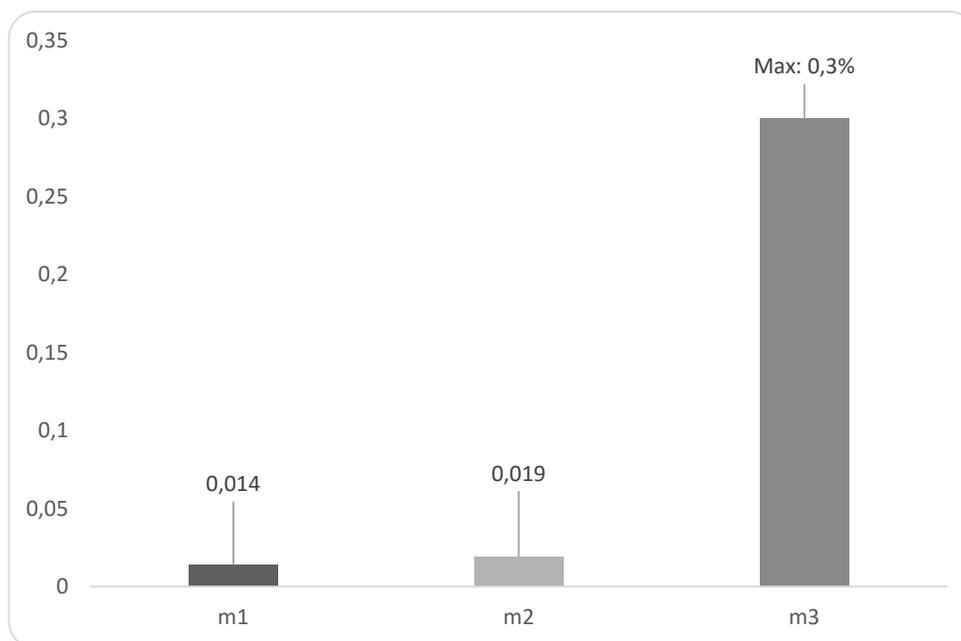
**Gráfico 5. Concentración de metanol**

Muestra	Área de muestra	Área Patrón	Porcentaje de concentración de metanol
M1	0,6002	4241,2543	0,014 % v/v
M2	0,8121	4241,2543	0,019 % v/v

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Las muestras, que presentó un grado superior de metanol fue la muestra 2 (M2), mientras de la muestra 1 (M1) presentó menor grado de metanol en comparación. Aun siendo la más alta de las dos muestras analizadas, ninguna sobrepasó el límite aceptado, el cual determina como mínimo el 0,1 %, y como máximo el 0,2 % (NTE INEN 1837:2011). Estos datos se reproducen en el siguiente gráfico, donde se evidencia el hecho que ni la barra más alto correspondiente a M3, no supera los límites señalados:

**Gráfico 6. Contenido de metanol presente en las muestras**

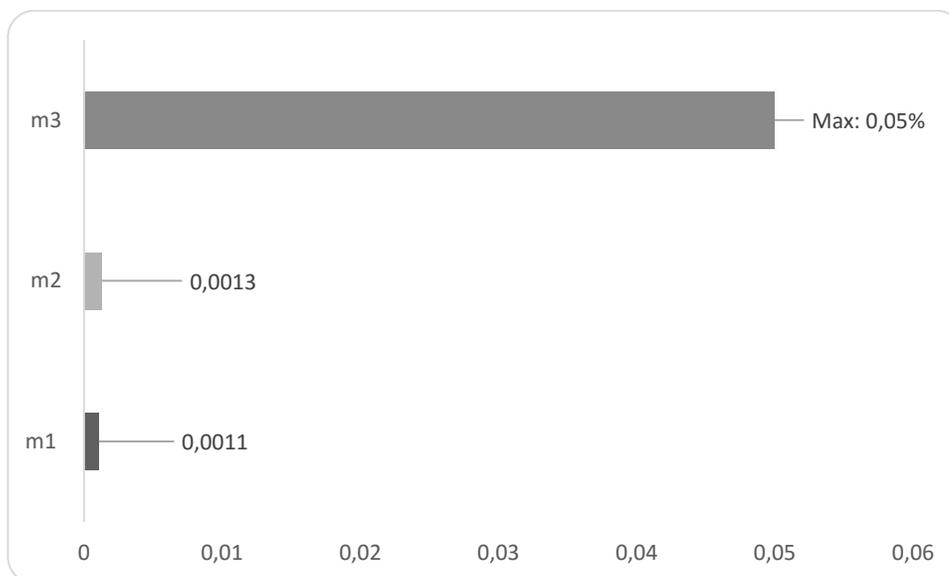
**Fuente:** Estudio de laboratorio  
**Elaboración:** Vanessa Chimbo

En cuanto a la concentración de furfural, en la bebida alcohólica, no presenta ninguna área de muestra razón por la que se considera 0 en cuanto a su concentración cumpliendo con un requisito de 0% según NTE INEN 1837:2015

**Tabla 31. Concentración de aldehídos**

Muestra	Área de muestra	Área Patrón	Porcentaje de concentración de aldehídos
<b>M1</b>	0,5017	43,513,000	0,011 % v/v
<b>M2</b>	0,6039	43,513,000	0,013 % v/v

M1 y M2, presentó una concentración de aldehídos baja, al límite permitido, el cual determina un mínimo de 0% y como máximo 0.05% respecto a NTE INEN 1837:2015. Estos datos se reproducen en el siguiente gráfico, donde M1= 0.011 Y M2 = 0.013 se evidencia la presencia de estos, pero en muy baja cantidad; no supera los límites señalados:

**Gráfico 7. Contenido de aldehídos presente en las muestras**

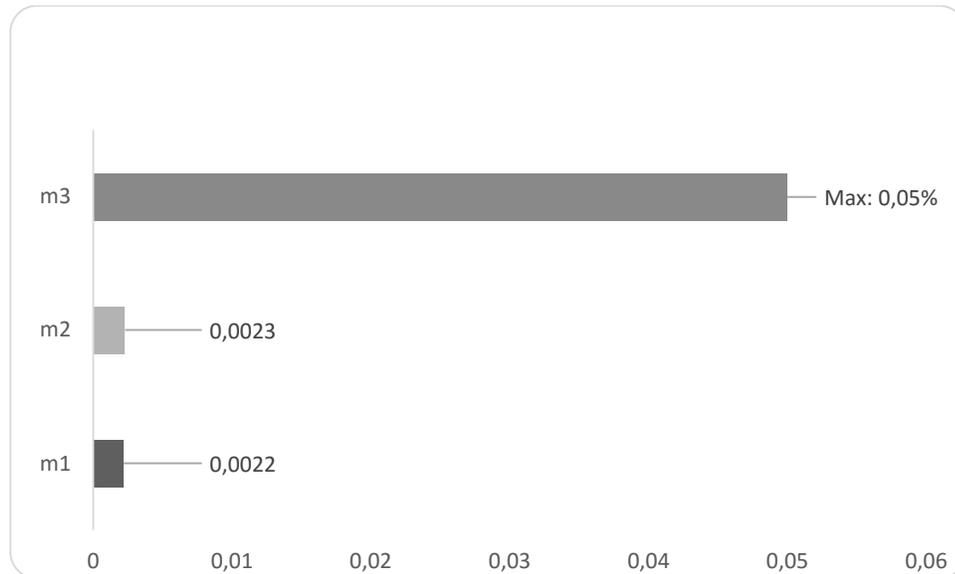
**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

