

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico
usando melaza de caña de azúcar mediante la utilización de
Lactobacillus leichmannii

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por
Anna Sophia Barillas Figueroa para optar al grado académico de Licenciada
en Ingeniería Química Industrial

Guatemala

2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Cinética de reacción para la síntesis fermentativa de ácido láctico
usando melaza de caña de azúcar mediante la utilización de
Lactobacillus leichmannii

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por
Anna Sophia Barillas Figueroa para optar al grado académico de Licenciada
en Ingeniería Química Industrial

Guatemala

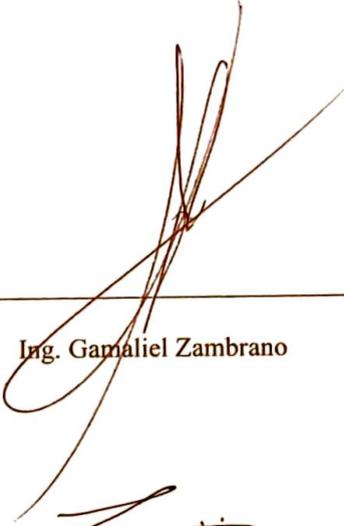
2021

Vo. Bo. :

(f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez González

Tribunal examinador:

(f) 

Ing. Gamaliel Zambrano

f) 

Ing. Luis Ernesto Núñez González

f) 

Ing. Ana Regina Cruz Serré

Fecha de aprobación: Guatemala, 29 de enero de 2021

PREFACIO

Seis años de estudio en ingeniería química industrial han arraigado en mí un hecho primordial: toda actividad o proceso tiene oportunidad de mejora; en aspecto de gestión, económico o de procesamiento como tal. En conjunto con el deseo de aportar a la sociedad guatemalteca en el desarrollo a una economía basada en productos de mayor valor agregado que generen más divisas, comienza mi interés en realizar un estudio más profundo sobre un proceso existente a nivel mundial como lo es la producción de ácido láctico usando melaza como fuente alterna de carbono. La generación de un modelo cinético para un proceso permite identificar los mecanismos de reacción que lo rigen y brinda la oportunidad de encontrar fallas, diseñar nuevos equipos o procedimiento y adquirir métodos de control que permitan mantener la eficiencia operacional al máximo.

Le agradezco a mis maestros y demás personas que me han aportado conocimiento sin fin a lo largo de toda la carrera, a mi director de carrera que me ha asistido en numerosas situaciones sin importar las limitaciones que se presenten, a mi asesor que ha participado y aportado a lo largo de todo este estudio para alcanzar su éxito y a mis padres y familia por su apoyo incondicional. Este trabajo es fruto de días de experimentación limitados en número por pandemia, semanas de estudio y análisis riguroso, horas interminables de escritura y esfuerzo constante. Espero este pequeño aporte incite a más investigaciones exhaustivas de procesos nuevos o ya existentes que permitan aportar al desarrollo industrial de nuestro país.

ÍNDICE

PREFACIO	v
LISTADO DE FIGURAS	ix
LISTADO DE CUADROS	xii
LISTADO DE ECUACIONES	xiv
RESUMEN.....	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	2
III. OBJETIVOS	4
A. General.....	4
B. Específico	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
A. Azúcar.....	5
1. Caña de azúcar	5
2. Azúcares de mayor interés	6
3. Proceso productivo general de la azúcar.....	7
4. Producción en Guatemala	8
B. Ácido láctico	9
1. Métodos de síntesis: química y fermentativa	9
2. Aspectos importantes en la fermentación	12
a. Microorganismo seleccionado.	12
b. Fuente de carbono y su pretratamiento.	12
c. Nutrientes.	13
d. pH, temperatura y agitación.....	13
e. Formación de subproductos.	14

f.	Modo de fermentación.....	15
g.	Inhibición por producción de ácido láctico.....	16
C.	Bacteria ácido-láctica (LAB).....	17
1.	<i>Lactobacillus leichmannii</i>	17
D.	Aplicaciones industriales.....	18
E.	Mercado a nivel mundial.....	19
F.	Cinética química.....	21
G.	Reactor intermitente ideal.....	22
H.	Análisis químico.....	23
1.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	23
2.	Cuantificación de población microbiana.....	23
I.	Berkeley Madonna.....	24
V.	ANTECEDENTES.....	26
VI.	METODOLOGÍA.....	32
A.	PRIMERA ETAPA: Producción fermentativa de ácido láctico.....	32
1.	Inversión de azúcares de melaza.....	32
2.	Crecimiento microbiano y preparación inóculo.....	33
3.	Fermentación para análisis comparativo de rendimiento entre melaza con y sin azúcares invertidas.....	35
a.	Sistemas con melaza no invertida.....	35
b.	Sistemas con melaza invertida.....	36
4.	Fermentación a escala mayor en bioreactor <i>Bioflo 415</i>	37
5.	Análisis de muestras.....	38
B.	SEGUNDA ETAPA: Generación de modelo microbiano.....	40
1.	Generación de modelo microbiano para consumo de azúcares totales, producción de ácido láctico y generación de biomasa (<i>Lactobacillus leichmannii</i>).....	40

VII.	RESULTADOS	41
VIII.	DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	47
IX.	CONCLUSIONES.....	54
X.	RECOMENDACIONES.....	55
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
XII.	APÉNDICE	60
A.	Datos originales	60
B.	Datos calculados	64
C.	Datos de reactivos y equipo	67
1.	Datos de reactivos	67
2.	Datos de equipo	68
D.	Muestra de cálculos	70
E.	Análisis de error.....	71
F.	Cromatogramas.....	73
G.	Ilustraciones.....	79
XIII.	GLOSARIO	85