**Tabla 32. Concentración de alcoholes superiores**

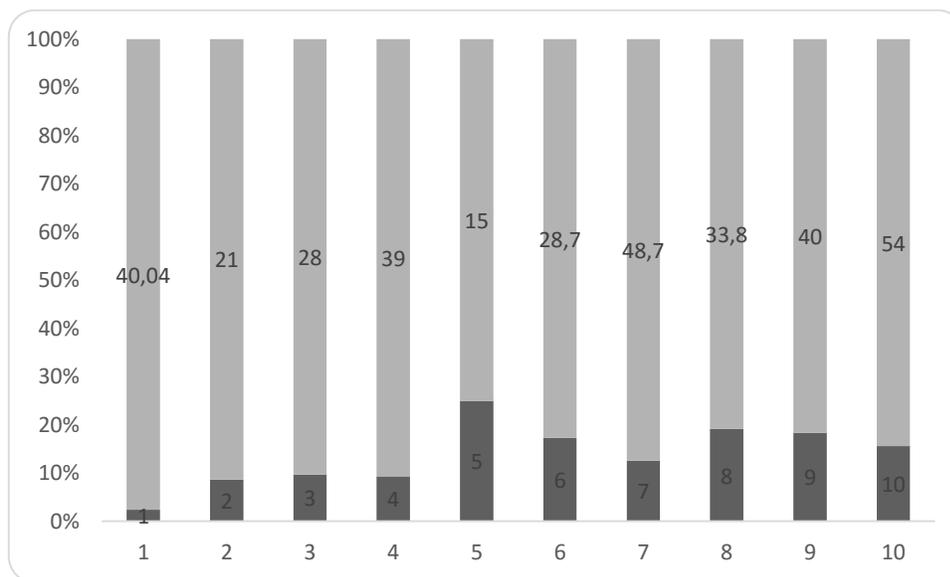
Muestra	Área de muestra	Área Patrón	Porcentaje de concentración de alcoholes superiores
<b>M1</b>	0,8912	40,000,000	0,0022 % v/v
<b>M2</b>	0,9011	40,000,000	0,0023 % v/v

Las muestras, que presentó una concentración superior de alcoholes fue la muestra 2 (M2), mientras de la muestra 1 (M1) presentó menor concentración aun que la diferencia es mínima. Aun siendo la más alta de las dos muestras analizadas, ninguna sobrepasó el límite aceptado, el cual determina como mínimo el 0 %, y como máximo el 0,05 % de acuerdo a la norma 1837:202. Estos datos se verifican en el siguiente gráfico, donde se evidencia el hecho de presencia de estos, pero, no supera los límites:

**Gráfico 8. Contenido de alcoholes superiores presentes en las muestras**

**Fuente:** Estudio de laboratorio  
**Elaboración:** Vanessa Chimbo

Como se indicó anteriormente, tampoco se obtuvo una concentración cuantificada de etanol en ninguna de las muestras que hubiera sobrepasado el límite aceptado de 50 %, respecto a NTE INEN 1837:2011. En el siguiente gráfico, es posible observar en las barras los límites de contenido de etanol, pudiendo observar claramente que están por debajo.

**Gráfico 9. Contenido de etanol presente en las muestras**

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

### **3.7. RESULTADOS DE LAS INTERACCIONES DOBLES Y TRIPLES ENFOCADAS EN EL DISEÑO FACTORIAL**

Luego de haber realizado los estudios ya descritos, se procedió a analizar elementos como el CO<sub>2</sub>, los grados Brix y los grados GL. Como se puede apreciar en la siguiente tabla, que existió un alto porcentaje de alcohol en el experimento número 7, donde se trabajó con menor cantidad de cepa, una cantidad mínima de azúcar y el máximo tiempo obteniendo un porcentaje alto entre estos.

El efecto entre las variables se presenta en la siguiente tabla, donde se determina que existe un efecto negativo en la variable B: si existen mayor cantidad de esta variable, esta puede causar efectos nada deseables para los objetivos del experimento; sin embargo, la variable A aporta con buenos resultados con respecto a C, que es la variable que menos interferencia presenta. En donde: A= azúcar B= cepa de levadura C= tiempo

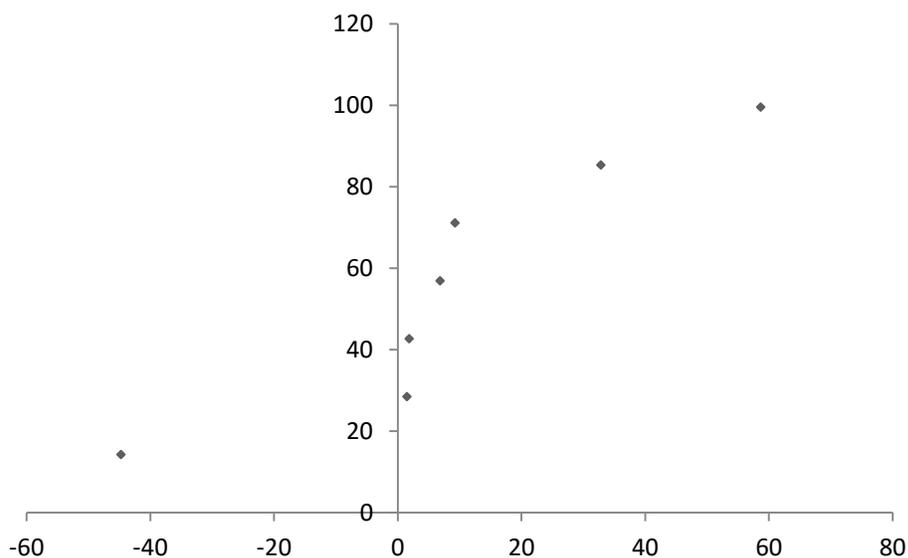
**Tabla 33. Resultado del diseño factorial y su efecto de interés**

	<b>Coefficiente X</b>	<b>Probabilidad Y</b>
B	-44,76	14,21
BC	1,44	28,43
A	1,84	42,64
AC	6,84	56,86
C	9,24	71,07
AB	32,84	85,29
ABC	58,64	99,50

**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

**Gráfico 10. Normal Plot**



**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Elaboración:** Vanessa Chimbo

### 3.8. ELABORACION: SYRUP

#### 3.8.1 Preparación de un jarabe a una densidad deseada

Concentrado de maracuyá

% AT= 4.7

% Brix= 7

Bebida

°Bx= 6.5

% AT= 0.5

Iaaz= 22

#### 3.8.2 Cálculo factor de dilución

Para obtener una concentración de muestra distinta se requiere realizar una dilución de la misma para esto se emplea el factor de dilución, el cual se presenta en la siguiente ecuación. Considerando que de 1 litro de suero se obtiene 120ml de etanol:

✓ Cálculo dilución:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$x(42) = 1.5l(15)$$

$$x = \frac{1.5l(15)}{42}$$

$$X = 0.535 \text{ litros de agua}$$

✓ Volumen total:

$$vol = 1.5l alcohol + 0.535l agua$$

$$vol = 2.035 litros de alcohol diluido$$

### 3.8.3 Cálculos de dilución del jarabe a una densidad y grados alcohólicos requeridos

- ✓ Kd= coeficiente de dilución

$$kd = \frac{acidez1}{acideztotaldeljugo} = \frac{4.75}{0.75} = 6.33$$

$$Kd = 1-x$$

$$Kd = \text{concentrado} + 5.33 \text{ de H}_2\text{O}$$

- ✓ Determinar la cantidad S1 (jugo)

$$S1 = \frac{100}{Kd} = \frac{100}{6.33} = 15.78 \text{ de concentrado de pulpa}$$

$$100\% = 84.20\% \text{ jarabe} + 15.79\% \text{ pulpa}$$

$$Sc = \frac{100 * Kd - 100}{Kd} = \frac{100 * 6.33 - 100}{6.33}$$

$$84.20 \text{ Syrup (jarabe incluido a } \grave{a} \text{cidoyaz} \grave{u} \text{car)}$$

- ✓ Determinar brix del syrup

$$Iaaf = \grave{a} \text{ndicedeacidezfinal}$$

$$^{\circ}\text{Brix}_{\text{delsyrup}} = \frac{I_{\text{aaf}} * A_J - ^{\circ}\text{Brix}_{\text{inicial}}}{Kd - 1} = \frac{22 * 4 - 60}{6.33 - 1} = 5.2^{\circ}\text{Bx}$$

60°Brix      100%

5.2°Brix      X

X = 8.6ml jarabe + 91.4 ml H<sub>2</sub>O + etanol (alcohol diluido)

Relación 8.6 pulpa

91.4 agua + etanol

Volumen total 100ml

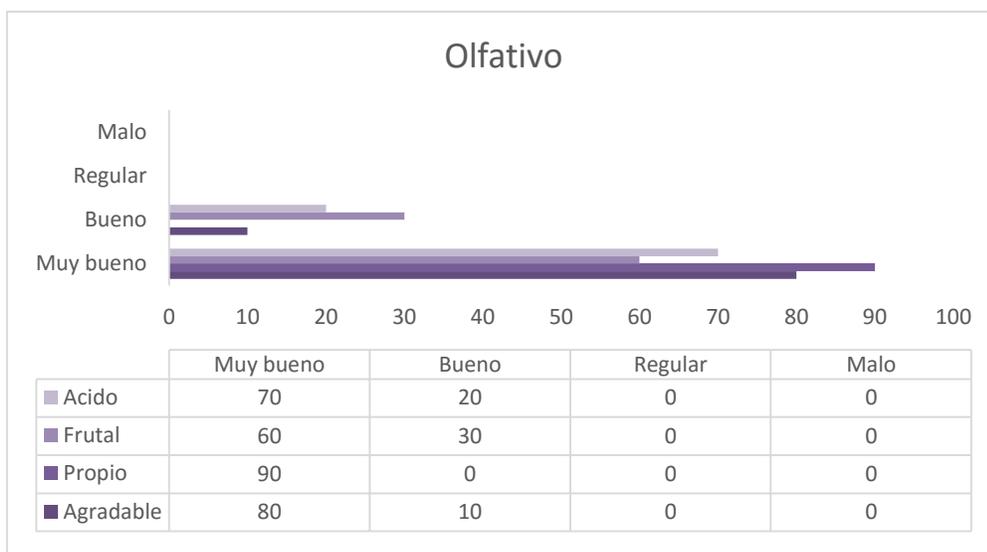
✓ Cantidad de azúcar

$$\frac{100\text{ml}(12 - 6.5)}{100 - 12} = 6.25\text{gazúcar en } 100\text{ml de bebida}$$

### 3.9. ANALISIS DE LA BEBIDA ALCOHOLICA

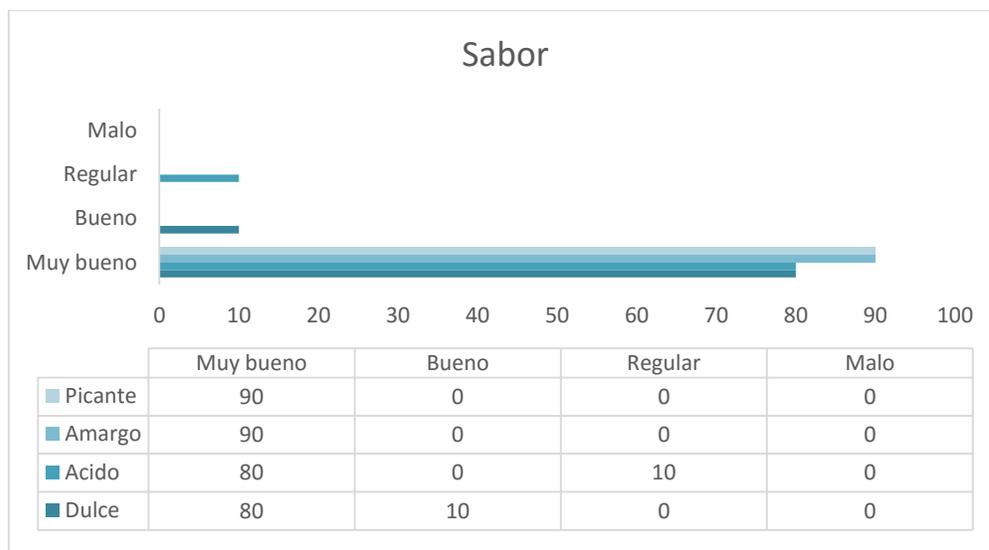
Interpretación de resultado y análisis sensorial: Syrope con maracuyá para bebidas alcohólicas.

**Tabla 34. Resultados, según la ficha de catación en relación al sentido olfativo**



**Fuente:** Estudio de laboratorio

**Tabla 35: Resultados y estadística, según la ficha de catación en relación al sentido del sabor**



**Fuente:** Estudio de laboratorio

Obtenidos los resultados, acorde a las fichas de catación permiten evaluar la aceptación del producto, siendo necesario destacar que la bebida obtuvo una aceptación de un 92 % en un total de personas = 50 que fueron evaluadas; 10 personas por 5 días.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **CONCLUSIONES**

Con el desarrollo de este proyecto, se estableció las condiciones óptimas para la estandarización y producción del proceso de etanol, tomando como variables de estudio: porcentaje de levadura, cantidad de azúcar y tiempo; y que mediante la matriz experimental junto al análisis, en cuanto a sus efectos de interés. Se establece las variables que influyen de manera positiva en el proceso que son: tiempo y cantidad de azúcar.

Con las variables relevantes, del diseño factorial compuesto y en función de deseabilidad se estableció el punto y condiciones óptimas para la producción de etanol, resultando que tanto la menor concentración de azúcar y la menor cantidad de levadura y por el lapso máximo de tiempo son las mejores condiciones de elaboración en cuanto a la obtención de etanol.

La fermentación se realizó con éxito, es decir se llevó a cabo la siembra, propagación de las levaduras en condiciones óptimas, produciéndonos al final un 8% de alcohol, suficiente para dar paso a la destilación, donde se obtuvo 40% de alcohol etílico ya destilado, todo esto está dentro de las condiciones que se plantearon.

Los porcentajes de rendimiento fueron buenos, y el tiempo empleado fue acorde al utilizado a nivel industrial.

Se garantiza, que el etanol obtenido cumplió con los requisitos, en tanto es considerado apto para el consumo humano sin causar daños a la salud para ello se efectuó un análisis cromatográfico que nos permite cuantificar las cantidades de metanol, furfural, alcoholes superiores y aldehídos; con cantidades mínimas y se encuentran dentro de la norma, lo que garantiza también la inocuidad del mismo

Por medio de la técnica GLUCOSE LIQUICOLOR, se lograron determinar en ambas muestras cuantitativa e individualmente la glucosa en suero por medio del Kit, especializado para esta finalidad con la técnica de espectrofotometría, en donde la reacción en la cual la glucosa del suero fue oxidada a ácido glucónico por medio del catalizador contenido en el reactivo R2 del mismo kit que contenía glucosa oxidasa; esta reacción además de obtener como producto al ácido glucónico, se tiene un color rojizo en la solución el cual era proporcional a la concentración de glucosa presente en el suero.