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.	Contenido porcentual de los principales componentes en la caña de azúcar [4]	5
Figura 2.	Reacción metabólica de la formación de sacarosa durante la fase de crecimiento y maduración de la caña de azúcar. [4]	6
Figura 3.	Gráfico de producción de azúcar en toneladas métricas y su tendencia de aumento semanal durante el periodo de zafra; el periodo de 28 semanas corresponde para la zafra 2018-19 y el de 27 semanas para la zafra 2019-20 [5].	8
Figura 4.	Gráfico de producción de toneladas métricas de azúcar en el tiempo durante periodo de zafra 2019-20 (curva roja) y zafra 2020-21 (curva verde) [5].	9
Figura 5.	Diagrama de producción para la síntesis química (a) y fermentativa de ácido láctico (b) [6].	10
Figura 6.	Mayores rutas metabólicas para glucosa: (A) fermentación homoláctica (glucosis, ruta metabólica EMbden-Meyerhof-Parnas); (B) fermentación heteroláctica (6-PG/PK). Numeración de enzimas: 1)glucoquinasa, 2)fructosa-1,6-difosfato aldolasa; 3)glicerodehído-3-fosfato; 4)piruvato quinasa; 5)lactato deshidrogenasa; 6)glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 7)6-fofogluconato; 8)fosfocetolasa; 9)acetaldehído deshidrogenasa; 10)alcohol deshidrogenasa [19].	11
Figura 7.	Vías alternas de destino para el piruvato. Numeración de reacción enzimáticas corresponden a: 1) diacetil sintasa; 2)acetolactato sintasa; 3)liasa de formiato de piruvato; 4)piruvato deshidrogenasa; 5)piruvato oxidasa; 6)acetato quinasa [19].	15
Figura 8.	Diagrama de aplicaciones comerciales para el ácido láctico en distintas presentaciones. [6].	19
Figura 9.	Mercado global de ácido láctico (volumen e ingresos) entre el año 2012 al año 2020. [8]	20
Figura 10.	Pronóstico de ingresos de distintos materiales para el año 2025 por su uso como fuente de carbono sustituto en la producción de ácido láctico.	20
Figura 11.	Reactor intermitente ideal [11]	22
Figura 12.	Imagen de la malla cuadrículada visible en una cámara de Neubauer utilizada para conteo celular [13].	24
Figura 13.	Ejemplo de plataforma del software Berkeley Madonna [12]	25

Figura 14. Capacidad de <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. Leichamnii</i> , <i>L. lactis</i> y <i>L. bulgaricus</i> de fermentación de distintos sustratos para la formación de ácido láctico [14].....	27
Figura 15. Simulación matemática de fermentaciones batch obtenido en experimentación por Monteagudo <i>et al</i> , (-), modelo teórico; (○) sacarosa, □ ácido láctico, ■ biomasa) data experimental [16].	29
Figura 16. Parámetros de fermentación para <i>L. delbrueckii</i> utilizando melaza de remolacha, por Monteagudo <i>et al</i> [16].	29
Figura 17. Variación de biomasa de <i>L. helveticus</i> durante fermentación batch. (□): concentración de biomasa total observada; (-): modelo generado por Armane y Prigent [1]......	30
Figura 18. Cinética de producción de ácido láctico en fermentación batch. (□): data observada de ácido láctico producido; (-): modelo generado por Armane y Prigent [1].	31
Figura 19. Parámetros determinados para cinética de crecimiento microbiano y producción de ácido láctico [1].	31
Figura 20. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de producto en el tiempo.	43
Figura 21. Gráfico con barras de error para los modelos cinéticos definidos.	72
Figura 22. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC de melaza con azúcares no invertidas: análisis de azúcares	73
Figura 23. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC de melaza con azúcares invertidas: análisis de azúcares.	74
Figura 24. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC de fermentación en bioreactor (MF5.23): análisis de azúcares.	75
Figura 25. Curva de calibración en HPLC utilizada para cuantificación de azúcares.....	77
Figura 26. Curva de calibración en HPLC utilizada para cuantificación de ácido láctico.	78
Figura 27. Curva de tendencia en la dependencia del cambio de microorganismos en el tiempo contra cambio de ácido láctico en el tiempo.	79
Figura 28. Curva con datos suavizados de concentración de microorganismos, sacarosa y ácido láctico en el tiempo para generación de modelo cinético.	80
Figura 29. Gráfica de consumo de azúcares en el tiempo durante la etapa de fermentación	80

Figura 30. Gráfica de velocidad de reacción para el crecimiento microbiano y la formación de ácido láctico en el tiempo durante el periodo de fermentación generada en Berkeley Madonna.	81
Figura 31. Sistema de fermentación 1 utilizando melaza sin azúcares invertidas, luego de 144 horas de fermentación utilizando <i>Lactobacillus leichmannii</i>	81
Figura 32. Sistema de fermentación 4 utilizando melaza con azúcares invertidas, luego de 144 horas de fermentación utilizando <i>Lactobacillus leichmannii</i>	82
Figura 33. Agar MRS sólido con <i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830 luego de 48 h de incubación para crecimiento.	82
Figura 34. Caldo fermentativo resultante luego de 190h de fermentación en bioreactor <i>Bioflo 415</i>	83
Figura 35. Sistema con inóculo a centrifugar para su posterior introducción a caldo a fermentar.....	83
Figura 36. Sistema utilizado para peso seco en horno a 60°C por 48h.....	84

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de condiciones de reacción para la inversión de azúcares en melaza mediante hidrólisis ácida con ácido sulfúrico.	41
Cuadro 2. Comparación de producción fermentativa de ácido láctico con <i>Lactobacillus leichmannii</i> a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada.	42
Cuadro 3. Resultados de fermentación de melaza, con azúcares no invertidas, y <i>Lactobacillus leichmannii</i> para la formación de ácido láctico.	42
Cuadro 4. Definición cuantitativa de las constantes de cinética de formación de ácido láctico para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando <i>Lactobacillus Leichmannii</i>	44
Cuadro 5. Definición cuantitativa de las constantes de cinética de crecimiento microbiano para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando <i>Lactobacillus Leichmannii</i>	45
Cuadro 6. Definición cuantitativa de las constantes de cinética de consumo de sacarosa para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando <i>Lactobacillus Leichmannii</i>	46
Cuadro 7. Propiedades fisicoquímicas de la melaza utilizada.	60
Cuadro 8. Concentración de azúcares presentes en la melaza utilizada.	60
Cuadro 9. Datos de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico realizada en melaza	61
Cuadro 10. Concentración de azúcares iniciales y finales de fermentación a microescala para análisis comparativo de producción fermentativa de ácido láctico entre melaza con azúcares invertidas y sin azúcares invertidas.	61
Cuadro 11. Concentración de productos en fermentación a microescala para análisis comparativo de producción fermentativa de ácido láctico entre melaza con azúcares invertidas y sin azúcares invertidas. ..	62
Cuadro 12. Condiciones iniciales de caldo fermentativo en bioreactor <i>Bioflo 415</i>	62
Cuadro 13. Datos experimentales de fermentación en bioreactor <i>Bioflo 415</i> tomadas en el tiempo.	63
Cuadro 14. Coeficiente de rendimiento y conversión de azúcares en micro fermentación para análisis comparativo entre melaza con azúcares invertidas y sin azúcares invertidas.	64
Cuadro 15. Datos suavizados de fermentación: sacarosa, ácido láctico y biomasa en tiempo específico a ser utilizados en el modelo de cinética microbiana.	64