La figura 5, Muestra que el medio hidrolizado tiene mayor disponibilidad inicial de glucosa con 322,52 mg/L en comparación con el suero entero con un valor inicial de 164,45 mg/L, esto debido a la acción de la enzima lactasa (Ha-Lactase), la cual desdobra la lactosa en glucosa y galactosa. En ambos casos se ve disminuida la glucosa. Para el suero entero se puede inferir que a medida que el microorganismo desdobra la lactosa, la convierte de inmediato en ácido cítrico, ya que no se observa una lectura alta de la glucosa para ninguno de los días.

Se puede concluir que las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, es un microorganismo adecuado para la producción de etanol a partir del suero lácteo, observando diferencia entre el suero entero e hidrolizado, es decir que este microorganismo es capaz de sintetizar de forma eficiente la lactosa y tomar la glucosa como fuente de energía para su crecimiento; y así realizar la fermentación para producir alcohol etílico.

La gráfica que muestra el comportamiento en cuanto a las levaduras, se observa cómo se aclimatan, es decir como su presencia es aglomerada y cuantitativa, duran pocas horas y a partir de este se da la competencia del alimento (azúcar), entonces se da un decrecimiento ya que la temperatura afecta directamente el crecimiento de la levadura. A continuación estas se empiezan a reproducir perfectamente debido a temperaturas de hasta 32°C, se da un crecimiento desmedido, En esta etapa casi no se produce etanol, por lo que tampoco se producirán ésteres, ya que los ésteres se empiezan a producir cuando se tiene cantidades considerables de etanol.

A partir del tercer día se observa la suficiente reproducción de levaduras, y con el pasar de los días van a llegar más “cansadas” dando señal de un final de la fermentación; se da paso a la fase de decline en donde no existe desarrollo y se presencia el rompimiento enzimático (lisis).

## **RECOMENDACIONES**

Los resultados obtenidos durante la realización del presente trabajo servirán como base para continuar con una serie de investigaciones de interés actual, diversificando así el uso del suero; evitando la contaminación y dejando de lado el uso de consumo animal. Entre las investigaciones se destacan las siguientes:

- ✓ Aplicación de componentes bioactivos de las proteínas del suero para su aplicación en tratamientos médicos, como es para el control de la hipertensión arterial usos que se han reportado pero que no han sido a la fecha ampliamente estudiados, como es también el control del cáncer
  
- ✓ Se requiere más investigación en el ámbito fisiológico y conocer el beneficio que aportan las proteínas del suero en los productos nutraceuticos que proveen un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abelló Linde, S.A. (2006). *Cromatografía de gases*. Obtenido de Linde Gases Industriales en España:  
[http://www.abellolinde.es/internet.lg.lg.esp/es/images/Cromatograf%C3%ADa%20de%20gases%2019107-01316\\_120150.pdf](http://www.abellolinde.es/internet.lg.lg.esp/es/images/Cromatograf%C3%ADa%20de%20gases%2019107-01316_120150.pdf)
- Annika, M.-M., & Tarja, S. (31 de Julio de 2002). *Patente n° 00972940.1*. España.
- Araujo, K., Romero, A., Chirinos, P., Páez, G., Mármol, Z., & Rincón, M. (2015). Producción de etanol a partir de suero de leche en cultivo por lote alimentado con ciclos repetidos. *Interciencia*, XL(5), 305-310.
- Bustamante Gavilanes, A. C. (2014). *Modelos de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica*. Tesis de Ingeniero en alimentos. Universidad del Azuay. Cuenca Ecuador
- Cahuasquí, L. (2013). *Aprovechador de lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo para el crecimiento de cianobacterias*. Tesis de Ingeniero. Químico Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador
- Chacón Villalobos, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. *Agronomía Mesoamericana*, I(15), 93-106.
- Codex Alimentarius. (2011). *Leche y productos lácteos* (Segunda ed.). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia
- Dirección General de Normas. (1972). *Método de prueba para la determinación de lactosa en leche*. México: Banco de Normas Mexicanas.
- Discovery Salud. (Julio-Agosto de 2001). El suero de leche: aliado de nuestro organismo. *Discovery Salud*(30).
- Ege, S. (2004). *Química orgánica, estructura y reactividad Tomo II*. Barcelona: Reverté.

- Enríquez García, R. (2010). *Proyecto INFOCAB SB 202507*. Obtenido de Plantel 8 "Miguel E. Schulz": <http://prepa8.unam.mx/academia/colegios/quimica/infocab/unidad332.html>
- Ferreira, M. M. (2006). *Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas*. Tesis de Biotecnólogo. Universidad Técnica de Valencia. Valencia, España
- Franchi M., O. (2010). *Suero de leche, propiedades y usos. Innovación en la industria láctea*. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/47261459/Suero-de-leche-propiedades-y-usos#scribd>
- García-Morales, J. L., Álvarez Gallego, C. J., & Paredes Gil, C. (2014). *De residuo a recurso, el camino hacia la sostenibilidad*. Mundi-Prensa. Barcelona, España
- Garibay, G., Ramírez, Q., & Munguía, L. (2004). *Biotecnología alimentaria*. D.F.: Limusa Noriega Editores. Mexico, Mexico
- Garzón Castaño, S. C., & Hernández Londoño, C. (2009). *Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950*. Tesis de Ingeniero Químico. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira Colombia
- González Saltos, J. M. (2011). *Elaboración y evaluación nutricional de una bebida protéica a base de lactosuero y chocho (Lupinus mutabilis) como suplemento alimenticio*. Tesis de Ingeniero en alimentos. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Chimborazo, Ecuador
- Hernández-Rojas, M., & Vélez-Ruiz, J. F. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. En U. d. Américas, *Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos* (págs. 13-22). Tesis de Maestrante. Universidad de las Américas. Puebla, Mexico
- INEN. (2011). *Suero de leche líquido. Requisitos*. Quito: INEN.

- Luna, D. (2012). Estandarización de los parámetros de validación de un método analítico para cuantificar la concentración de metanol en bebidas alcohólicas utilizando la cromatografía de gases. Tesis de Ingeniero en alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador
- Martin, G. E., Burggraff, J. M., Dyer, R. H., & Buscemi, P. C. (1981). Gas-liquid chromatographic determination of congeners in alcoholic products with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64, 186.
- Moya Mora, Á. (1995). *Aprovechamiento de lactosueros por fermentación*. Tesis de Biotecnólogo. Universidad Castilla-La Mancha. Murcia, España
- Napolitano, H. (28 de 02 de 2013). Diseño de experimentos. *Industria y química*, 62-78. Obtenido de Asociación Química Argentina: <http://www.aqa.org.ar/iyq354/6.pdf>
- Ortiz, Á., Reuto, J., Fajardo, É., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., . . . Quevedo-Hidalgo, B. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica "In vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitas Scientiarum*, XIII(2), 138-148.
- Parra Huertas, R. A. (Septiembre de 2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, I(62), 4967-4982.
- Parzanese, M. (2011). *Tecnologías para la industria alimentaria. Procesamiento de lactosuero*. Alimentos Argentinos. Ministerio de Agricultura. Buenos Aires, Argentina
- Pérez, C. (2010). *La levadura Saccharomyces cerevisiae en alimentación animal*. Aplicaciones Biológicas a la Nutrición. Madrid, España
- Poballe S.A. (2011). *Suero de leche*. Recuperado el 14 de Febrero de 2015, de Poballe S.A. Subproductos para la alimentación animal: [http://subproductosalimentacionanimal.com/alimentacionanimal/index.php?id\\_producto=44&controller=product](http://subproductosalimentacionanimal.com/alimentacionanimal/index.php?id_producto=44&controller=product)