Cuadro 16.	Determinación de peso seco para conteo microbiano durante experimentación de fermentación.	65
Cuadro 17.	Error cuadrático medio (RMSE) puntual para cada valor experimental de fermentación...	66
Cuadro 18.	Error cuadrático medio (RMSE) para cada curva de modelo cinética generada.	66
Cuadro 19.	Datos de ácido sulfúrico utilizado en hidrólisis ácida.	67
Cuadro 20.	Datos de peptona de carne usado como nutriente en fermentación.....	67
Cuadro 21.	Datos de extracto de levadura usado como nutriente en fermentación.....	67
Cuadro 22.	Datos de hidróxido de potasio usado en fermentación con melaza invertida.	67
Cuadro 23.	Datos de agar sólido MRS para siembra y crecimiento de <i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830.	67
Cuadro 24.	Datos de medio líquido MRS para inóculo de <i>Lactobacillus leichmannii</i> ATCC 7830.....	68
Cuadro 25.	Datos de balanza analítica.	68
Cuadro 26.	Datos de balanza de humedad para peso seco de inóculo	68
Cuadro 27.	Datos de centrífuga para preparación análisis de peso seco.	68
Cuadro 28.	Datos de horno usado para el secado de muestras de biomasa a analizar en peso seco.	69
Cuadro 29.	Datos de sistema de agitación	69
Cuadro 30.	Datos de incubadora para crecimiento microbiano.	69
Cuadro 31.	Datos de bioreactor <i>Bioflo 415</i> para etapa de fermentación.....	69

LISTADO DE ECUACIONES

Ecuación 1.	Variación de propiedad cuantitativa con el tiempo	21
Ecuación 2.	Ecuación de Arrhenius.	21
Ecuación 3.	Ecuación de desaparición del componente A por reacción.	22
Ecuación 4.	Función de cinética microbiana en el tiempo planteada por Monteagudo <i>et al.</i>	28
Ecuación 5.	Función cinética de formación de ácido láctico en el tiempo planteada por Monteagudo <i>et al</i> [16].	28
Ecuación 6.	Función cinética de consumo de sustrato en el tiempo planteada por Monteagudo <i>et al</i> [16].	28
Ecuación 7.	Ecuación de tasa de crecimiento específico para el modelo del cambio de microorganismos en el tiempo establecido por Armane y Prigent.	30
Ecuación 8.	Función cinética de formación de ácido láctico en el tiempo planteada por Armane y Prigent [1].	30
Ecuación 9.	Ecuación de cinética de formación de ácido láctico para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando <i>Lactobacillus Leichmannii</i>	44
Ecuación 10.	Ecuación de cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción fermentativa de ácido láctico.	44
Ecuación 11.	Ecuación de cinética de consumo de sacarosa para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando <i>Lactobacillus Leichmannii</i>	45
Ecuación 12.	Ecuación de error cuadrático (RMSE) medio para modelo cinético.	71

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo general modelar la cinética de fermentación para la síntesis de ácido láctico a partir de melaza de caña de azúcar utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830. Se inició con la determinación de las condiciones de la fuente de carbono a utilizar, en específico, se seleccionó entre la utilización de melaza con y sin sacarosa hidrolizada en virtud del rendimiento de formación de ácido láctico en la fermentación.

Con un valor de rendimiento de producción de ácido láctico frente al consumo de sustrato de 0.26 para la prueba sin hidrolización previa, se realizó una fermentación a escala laboratorio en un reactor intermitente de 16L con caldo fermentativo de melaza sin azúcares invertidas, $0.002 \text{ g}^* \text{ mL}^{-1}$ de microorganismos iniciales y $0.2 \text{ g}^* \text{ mL}^{-1}$ de azúcares fermentables (sacarosa, glucosa y fructosa) por un periodo de 190h. Al final de la fermentación se obtuvo una producción total de ácido láctico de 218.40g, equivalente a $7.145\text{E-}5 \text{ g}^* \text{ mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, concentración de biomasa final de $1.8755\text{E-}2 \text{ g}^* \text{ mL}^{-1}$ y consumo de sacarosa del 93%. En términos generales, se puede expresar que, a partir de 3.5L de melaza inicial (azúcares totales de 46.8% m/v, con sacarosa constituyendo 35.56% m/v) se obtienen luego de 190.75 horas de fermentación, 216.20g de ácido láctico como producto principal deseado y 302.40g de ácido cítrico como parte de los subproductos de mayor presencia.

Las muestras tomadas durante el periodo de fermentación fueron utilizadas para modelar la cinética microbiana respectiva de la fermentación. Se plantearon ecuaciones cinéticas, basado en el modelo de Armane y Prigent de 1994 por su forma de curva sigmoidea. La validación del modelo se hizo con el cálculo del error cuadrático medio (RMSE) para cada curva generada, en donde se obtuvo para el consumo de sacarosa un valor de $7.8694\text{E-}3$, para la formación de ácido láctico $4.7277\text{E-}4$ y para el crecimiento de microorganismos de $1.1442\text{E-}3$.

I. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es un químico altamente demandado por el mercado, posee diversas aplicaciones en distintas áreas dentro de la industria a nivel mundial. Debido a que ha sido clasificado como GRAS (siglas que su traducción al español significa Generalmente reconocida como seguro) por la US-FDA, entre sus aplicaciones se puede mencionar: preservativo natural en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética por su secreción de antibióticos; sus derivaciones se utilizan como “solventes verdes” en industrias química, de textiles o de cuero. De igual manera, es altamente demandado por su uso como monómero en la síntesis de plásticos biodegradables, como ácido poli láctico (PLA). Por otra parte, la melaza es un producto residual de la elaboración de azúcar en un ingenio, proveniente de la caña, con altos niveles de azúcares (5% de la producción de azúcar equivalente a 135,000 toneladas al año, según datos de CENGICAÑA 2018).

El proyecto pretende utilizar el producto residual que representa la melaza de la caña de azúcar como materia prima para la síntesis de ácido láctico por un método fermentativo utilizando el microorganismo *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830. El objetivo y resultado final presentado es la generación del modelo de cinética microbiana del mismo a partir de los datos experimentales obtenidos durante la fermentación. La importancia del modelo radica en que representa una herramienta útil para el análisis de los mecanismos de reacción presentes, el diseño y control de procesos a escala superior o equipo de mayor dimensionamiento, finalmente, permite mejorar procedimientos ya existentes para alcanzar una mayor eficiencia

II. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la agencia federal de Administración de Comida y Drogas (FDA) de los Estados Unidos de América, el ácido láctico ha sido clasificado como GRAS (siglas que en español significan generalmente reconocido como seguro) por sus características de inodoro y no volátil. Debido a lo anterior, este posee una amplia gama de aplicaciones tanto en la industria alimenticia como en otros tipos de industrias; entre las mismas se puede recalcar: preservante natural en productos alimenticios, componentes para la generación de farmacéuticos y cosméticos, sustrato para la producción de componentes orgánicos y “solventes verdes”, monómero para la síntesis de plásticos biodegradables como el ácido poli láctico (PLA), entre otros. En el año 2018, el tamaño del mercado global para el ácido láctico fue estimado en USD 2.64 billones (cifra equivalente a Q20.336 billones al cambio de \$1 por Q7.70319) y una tasa compuesta de crecimiento anual de 18.7% del año 2019 al año 2025.

El ácido láctico es un componente que puede ser sintetizado tanto por método químico como fermentativo. Sin embargo, el método químico posee diversas desventajas: agotamiento de los recursos petroquímicos, formación de enantiómeros indeseados, incremento en el costo de purificación, reducción en el porcentaje de producto recuperado, menor pureza en el producto debido a síntesis racémica, problemas de contaminación ambiental, entre otros. Por otra parte, el método fermentativo presenta la ventaja de poder sintetizar ácido láctico de manera estereo específica (L (+), D(-) o una mezcla DL dependiendo de la cepa microbiana utilizada. Actualmente la producción global del ácido láctico se encuentra enfocado en su mayoría en la utilización de materia prima barata o en alta disponibilidad para la producción fermentativa, ya que evita la utilización de productos de origen petroquímicos; la melaza, conocida como producto residual de la producción de azúcar de caña, se presenta como un sustituto de materia prima potencial en la síntesis de ácido láctico por su alto nivel de sacarosa (>30%). La miel final a utilizar en el trabajo presente contiene concentración de azúcares totales de 46.8% m/v (356% m/v de sacarosa, 534% m/v de glucosa y 5.9% m/v de fructosa), el cual representa un 28% m/v más de azúcares totales frente a otras mieles como miel clarificada, corriente del proceso de producción de azúcar a partir de caña.

Actualmente, el etanol obtenido de manera fermentativa a partir de melaza se encuentra alrededor de los 0.5-0.75 US\$ por litro mientras que el litro de ácido láctico al 85% en mezcla racémica presenta un precio entre 90-100 US\$. Data numérica histórica ha demostrado una fluctuación en el precio del etanol a lo largo de los últimos años; la compañía *Highwater Ethanol* (productora estadounidense de 57 millones de galones al año), en los últimos 5 años, ha alcanzado valores que rodean entre los 5.85-12.00 US\$. Dado la versatilidad de aplicaciones industriales, la demanda de mercado en crecimiento y la ventaja comercial, presentada frente

a la venta de etanol, que posee el ácido láctico; el presente trabajo pretende brindar estudios necesarios para poder impulsar la producción de ácido láctico en la industria azucarera en el territorio guatemalteco con la ventaja de utilizar la melaza que es residuo final de producción, como fuente de sustrato. La generación de un modelo de cinética de fermentación para la síntesis de ácido láctico permite entender con mayor profundidad

los mecanismos del procedimiento utilizado, identificar el alcance del proceso y sus limitaciones por las condiciones de operación empleadas. Debido a la ventaja como producto de valor agregado que representa el ácido láctico y a la disponibilidad de fuente de carbono a bajo costo presente en el territorio guatemalteco, este trabajo representa un punto de partida para el accionamiento de más mecanismos de fermentación que permitan obtener mejores rendimientos de producción e implementaciones de sistemas a escala industrial

III. OBJETIVOS

A. General

Determinación de un modelo de cinética microbiano para la síntesis de ácido láctico utilizando *Lactobacillus leichmannii* y melaza subproducto del proceso de azúcar a partir de caña.

B. Específico

1. Determinación de condiciones de la reacción de inversión de sacarosa en melaza como fuente de sustrato, comparando los rendimientos de glucosa y fructuosa resultantes.
2. Realizar una comparación de la producción de ácido láctico por vía fermentativa con melaza sin tratamiento y con tratamiento de azúcares invertidos, para establecer el sustrato del modelo cinético microbiano a estudiar.
3. Determinar la concentración de azúcares, microorganismos y concentración de ácido láctico en diferentes tiempos, en la fermentación de melaza para la síntesis de ácido láctico, para la generación de un modelo de cinética microbiano utilizando *Lactobacillus leichmannii*.
4. Generar un modelo cinético para la concentración de azúcares, microorganismos y ácido láctico en la síntesis efectuada utilizando *Lactobacillus leichmannii* y melaza como fuente de carbono.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Azúcar

1. Caña de azúcar

La caña de azúcar comprende de la materia prima para cualquier ingenio azucarero en la producción de azúcar. A pesar de que sus propiedades y características dependen de factores como zona de cultivo, temperatura, altitud, especie, herbicidas utilizados, entre otras, la siguiente imagen presenta los rangos de contenido porcentual para los principales componentes de la caña de azúcares en sus tallos y jugos [4]:

Constituyente químico en los tallos	Porcentaje*
Agua	73 – 76
Sólidos	24 – 27
- Sólidos solubles (brix)	10 – 16
- Fibra (seca)	11 – 16
En sólidos solubles del jugo	
Azúcares	75 – 92
- Sacarosa	70 – 88
- Glucosa	2 – 4
- Fructosa	2 – 4
Sales	
- Inorgánicas	3.0 -3.4
- Orgánicas	1.5 -4.5
Ácidos orgánicos	1.0 - 3.0
Otros no azúcares orgánicos	
- Proteína	0.5 - 0.6
- Almidones	0.001 - 0.050
- Gomas	0.3 - 0.6
- Grasas, ceras, etcétera	0.15 - 0.50
- Compuestos fenólicos	0.10 - 0.80

Figura 1. Contenido porcentual de los principales componentes en la caña de azúcar [4]

2. Azúcares de mayor interés

El principal componente de interés a obtener de la caña de azúcar es la sacarosa. Este comprende de un disacárido compuesto por dos monosacáridos: glucosa y fructosa. La sacarosa es el producto de una biosíntesis (Figura 2) generada por el metabolismo de la caña de azúcar durante su crecimiento. La sacarosa tiene actividad óptica destrógiro mientras que la glucosa y la fructuosa tienen actividad óptica levógiro. Debido a su actividad óptica las tres características mayormente definidas en el análisis de los jugos de la caña de azúcar son: 1) "pol" o polarización, determinada por polarimetría con el objetivo de determinar la concentración de sacarosa; 2) "brix", contemplada como una concentración porcentual aproximada de sólidos solubles y se utiliza usualmente un refractómetro para su medición; 3) pureza aparente, equivale a la relación porcentual entre pol y brix ($\text{pol} \cdot 10 / \text{brix}$). Por otra parte, una opción para la determinación volumétrica del contenido de azúcares reductores (glucosa o fructosa; denominados así por la disponibilidad de su grupo carbonilo) es el método de Fehling en donde el ion cúprico (Cu^{2+}) reacciona con el carbonilo libre.