- Prieto García, F., Callejas Hernández, J., Reyes Cruz, V. E., & Marmolejo Santillán, Y. (6 de Diciembre de 2012). Electrocoagulación: una alternativa para depuración de lactosuero residual. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, V(3), 51-77.
- Sevilla Chávez, A. (2005). *Suero de leche. La proteína del nuevo milenio*. Colección Nutrición Deportiva. Mexico, Mexico
- Sevilla, A. (2004). *La ciencia de los alimentos*. Harla. Madrid España
- Superintendencia de Industria y Comercio. (Noviembre de 2013). Boletín tecnológico. *Lácteos. Uso del suero de leche en alimentos y sus sustitutos*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia
- Superintendencia de Industria y Comercio. (2013). *Uso del suero de leche en alimentos y sus sustitutos*. Superintendencia de Industria y Comercio, Grupo Banco de Patentes. Superintendencia de Industria y Comercio. Bogotá, Colombia
- Taron Dunover, A., Pérez Mendoza, J., & Martínez Zambrano, J. (Enero-abril de 2012). Obtención de proteína unicelular a partir de lactosuero. *Vitae*, XIX(1), S189-S191.
- Valencia Denicia, E., & Ramírez Castillo, M. L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos*, XVI(73), 27.
- Zumbado Rivera, W. (2005). *Selección de una especie de levadura para la producción de proteína unicelular utilizando como sustrato el suero residual del proceso de elaboración de queso blanco tipo Turrialba*. Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Tesis de tecnólogo de alimentos. Escuela de Tecnología de Alimentos. San José, Costa Rica.

# ANEXOS

**ANEXO 1: SUERO DE LECHE. REQUISITOS NTE INEN 2594:2011**



**INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN**

Quito - Ecuador

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 2594:2011**

---

**SUERO DE LECHE LÍQUIDO. REQUISITOS.**

**Primera Edición**

FLUID WHEY. REQUIREMENTS.

First Edition

---

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, otros productos lácteos, suero de leche líquido, requisitos.  
AL 03.01-448  
CDU: 637.142  
CIIU: 3112  
ICS: 67.100.99

Norma Técnica Ecuatoriana Valores	SUERO DE LECHE LÍQUIDO. REQUISITOS.				NTE INEN 2594:2011 0011_00
<b>6. REQUISITOS</b>					
<b>6.1 Requisitos físicos y químicos</b>					
6.1.1 El suero de leche líquido, ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 1.					
<b>TABLA 1. Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido</b>					
Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min.	Max.	Min.	Máx.	
Lactosa, % (mln)	—	5,0	—	4,3	AOAC 984.15
Proteína láctea, % (mln) <sup>(1)</sup>	0,8	—	0,8	—	NTE INEN 18
Grasa láctea, % (mln)	—	0,3	—	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (mln)	—	0,7	—	0,7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	—	0,15	0,35	—	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41
<sup>(1)</sup> el contenido de proteína láctea es igual a 6,38 por el % nitrógeno total determinado					
6.1.2 <b>Requisitos microbiológicos.</b> El suero de leche líquido ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 2.					
<b>TABLA 2. Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido.</b>					
Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos ufc/g	5	30 000	100 000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de Escherichia coli ufc/g	5	<10	-	0	NTE INEN 1529-8
Staphylococcus aureus ufc/g	5	<100	100	1	NTE INEN 1529-14
Salmonella /25g	5	ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
Detección de Listeria monocytogenes /25 g	5	ausencia	-	0	ISO 11290-1
Donde:					
n = Número de muestras a examinar.					
m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.					
M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.					
c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.					
6.1.3 <b>Aditivos.</b> Se permite el uso de los aditivos enlistados en la NTE INEN 2074.					
6.1.4 <b>Contaminantes.</b> El límite máximo no debe superar lo establecido en el Codex Alimentarius CODEX STAN 193-1995, en su última edición.					
6.2 <b>Requisitos complementarios.</b> El suero de leche líquido debe mantener la cadena de frío en el almacenamiento, y distribución a una temperatura de 4 °C ± 2 °C y su transporte debe ser realizado en condiciones idóneas que garanticen el mantenimiento del producto.					
<b>7. INSPECCIÓN</b>					
7.1 <b>Muestreo.</b> El muestreo debe realizarse de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 4.					
7.2 <b>Aceptación o rechazo.</b> Se acepta el lote si cumple con los requisitos establecidos en esta norma; caso contrario se rechaza.					
7.2.1 El producto rechazado debe identificarse claramente para evitar el mal uso.					
(Continúa)					

## APENDICE Z

### Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 4	<i>Leche y productos lácteos. Muestra</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 12	<i>Leche. Determinación del contenido de grasa.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 13	<i>Leche. Determinación de la acidez titulable.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 14	<i>Leche. Determinación de sólidos totales y cenizas.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 16	<i>Leche. Determinación de proteínas.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-5	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de microorganismos aerobios mesofílicos REP.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-8	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y escherichia coli</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-14	<i>Control microbiológico de los alimentos. Staphylococcus aureus. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15	<i>Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2074	<i>Aditivos alimentarios permitidos para consumo humano. Listas positivas. Requisitos.</i>
CACMRL 1	<i>Lista de límites máximo para residuos de plaguicidas</i>
CACMRL 2 (rev. 2008)	<i>Lista de Límites Máximos para Residuos de Medicamentos Veterinarios Programa conjunto FAO/OMS</i>
CXS 193-195 (Enm. 2009)	<i>Norma general del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos</i>
Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura para alimentos procesados. Decreto Ejecutivo 3253, Registro Oficial 696 de 4 de Noviembre del 2002.	
AOAC Official Method 984.15	<i>Lactose in milk. Enzymatic method. Final action. 18 Edc.</i>
AOAC Official Method 973.41	<i>pH of water. 18 Edc.</i>
ISO 11290-1:1996	<i>Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 2: Enumeration method</i>

### Z.2 BASES DE ESTUDIO

CFR Code of Federal Regulations Title 21, chapter I, subchapter B, part 184 Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe, subpart B, page 118, Sec. 184.1979 Whey.

U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, GRADE "A" Pasteurized Milk Ordinance, 2009 Revision.

República de Colombia. Ministerio de la Protección Social. *Resolución No. 2997 del 29 de agosto del 2007. Modificado por Resolución 1031 de 2010 del 19 de marzo del 2010*

CODEX STAN 289-1995(Rev. 2003, Enm. 2006). NORMA DEL CODEX PARA SUEROS EN POLVO

## ANEXO 2: FICHA TECNICA AGAR SABOURAD



REF B0215005 REF B0215006

# Sabouraud Glucosado Agar

IVD

**USO**

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

**FUNDAMENTO**

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (pie, pelo).

En el medio de cultivo, la peptona, la triptina y la glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras. El agar es el agente solidificante.

Puede ser suplementado con otros agentes selectivos de crecimiento.

**CONTENIDO Y COMPOSICIÓN**

Código B0215005: envase x 100 g.

Código B0215006: envase x 500 g.

**FÓRMULA (en gramos por litro)**

PEPTONA.....	5.0
TRIPTINA.....	5.0
GLUCOSA.....	40.0
CLORANFENICOL.....	0.06
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 5.6 ± 0.2	

**INSTRUCCIONES**

Suspender 65 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver completamente.

Distribuir en tubos o en otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 118-121 °C durante 15 minutos.

Colocar los tubos en posición inclinada para solidificar el medio de cultivo (pico de flauta). También puede distribuirse en placas de Petri estériles.

**Nota:** mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor aumenta la hidrólisis de los componentes.

**CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO**

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre de sedimentación.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro, ligramiento opalescente sin precipitado.

**ALMACENAMIENTO**

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

**PROCEDIMIENTO****Siembra**

Estriar directamente la superficie del medio de cultivo.

**Incubación**

En aerobiosis a 20-25 °C.