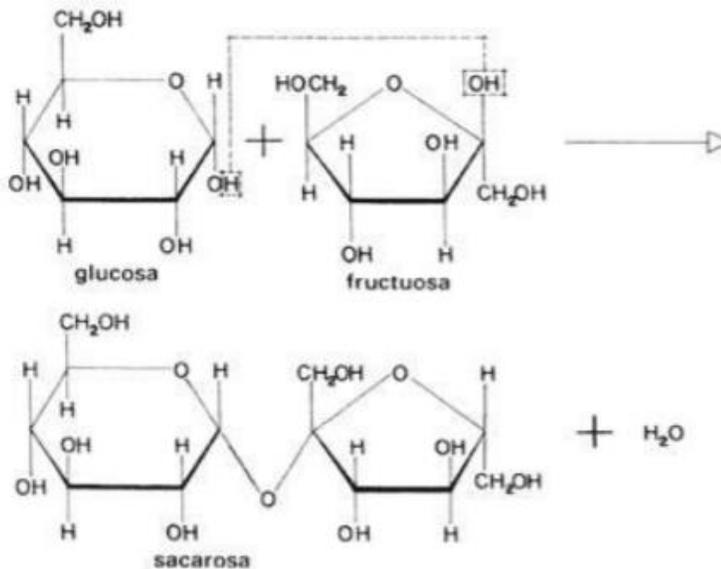


Figura 2. Reacción metabólica de la formación de sacarosa durante la fase de crecimiento y maduración de la caña de azúcar. [4]

En la fabricación de azúcar en la industria, con el fin de su comercialización, la sacarosa es el azúcar con mayor interés debido a que los azúcares reductores, glucosa y fructosa, no son cristalizables. Es debido a lo anterior, es fundamental determinar la pureza aparente de los sólidos en el jugo de caña que ingresa ya, una pureza baja implica menos concentración de sacarosa y necesidad de mayores operación en la continuación de la línea de producción [3]

3. Proceso productivo general de la azúcar

El proceso productivo de la azúcar comienza con la recepción y manejo del cultivo de caña, en donde se determina el peso bruto de la caña de azúcar y se toman muestras de unidades en frecuencia fijada con anterioridad para su análisis. Posterior a la recepción sigue la preparación en donde se busca transformar la caña en un material más homogéneo y denso. En el proceso se llevan a cabo dos acciones: la reducción de longitud de la caña a trozos pequeños utilizando cuchillas giratorias y la desintegración del tejido por la acción de desfibradoras [4].

Luego de preparar la caña, esta es alimentada a un tándem de molinos en arreglos de cuatro mazas para la extracción del jugo de caña por acción mecánica de los molinos y por acción fisicoquímica al usar inhibición compuesta. Esta última comprende de la alimentación de agua caliente al bagazo encontrado en el último molino y se realiza una retroalimentación en sentido contrario del jugo obtenido hasta alcanzar el segundo molino.

Como resultado anterior se presentan dos corrientes: una de bagazo que es utilizado como combustible en la caldera para la generación de vapor y energía eléctrica requerido en el proceso y la segunda representado por el jugo mezclado de caña que aún posee impurezas como tierra, arena, bagacillo, componentes microbianos, entre otros. Este jugo es dirigido al proceso de clarificación en donde se utiliza ácido fosfórico, sulfatación y altas temperaturas para obtener un jugo clarificado con las características para producir un azúcar de la calidad requerida [4].

El jugo clarificado es luego calentado para evaporar el contenido de agua y aumentar la concentración de grados brix para formar la meladura, utilizando evaporadores dispuestos en arreglo para formar un sistema de evaporación de múltiple efecto. La meladura obtenida es luego clarificada para su remoción de impurezas (principalmente para la producción de azúcar refinada); iniciando con un tratamiento fisicoquímico para generar conglomerados de partículas sólidas y remover sustancias colorantes, se sigue con un calentamiento y finaliza con la inyección de burbujas de aire desde el fondo hacia la superficie para formar una espuma con impurezas fácil de remover [4].

La meladura ya clarificada es luego materia en dos proceso: desarrollo o crecimiento del cristal de sacarosa y el agotamiento de las mieles (disminución de su pureza aparente). En la cristalización, por método de semillamiento, a la solución con un coeficiente de sobresaturación de entre 1.00 y 1.25 se agrega una cantidad determinada de semilla para propagar la formación de cristales, la adición de agua caliente y evaporación continua permite apartar la viscosidad de la meladura alrededor de los cristales. En la industria, se utiliza un sistema de tres masas y doble magma para el desarrollo del cristal y agotamiento de las mieles, en donde en un sentido se agota la pureza del material azucarado y en el sentido contrario se desarrolla el tamaño del cristal al deseado. El producto final del agotamiento de las mieles corresponde al residuo denominado como melaza, el cual es usado actualmente como alimento para ganado o sustrato para la producción de etanol usado en la industria de bebidas alcohólicas [4].

La melaza o miel final corresponde a un residuo en la fabricación de azúcar en los ingenios. La miel final o miel C se obtiene en la separación consecutivas de mieles que se realiza luego de la evaporación de la meladura y su posterior cristalización. Esta tiene un contenido promedio de 50% de azúcares: 33% de sacarosa, 9% de glucosa y 8% de fructosa; además del resto de sólidos en impurezas no deseadas en el producto final cristalizado a comercializar. La producción de la melaza es de 0.03 toneladas por tonelada de caña molida, o, en otras palabras, corresponde a 0.24 toneladas de melaza por tonelada de azúcar para comercializar producida.

Al principio, la melaza era considerada únicamente como un “desecho” el cual era utilizado para compactar el polvo de las carreteras de tierras, sin embargo, actualmente dentro de la industria guatemalteca es utilizado como suplemento nutricional en el alimento de ganado, como fuente de carbono en la industria de bebidas alcohólicas, o se vende al extranjero como materia prima para otros procesos. En un futuro, se pretende alcanzar utilidades de mayor beneficio y valor agregado [4]

4. Producción en Guatemala

Según datos publicados por el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA), la producción de la temporada de zafra 2018-19 (28 semanas, aproximadamente de noviembre a abril) produjo un total de 2.97 millones de toneladas métricas, mientras que para la zafra 2019-20 (27 semanas) el valor de producción bajo a 2.76 millones de toneladas métricas; esto equivale aproximadamente a 712 mil toneladas de melaza para la temporada 2018-19 y 663 mil toneladas de melaza para 2019-20. En la gráfica siguiente se presenta las toneladas métricas de azúcar producida y su aumento por semana dentro de la temporada [45].



Figura 3. Gráfico de producción de azúcar en toneladas métricas y su tendencia de aumento semanal durante el periodo de zafra; el periodo de 28 semanas corresponde para la zafra 2018-19 y el de 27 semanas para la zafra 2019-20 [5].

Por otra parte, la producción por hectárea, incluyendo el periodo de zafra 2020-21 hasta la semana 10, se obtienen valores de 12.38 para la zafra 2018-19, 11.77 para zafra 2019-20 y 11.13 para la zafra 2020-2021 de toneladas de azúcar por hectárea. Los valores indican una menor producción con paso de temporada; hasta la semana 10 de la temporada 2020-21 se alcanza una producción de aproximadamente 2 mil toneladas de

melaza. En el siguiente cuadro se indica la producción de temporada contra tiempo de zafras 2019-20 y 2020-21.



Figura 4. Gráfico de producción de toneladas métricas de azúcar en el tiempo durante periodo de zafra 2019-20 (curva roja) y zafra 2020-21 (curva verde) [5].

B. Ácido láctico

El ácido láctico, $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$, es un químico descubierto en el año 1847 por el químico sueco Scheele como un componente de la leche. Sin embargo, en 1857 Pasteur determinó que no se trataba de un componente de la leche sino de un metabolito fermentativo generado por microorganismos [6].

1. Métodos de síntesis: química y fermentativa

El ácido láctico puede ser sintetizado de manera química o fermentativa (Figura 5). La síntesis química involucra la ruta lactonitrila, subproducto de la síntesis de acrylonitrila, e involucra la adición catalizada por bases de cianuro de hidrógeno al acetaldehído para la producción de lactonitrilo. Otras síntesis menos aplicadas en la industria involucran: degradación de azúcares catalizadas por base, oxidación de propilenglicol, hidrólisis de ácido cloropropinoico, oxidación ácido-nítrica de propileno, entre otros. Sin embargo, la síntesis de ácido láctico de manera química solo brinda como resultado un producto racémico, es decir, una mezcla de ambos isómeros: L(+)-ácido láctico y D(-)-ácido láctico [6]. La síntesis química presenta desventajas entre las que se encuentran: el agotamiento de recursos petroquímicos, la formación de enantiómeros no deseados, incremento considerable de costos de purificación, eficiencia de recuperación reducida que a su vez recae en menor porcentaje de pureza del producto final y problemas de contaminación ambiental.

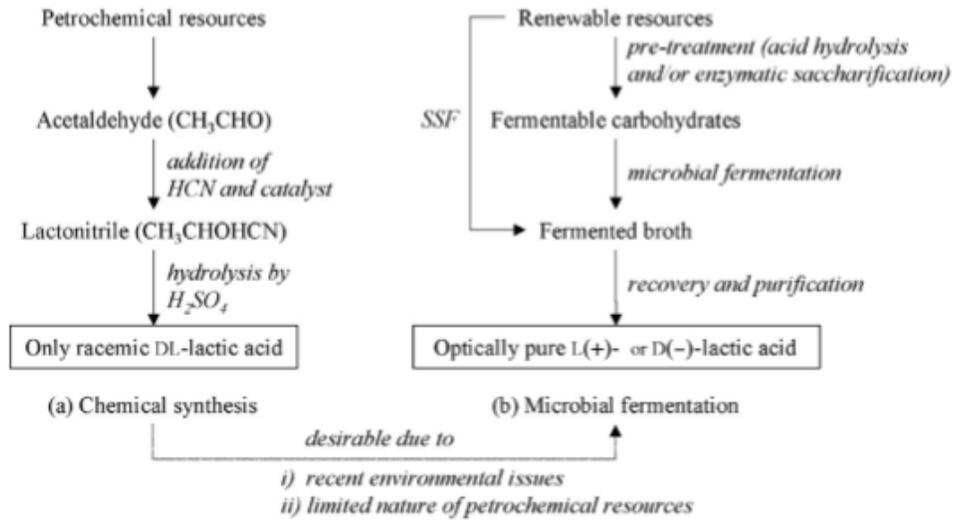


Figura 5. Diagrama de producción para la síntesis química (a) y fermentativa de ácido láctico (b) [6].

Por otra parte, la síntesis fermentativa del ácido láctico presenta la principal ventaja de producir de manera estereo específica, es decir, se puede producir el isómero L(+), D(-) o una mezcla racémica si así se desea. El producto obtenido depende del modo de fermentación a partir de carbohidratos utilizada: fermentación homo láctica (homo fermentativo) o fermentación hetero láctica (hetero fermentativa); este a su vez de finido por la naturaleza de la bacteria ácido-láctica usada y las condiciones experimentales trabajadas. En la homo fermentativo, la glucosa es convertida casi únicamente en ácido láctico mientras que en la hetero fermentativa se obtienen otros subproductos como etanol, dióxido de carbono, ácido glucónico entre otros (Figura 6).

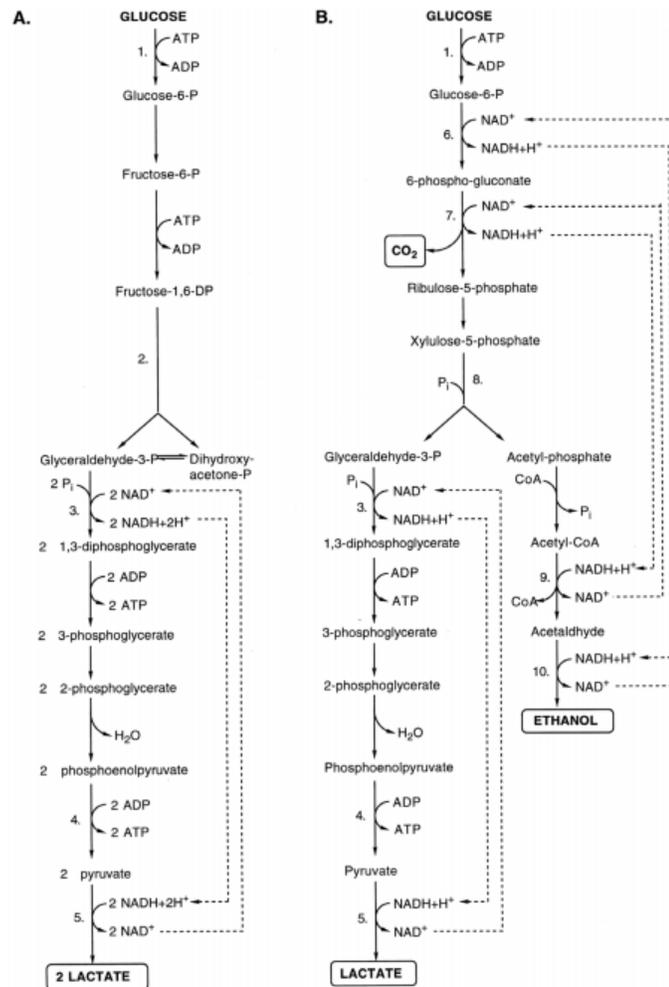


Figura 6. Mayores rutas metabólicas para glucosa: (A) fermentación homoláctica (glucólisis, ruta metabólica EMbden-Meyerhof-Parnas); (B) fermentación heteroláctica (6-PG/PK). Numeración de enzimas: 1)glucoquinasa, 2)fructosa-1,6-difosfato aldolasa; 3)glicerodehído-3-fosfato; 4)piruvato quinasa; 5)lactato deshidrogenasa; 6)glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 7)6-fofogluconato; 8)fosfocetolasa; 9)acetaldehído deshidrogenasa; 10)alcohol deshidrogenasa [19].