El tiempo dependerá del hongo y levadura que se quiera recuperar. Como regla general, incubar en las condiciones descriptas durante 2 a 7 días. En el caso de investigar dermatofitos, incubar durante 5 a 20 días y examinar el cultivo cada 4 a 6 días.

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Describir las características típicas de las colonias y subcultivar en medios apropiados para identificación.

**CONTROL DE CALIDAD**

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Satisfactorio
<i>Candida albicans</i> ATCC 10251	Satisfactorio
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9633	Satisfactorio
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Satisfactorio

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

## ANEXO 3: DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA

### GLUCOSE liquicolor

#### Método GOD-PAP

#### Prueba enzimática colorimétrica por glucosa

##### Presentación del estuche

<b>REF</b>	10260	4 x 100 ml	Estuche completo
	10121	1000 ml	Estuche completo
	10123	9 x 3 ml	Estándar

##### LEY

##### Método<sup>1</sup>

La glucosa se determina después de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la catálisis de peroxidasa con fenol y **6-aminoantipirina** formando un complejo rojo-violeta usando la quinonemina como indicador.

##### Principio de la reacción



##### Contenidos

<b>REF</b>	10260	10121	10123
<b>LEY</b>	4 x 100 ml	1 x 1000 ml	
<b>LEY</b>	1 x 3 ml	1 x 3 ml	9 x 3 ml
<b>LEY</b>	<b>Reactivo enzimático</b>		
	Buffer fosfato (pH 7,5)		100 mmol/l
	<b>6-aminoantipirina</b>		0,25 mmol/l
	Fenol		0,75 mmol/l
	Glucosa oxidasa		≥ 15 KU/l
	Peroxidasa		≥ 1,5 KU/l
	Mutarrotasa		≥ 2,0 KU/l
	Azida de Sodio		0,095 %
<b>LEY</b>	<b>Patrón</b>		
	Glucosa		100 mg/dl ó 5,55 mmol/l

##### Preparación de los reactivos

**REF** y **LEY** están listos para uso.

##### Estabilidad de los reactivos

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad, aún después de abrir, cuando se almacenan de 2...8°C.

Después de abiertos evite la contaminación. **REF** es estable por 2 semanas de 15...25°C.

##### Muestras

Plasma, suero.

La glucosa es estable por 24 horas de 2...8°C, si el suero o plasma es separado dentro de 30 minutos después de la toma de la muestra de sangre.

##### Ensayo

Longitud de onda: 500 nm, Hg 546 nm.

Paso de luz: 1 cm

Temperatura: 20...25°C ó 37°C

Medición: Frente a un blanco de reactivo. Se requiere un blanco de reactivo por serie.

++++ Nuevo **CE** ++++ Lea cuidadosamente el texto **resultado** ++++

##### Esquema de pipeteo

Pipeteo en las cubetas	Macro		Semi-micro	
	<b>LEY</b> o Muestra	Blanco de reactivo	<b>LEY</b> o Muestra	Blanco de reactivo
<b>LEY</b> o Muestra	20 µl	---	20 µl	---
<b>REF</b>	2000 µl	2000 µl	1000 µl	1000 µl

Mezcle, incube por 10 minutos de 20...25°C ó 5 minutos a 37°C. Mida la absorbancia del **LEY** y las muestras frente a un blanco de reactivo antes de 60 minutos (AA).

##### Cálculo de la concentración de glucosa

$$c = 100 \times \frac{AA_{\text{muestra}}}{AA_{\text{ref}}} \quad [\text{mg/dl}]$$

$$c = 5,55 \times \frac{AA_{\text{muestra}}}{AA_{\text{ref}}} \quad [\text{mmol/l}]$$

##### Características de la prueba

###### Linealidad

La prueba es lineal hasta una concentración de glucosa de 400 mg/dl ó 22,2 mmol/l. Si la concentración de glucosa en la muestra es superior a estos límites diluya la muestra 1+2 con agua destilada y repita la determinación. Multiplique el resultado por 3.

Las características de ejecución de la prueba pueden consultarse en el informe de verificación, accesible via

[www.human.de/data/gb/vr/vu-gliq.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/vu-gliq.pdf) ó

[www.human-de.com/data/gb/vr/vu-gliq.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/vu-gliq.pdf)

###### Valores normales<sup>2</sup>

Suero, plasma (en ayunas): 75-115 mg/dl ó 4,2-6,2 mmol/l

###### Control de calidad

Pueden ser empleados todos los sueros con valores de glucosa determinados por este método.

Nosotros recomendamos el uso de nuestro suero de origen animal HUMATROL ó nuestro suero de origen Humano SERODOS como control de calidad.

###### Automatización

Proposiciones para la aplicación de los reactivos sobre analizadores están disponibles sobre demanda. Cada laboratorio tiene que validar la aplicación en su propia responsabilidad.

###### Notas

- REF** contienen azida de sodio (0,095%). No ingerirlo. Evitar el contacto con la piel y membranas mucosas.
- Sueros ictericos interfieren en la prueba y no pueden ser usados como muestras. Los triglicéridos hasta 2500 mg/dl, la hemoglobina hasta 500 mg/dl y el ácido ascórbico hasta 20 mg/dl no interfieren en la prueba.
- Un ligero sedimento marroncillo puede formarse durante el almacenamiento de **REF** que no tiene ninguna influencia en la funcionalidad del **REF**. No arremoline este sedimento durante el pipeteado.

###### Literatura

- Barham D., and Trinder P., Analyst **97** (1972)
- Teuscher A., and Richterich P., Schweiz med. Wchz. **101**, 345 y 390 (1971)

SIU-GLIGL INF 1026003 9

DE-0004-04M



10.04.000.0

.com

**Human**

Human Gesellschaft für Biochemie und Diagnostica mbH  
 Max-Planck-Str. 22 • 65203 Wiesbaden • Germany  
 Telefon +49 6221-9989-0 • Telefax +49 6221-9989-100 • e-Mail human@human.de

## ANEXO 4: PROPIEDADES DE LAS SOLUCIONES ACUOSAS DE ETANOL

% wt ethanol	% vol ethanol	grams ethanol per 100 cc 15.56 °C	d 10 °C/4 °C	d 20 °C/4 °C	d 25 °C/4 °C	d 30 °C/4 °C	d 20 °C/20 °C	d 25 °C/25 °C	freezing temp.
0.0	0.0	0.0	0.99973	0.99823	0.99708	0.99568	1.00000	1.00000	0 °C
1.0			0.99785	0.99636	0.99520	0.99379	0.99813	0.99811	
2.0			0.99602	0.99453	0.99336	0.99194	0.99629	0.99627	
2.5	3.13			0.99363					-1 °C
3.0			0.99426	0.99275	0.99157	0.99014	0.99451	0.99447	
4.0	5.00	3.97	0.99258	0.99103	0.98984	0.98839	0.99279	0.99274	
4.8	6.00	4.76		0.98971					-2 °C
5.0			0.99098	0.98938	0.98817	0.98670	0.99113	0.99106	
5.05	6.30	5.00		0.98930					
6.0			0.98946	0.98780	0.98656	0.98507	0.98955	0.98945	
6.8	8.47			0.98658					-3 °C
7.0			0.98801	0.98627	0.98500	0.98347	0.98802	0.98788	
8.0			0.98660	0.98478	0.98346	0.98189	0.98653	0.98634	
9.0			0.98524	0.98331	0.98193	0.98031	0.98505	0.98481	
10.0	12.40	9.84	0.98393	0.98187	0.98043	0.97575	0.98361	0.98330	