Los microorganismos utilizados para la síntesis fermentativa del ácido láctico pueden ser dividido en dos grupos: fungi y bacteria. Entre el grupo fungi se encuentran los géneros *Rhizopus*, *Mucor* y *Monilia*; se caracterizan por sintetizar en condiciones aeróbicas y en medios con nitrógeno inorgánico, sin necesidad de aminoácidos o suplementos de vitamina. Por otra parte, al grupo de bacteria se le conoce como *Bacteria ácido-láctica* (LAB por sus siglas en inglés) y de acuerdo a Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, LAB se divide en los siguientes grupos [22, 24]:

- a. Grupo 17 cocos gram positivo: *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Pedococcus* sp., *Sacharococcus* sp., *Streptococcus* sp.

- b. Group 18 (formadora de esporas). Varillas y cocos gram positivo: *Bacillus* sp., *Sporolactobacillus* sp.
- c. Grupo 19 (*no esporulante*). Varillas gram positivo: *Lactobacillus* sp.

2. Aspectos importantes en la fermentación

Existen diversos factores que afectan la secreción, productividad y rendimiento en la síntesis de ácido láctico por un método fermentativo. Entre los cuales se resaltan [9, 22]:

a. Microorganismo seleccionado.

La selección del microorganismos a utilizar para la fermentación define muchos de los parámetros luego tratados; desde la necesidad de un medio aeróbico o anaeróbico, fuente de sustrato inicial, pH y temperatura. Para la selección se tiende a tomar en cuenta factores como la disponibilidad económica, el isómero deseado (L, D o mezcla racémica), productividad de ácido láctico deseada; es necesario tomar en cuenta condiciones a futuro como la factibilidad de recuperación, calidad y purificación que se tenga en un proceso industrial de gran dimensión.

En múltiples industrias se opta por la utilización de microorganismos genéticamente modificados por su alteraciones de propiedades; como por ejemplo el incremento a la tolerancia de mayores concentraciones de ácido láctico producido, menores valores de pH en el medio, mayores rangos de temperatura, entre otros. Sin embargo, es también hecho que la práctica de alteración genética no es ampliamente aceptada debido al riesgo de generación de microorganismos peligrosos, nuevos tóxicos o contaminación ambiental en un futuro distante.

b. Fuente de carbono y su pretratamiento.

En teoría, se ha demostrado que se obtiene una mayor pureza de producto al fermentar azúcares de mayor a su vez de mayor pureza; que resulta en menores costos de purificación. No obstante, la utilización de dichos tipos de azúcares de vuelve económicamente no viable debido a que se aumenta de manera significativa los costos en sustratos; es por ello que actualmente se ha optado por sustituir la glucosa y sacarosa pura por fuentes de carbono de mayor complejidad y más económicas.

Estas fuentes de carbono, generalmente denominadas como fuentes renovables, están comprendidas por subproductos o residuos de otras industrias: melaza de la generación de azúcar, suero de la producción de quesos, almidón de cultivos o desechos, así como otros materiales lignocelulósicos. La complejidad de azúcares en las fuentes renovables, hexosas o pentosas, requieren de un pretratamiento de inversión de azúcares para aumentar la concentración de azúcares fermentables. El procedimiento puede ser realizado por distintos métodos como la utilización de enzimas (invertasa) o hidrólisis ácida; el tipo de procedimiento a emplear depende de que tan complejas sean las azúcares para tratar. La hidrólisis ácida de sacarosa, por su parte, presenta la complejidad de degradación de la glucosa y fructosa por deshidratación a 5-

hidroximetilfurfural (5-HMF); degradación que tiende a ocurrir en condiciones con temperatura mayor a 106°C y pH menor a 2.0.

c. Nutrientes.

El tipo de microorganismos para la fermentación tiene un peso significativo en la necesidad de nutrientes como nitrógeno, extracto de levadura, peptona, medios preparados como MRS u otros aminoácidos. Como anteriormente se menciona, microorganismos dentro del grupo fungi como *Rhizopus* han demostrado que no requieren de medios complejos con nutrientes para su crecimiento y generación de ácido láctico; por otro lado, los microorganismos LAB son conocidos por su alta demanda de nutrientes que posee un efecto relevante en los rendimientos de producción obtenidos en la fermentación. Debido a lo anterior, al utilizar LAB en conjunto con fuentes de carbono renovables, la utilización de un método de pretratamiento para la clarificación o limpieza de este se debe tener en consideración la posible alteración de fuente de nutrientes o producción de agentes tóxicos para el medio.

d. pH, temperatura y agitación.

Son condiciones de operación que afectan drásticamente el rendimiento de producción de ácido láctico, dependiendo del microorganismo seleccionado, los parámetros de trabajo definidos varían para aumentar la eficiencia de la fermentación.

El pH se puede definir ya sea al principio de la fermentación, en la preparación del medio, o se puede controlar a lo largo de esta. En la primera, el valor inicial de pH necesario para promover el crecimiento microbiano y una tasa alta de secreción de ácido láctico se reduce gradualmente conforme se produce el ácido láctico hasta que se vuelve perjudicial; detiene tanto el crecimiento como la producción y conlleva a la fase de muerte celular. Debido a su tolerancia a menores valores de pH, los microorganismos LAB han demostrado sobrevivir a medios más ácidos que el grupo fungi.

En contraste, el control de pH a lo largo de la fermentación resulta en rendimientos, como mínimo, iguales a no tener control o mayores. El control realizado en investigaciones previas correspondía a ajustes periódicos de pH con un alcalino a partir de cálculos hechos con base al valor inicial de fermentación. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que para mantener un control continuo del pH en el medio se utilizan métodos como la valorización (por ejemplo, con NaOH o NH₄OH) o estrategias de recuperación del ácido láctico producido (extracción, adsorción o electrolisis).

La temperatura óptima, al igual que en el caso del pH, se encuentra directamente ligado a la selección del microorganismos. En comparativa, los productores del grupo bacteria poseen mayor tolerancia a un rango más amplio de temperatura que los del grupo fungi. No obstante, la familia, género y especie a la misma puede definir un comportamiento distinto para cada categoría de fermentación evaluada; es decir, existen escenarios en donde los picos de la productividad microbiana y la producción de ácido láctico se alcanzan a distintas temperaturas, y otros en donde todas las categorías alcanzan su máximo en el mismo valor de temperatura.