11.0			0.98267	0.98047	0.97897	0.97723	0.98221	0.98184	
11.3	14.0	11.11		0.98006					-5 °C
12.0			0.98145	0.97910	0.97753	0.97573	0.98084	0.98039	
13.0			0.98026	0.97775	0.97611	0.97424	0.97948	0.97897	
13.78	17.00	13.49							-6.1 °C
14.0			0.97911	0.97643	0.97472	0.97278	0.97816	0.97757	
15.0			0.97800	0.97514	0.97334	0.97133	0.97687	0.97619	
15.02	18.50	14.68		0.97511					
16.0			0.97692	0.97387	0.97199	0.96990	0.97560	0.97484	
16.4	20.2			0.97336					-7.5 °C
17.0			0.97583	0.97259	0.97062	0.96844	0.97431	0.97346	
17.5	21.5			0.97194					-8.7 °C
18.0	22.10	17.54	0.97473	0.97129	0.96923	0.96697	0.97301	0.97207	
18.8	23.1			0.97024					-9.4 °C
19.0			0.97363	0.96997	0.96782	0.96547	0.97169	0.97065	
20.0			0.97252	0.96864	0.96639	0.96395	0.97036	0.96922	
20.01	24.50	19.44		0.96863					
20.3	24.8			0.96823					-10.6 °C
21.0			0.97139	0.96729	0.96495	0.96242	0.96901	0.96778	

22.0			0.97024	0.96592	0.96348	0.96087	0.96763	0.96630	
22.11	27.00	21.43		0.96578					-12.2 °C
23.0			0.96907	0.96453	0.96199	0.95929	0.96624	0.96481	
24.0			0.96787	0.96312	0.96048	0.95769	0.96483	0.96329	
24.2	29.5			0.96283					-14.0 °C
25.0	30.40	24.12	0.96665	0.96168	0.95895	0.95607	0.96339	0.96176	
26.0			0.96539	0.96020	0.95738	0.95422	0.96190	0.96018	
26.7	32.4			0.95914					-16.0 °C
27.0			0.96406	0.95867	0.95576	0.95272	0.96037	0.95856	
28.0	33.90	26.90	0.96268	0.95710	0.95410	0.95098	0.95880	0.95689	
29.0			0.96125	0.95548	0.95241	0.94922	0.95717	0.95520	
29.9	36.1			0.95400					-18.9 °C
30.0	36.20	28.73	0.95977	0.95382	0.95067	0.94741	0.95551	0.95345	
31.0			0.95823	0.95212	0.94890	0.94557	0.95381	0.95168	
32.0			0.95665	0.95038	0.94709	0.94370	0.95207	0.94986	
33.0			0.95502	0.94860	0.94525	0.94180	0.95028	0.94802	
33.8	40.5			0.94715					-23.6 °C
34.0			0.95334	0.94679	0.94337	0.93986	0.94847	0.94613	
35.0			0.95162	0.94494	0.94146	0.93790	0.94662	0.94422	
35.04	41.90	33.25		0.94486					

36.0			0.94986	0.94306	0.93952	0.93591	0.94473	0.94227	
37.0			0.94805	0.94114	0.93756	0.93390	0.94281	0.94031	
38.0			0.94620	0.93919	0.93556	0.93186	0.94086	0.93830	
39.0	46.3		0.94431	0.93720	0.93353	0.92979	0.93886	0.93626	-28.7 °C
40.0			0.94238	0.93518	0.93148	0.92770	0.93684	0.93421	
40.04	47.40	37.61		0.93510					
41.0			0.94042	0.93314	0.92940	0.92558	0.93479	0.93212	
42.0			0.93842	0.93107	0.92729	0.92344	0.93272	0.93001	
43.0			0.93639	0.92897	0.92516	0.92128	0.93062	0.92787	
44.0			0.93433	0.92685	0.92301	0.91910	0.92849	0.92571	
45.0			0.93226	0.92472	0.92085	0.91692	0.92636	0.92355	
45.31	53.00	42.07		0.92406					
46.0			0.93017	0.92257	0.91868	0.91472	0.92421	0.92137	
46.3	53.8			0.92193					-33.9 °C
47.0			0.92806	0.92041	0.91649	0.91250	0.92204	0.91917	
48.0			0.92593	0.91823	0.91429	0.91028	0.91986	0.91697	
49.0			0.92379	0.91604	0.91208	0.90805	0.91766	0.91475	
50.0			0.92162	0.91384	0.90985	0.90580	0.91546	0.91251	
50.16	58.0	46.04		0.91349					

51.0			0.91943	0.91160	0.90760	0.90353	0.91322	0.91026	
52.0			0.91723	0.90936	0.90524	0.90125	0.91097	0.90799	
53.0			0.91502	0.90711	0.90307	0.89896	0.90872	0.90571	
54.0			0.91279	0.90485	0.90079	0.89667	0.90645	0.90343	
55.0			0.91055	0.90258	0.89850	0.89437	0.90418	0.90113	
55.16	63.0	50.00		0.90220					
56.0			0.90831	0.90031	0.89621	0.89206	0.90191	0.89833	
56.1	63.6			0.90008					-41.0 °C
57.0			0.90607	0.89803	0.89392	0.88975	0.89962	0.89654	
58.0			0.90381	0.89574	0.89162	0.88744	0.89733	0.89423	
59.0			0.90154	0.89344	0.88931	0.88512	0.89502	0.89191	
60.0			0.89927	0.89113	0.88699	0.88278	0.89271	0.88959	
60.33	68.0	53.98		0.89038					
61.0			0.89898	0.88882	0.88466	0.88044	0.89040	0.88725	
62.0			0.89468	0.88650	0.88233	0.87809	0.88807	0.88491	
63.0			0.89237	0.88417	0.87998	0.87574	0.88574	0.88256	
64.0			0.89006	0.88183	0.87763	0.87337	0.88339	0.88020	
65.0			0.88774	0.87948	0.87527	0.87100	0.88104	0.87783	
66.0			0.88541	0.87713	0.87291	0.86863	0.87869	0.87547	
67.0			0.88308	0.87477	0.87054	0.86625	0.87632	0.87309	
68.0			0.88071	0.87241	0.86817	0.86387	0.87396	0.87071	
69.0			0.87839	0.87004	0.86579	0.86148	0.87158	0.86833	
70.0			0.87602	0.86766	0.86340	0.85908	0.86920	0.86593	
71.0			0.87365	0.86527	0.86100	0.85667	0.86680	0.86352	
71.9	78.3			0.86311					-51.3 °C
72.0			0.87127	0.86287	0.85859	0.85426	0.86440	0.86110	
73.0			0.86888	0.86047	0.85618	0.85184	0.86200	0.85869	
74.0			0.86648	0.85806	0.85376	0.84941	0.85958	0.85626	
75.0			0.86408	0.85564	0.85135	0.84698	0.85716	0.85383	
76.0			0.86168	0.85322	0.84891	0.84455	0.85473	0.85140	
77.0			0.85927	0.85079	0.84647	0.84211	0.85230	0.84895	
78.0			0.85685	0.84835	0.84403	0.83966	0.84985	0.84650	
79.0			0.85422	0.84590	0.84158	0.83720	0.84740	0.84404	
80.0			0.85197	0.84344	0.83911	0.83473	0.84494	0.84157	
81.0			0.84950	0.84096	0.83664	0.83224	0.84245	0.83909	
82.0			0.84702	0.83848	0.83415	0.82974	0.83997	0.83659	
83.0			0.84453	0.83599	0.83164	0.82724	0.83747	0.83408	
84.0			0.84203	0.83348	0.82913	0.82473	0.83496	0.83156	
85.0			0.83951	0.83095	0.82660	0.82220	0.83242	0.82902	

85.0			0.83951	0.83095	0.82660	0.82220	0.83242	0.82902	
86.0			0.83697	0.82840	0.82405	0.81965	0.82987	0.82646	
87.0			0.83441	0.82554	0.82148	0.81708	0.82729	0.82389	
88.0			0.83181	0.82323	0.81888	0.81448	0.82469	0.82128	
89.0			0.82919	0.82062	0.81626	0.81186	0.82207	0.81865	
90.0			0.82654	0.81797	0.81362	0.80922	0.81942	0.81600	
91.00	94.00	74.62	0.82386	0.81529	0.81094	0.80655	0.81674	0.81331	
92.0			0.82114	0.81257	0.80823	0.80384	0.81401	0.81060	
93.0			0.81839	0.80983	0.80549	0.80111	0.81127	0.80785	
94.0			0.81561	0.80705	0.80272	0.79835	0.80848	0.80507	
95.0			0.81278	0.80424	0.79991	0.79555	0.80567	0.80225	
96.0			0.80991	0.80138	0.79706	0.79271	0.80280	0.79939	
97.0			0.80698	0.79846	0.79415	0.78981	0.79988	0.79648	
98.0			0.80399	0.79547	0.79117	0.78684	0.79688	0.79349	
99.0			0.80094	0.79243	0.78814	0.78382	0.79383	0.79045	
100.0	100.0	79.39	0.79784	0.78934	0.78506	0.78075	0.79074	0.78736	-114.3 °C
% wt ethanol	% vol ethanol	grams ethanol per 100 cc 15.56 °C	d 10 °C/4 °C	d 20 °C/4 °C	d 25 °C/4 °C	d 30 °C/4 °C	d 20 °C/20 °C	d 25 °C/25 °C	freezing temp.

**ANEXO 5: NORMA TECNICA INEN 1837:2015 SOBRE BEBIDAS ALCOHOLICAS (LIMITE MAXIMO DEL CONTENIDO DE ETANOL METANOL, FURFURAL, ALDEHIDOS Y ALCOHOLES SUPERIORES)**



Quito – Ecuador

**NORMA  
TÉCNICA  
ECUATORIANA**

**NTE INEN 1837**  
Segunda revisión  
2015-XX

**BEBIDAS ALCOHÓLICAS. LICORES. REQUISITOS**

**ALCOHOLIC BEVERAGES. LIQUORS. REQUIREMENTS**

DESCRIPTORES: Bebidas alcohólicas, licores, licores de frutas, requisitos  
ICS: 67.120.10

6  
Páginas

## 5. REQUISITOS

5.1 Pueden ser transparentes o coloreados de acuerdo a las características de sus ingredientes.

5.2 Deben tener las características organolépticas propias de sus componentes.

5.3 Los licores deben cumplir con los requisitos establecidos en la tabla 1.

**TABLA 1. Requisitos de los licores**

REQUISITOS	UNIDAD	A		B		C		METODO DE ENSAYO
		Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	
Grado alcohólico a 15°C	GL	15	45	15	45	15	45	INEN 340
Acidez total, como ácido acético *		-	1,5	-	15	-	40	INEN 341
Esteres, como acetato de etilo	*	-	2,0	-	5	-	30	INEN 342
Aldehídos, como etanal	*	-	0,5	-	2	-	10	INEN 343
Furfural	*	-	0	-	0,5	-	1,0	INEN 344
Alcoholes superiores	*	-	0,5	-	5	-	150	INEN 345
Metanol	*	-	2	-	6	-	10	INEN 347

A Licores fabricados en base de alcohol etílico rectificado extra neutro, INEN 1 675.

B Licores fabricados en base de alcohol etílico rectificado, INEN 375

C Licores fabricados en base de aguardiente de caña rectificado, INEN 362

\* mg/100 cm<sup>3</sup>

## 6. INSPECCION

6.1 El muestreo debe realizarse de acuerdo a la Norma INEN 339.

6.2 En la muestra extraída se efectuarán los ensayos indicados en el numeral 5 de esta norma.

6.3 Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos establecidos en el numeral 5 de esta norma, se extraerá una nueva muestra, se repetirán los ensayos.

6.4 Si alguno de los ensayos repetidos no cumpliera con los requisitos establecidos, se rechazará el lote correspondiente.

## **7. ENVASADO Y ROTULADO**

### **7.1 Envasado**

**7.1.1** Los licores deben envasarse en botellas de vidrio o de cerámica, de forma, color, dimensiones y capacidad, que se establecerán en las normas correspondientes.

**7.1.2** Los envases deben estar perfectamente limpios antes del llenado.

**7.1.3** Los envases deben disponer de un adecuado cierre o tapa y sellado, de manera que se garantice la inviolabilidad del recipiente y las características del producto.

**7.1.4** El espacio libre debe estar comprendido entre el 2 y 5% del volumen del envase comercial (ver INEN 359).

### **7.2 Rotulado**

**7.2.1** En todos los envases deben constar, con caracteres legibles e indelebles, las indicaciones siguientes:

- a) razón social de la empresa,
- b) denominación del producto: Licor...
- c) contenido neto, en centímetros cúbicos o litros
- d) grado alcohólico del producto
- e) norma INEN de referencia,
- f) lista de ingredientes,
- g) número de Registro Sanitario,
- h) número del lote y fecha de fabricación,
- i) leyenda Industria ecuatoriana,
- j) dirección del fabricante, ciudad y país,
- k) las demás especificaciones exigidas por ley.

**7.2.2** No deben tener leyendas de significado ambiguo ni descripción de las características del producto que no pueda comprobarse debidamente.

**7.3** La comercialización de este producto cumplirá con lo dispuesto en las Regulaciones y Resoluciones dictadas con sujeción a la Ley de Pesas y Medidas.

## ANEXO 6: FICHA DE CATAACION

UNIVERSIDAD DEL AZUAY  
 FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
 INGENIERIA EN ALIMENTOS

Sr / Sra consumidor

La presente es una ficha de cataacion dirigida para la evaluacion sensorial de una nueva bebida alcoholica, razon por la que sus respuesta acompañada de su sinceridad; sera de gran utilidad.

¿Bebe alcohol actualmente?

SI  NO

Marque con una X la calificacion de acuerdo a su criterio. Los valores a considerar son los siguientes:

4- Muy Bueno      3- Bueno      2- Regular      1 – Malo

### OLFATIVO

OLOR	Calificación			
	4	3	2	1
Agradable				
Propio				
Frutal				
Acido				
Otro (especifique)				

### SABOR

SABOR	Calificación			
	4	3	2	1
Dulce				
Acido				
Amargo				
Picante				
Otro (especifique)				

Observaciones: .....

## ANEXO 7: IMÁGENES

Pasteurización: Suero dulce



Filtración al frío



Hidrólisis



Incubación



Preparación Agar Sabourad - Autoclave



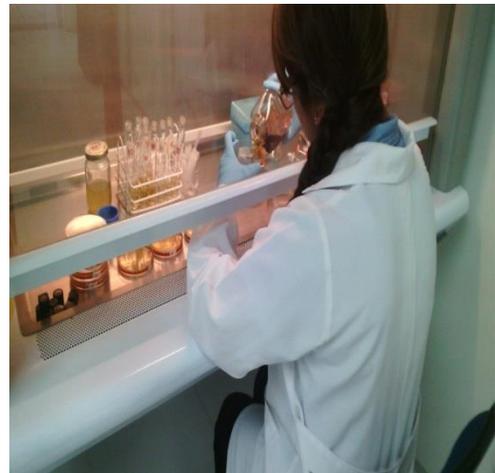
Determinación de Glucosa



Dilución de muestras



Siembra de levaduras



Potenciómetro



Crioscopio



Titulación volumétrica



Destilador