Finalmente, la agitación es una condición de operación que pretende principalmente mantener la homogeneidad del medio dentro del reactor, es decir, pH y nutrientes, densidad celular y concentración de sustrato y temperatura. De igual manera, para ciertos microorganismos como *Rhizopus* una agitación alta y constante evita la formación de esporas de gran tamaño que detengan la producción de ácido láctico antes de tiempo. Para el mantenimiento de un sistema homogéneo se utilizan métodos como mezclado por circulación por bomba del fondo hacia la superficie del reactor, adición de deflectores para mantener un flujo turbulento interno o adición de un agitador mecánico como parte del equipo auxiliar del equipo.

e. Formación de subproductos.

Dependiendo de la ruta metabólica utilizada serán la diversidad de productos secundarios producidos durante la fermentación. Generalmente, en una ruta hetero láctica se puede generar ácido acético, ácido fórmico, dióxido de carbono, etanol, entre otros; los mismos varían ya que distintas fuentes de carbono producen diferentes cantidades de subproductos. En la industria, el rendimiento de producción puede ser valorado a partir de la razón de ácido láctico sobre producto total. Se obtiene mayor razón en procesos por lotes en comparación con un proceso semicontinuo, así mismo en condiciones anaeróbicas contra condiciones aeróbicas. Las cantidades de oxígeno, dependiendo de la ruta metabólica que siga la cepa utilizada, pueden incurrir en la generación de subproductos a partir del piruvato como lo indica la Figura 7.

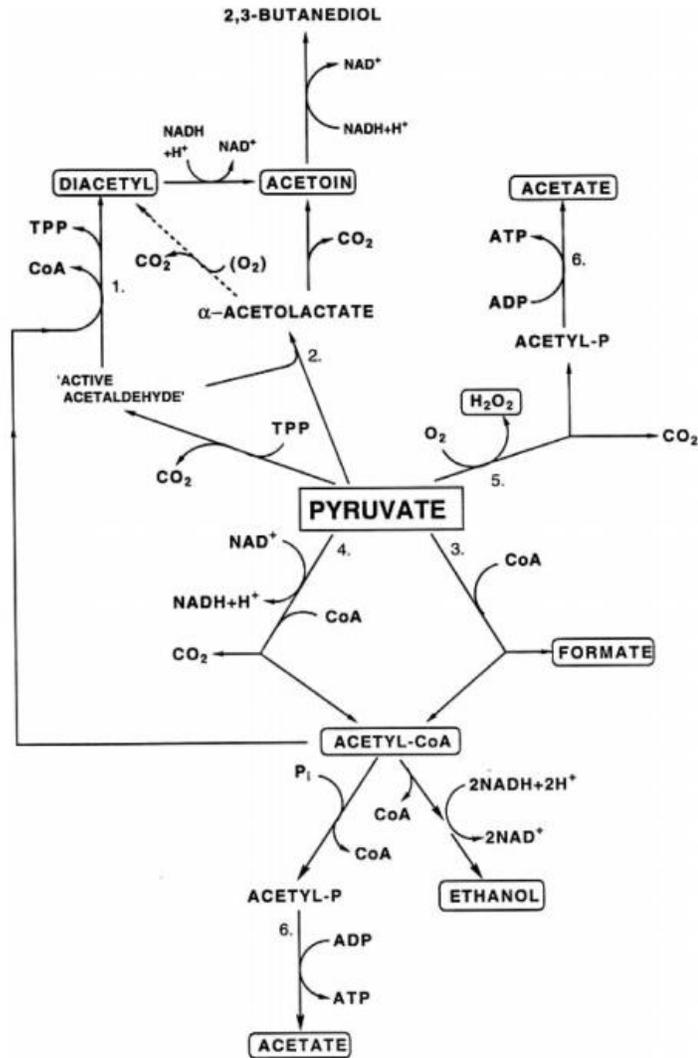


Figura 7. Vías alternativas de destino para el piruvato. Numeración de reacción enzimáticas corresponden a: 1) diacetyl sintasa; 2) acetolactato sintasa; 3) liasa de formiato de piruvato; 4) piruvato deshidrogenasa; 5) piruvato oxidasa; 6) acetato quinasa [19]

f. Modo de fermentación.

Según con Yada *et al*, en la práctica, el peso de la decisión del modo de fermentación (por lotes, por lote alimentado, semicontinuo, continuo o fermentación en estado sólido) recae sobre la naturaleza del medio y la capacidad de tolerancia osmótica que tenga el cultivo utilizado. Si el cultivo es insensible a efectos osmóticos, se utiliza un modo por lotes. Si el cultivo es sensible a efectos osmóticos, se requiere de un modo de fermentación por lotes alimentado, semicontinuo o continuo.

Existe distintas comparativas acerca de los modos de fermentación por lotes contra continuo por diversos motivos:

- En la fermentación por lotes se tiene la facilidad en el control de procesos y el protocolo de recuperación de producto. En un proceso continuo se aumenta la probabilidad de contaminación microbiana.
- Utilización del 100% de sustrato en modo por lotes mientras que en modo continuo se mantiene una concentración constante de sustrato que no llega a ser utilizado. Esto afecta principalmente cuando el sustrato utilizado representa un porcentaje significativo en los costos de operación
- En un proceso continuo se trabaja con mayor razón de dilución, por lo que, bajo ciertas condiciones, esto resulta en una mayor productividad. En contraparte, esta dilución también afecta la concentración de sustrato y nutriente en el medio.

g. Inhibición por producción de ácido láctico.

Al aumentar la concentración de ácido láctico en la fermentación el efecto osmótico sobre la biomasa aumenta y tiene un efecto perjudicial ya que vuelve el proceso más lento que conlleva a muerte celular por estrés de fermentación prolongada. Como método preventivo se puede inducir a la cepa a ya sea una climatización de medio ácido de manera gradual, en donde de manera sucesiva la biomasa se somete a alta concentración de ácido permitiendo una alta tasa de mortalidad, pero aquella sobreviviente es propagada en concentraciones aún más altas. El otro método implica la modificación genética de la composición de la pared celular de la cepa a modo que se incremente la osmo-tolerancia a mayores concentración de ácido láctico.

Otra alternativa, que no involucra la alteración del cultivo fermentador, es la remoción continua de ácido láctico del sistema para evitar alcanzar bajos niveles de pH como previamente fue mencionado. Existen tres métodos mayormente utilizados en la industria:

- Remoción continua mediante electrodiálisis, permitiendo mayores rendimientos y concentraciones de ácido láctico al promover la reacción.
- Remoción continua mediante extracción. En este método se debe de tener cuidado con la selección del agente extraente a que debe de ser bio-compatible y evitar daño alguno a la cepa o cambiar las propiedades del medio fermentador.
- Remoción continua mediante intercambio iónico. Este método ha sido utilizado en reactores de lecho utilizado y resulta en altas concentraciones de ácido láctico producido. Tiene la ventaja de poder utilizar el mismo intercambiador de aniones en repetidas situaciones luego de la regeneración a forma OH⁻, y es amigable con el ambiente.

C. Bacteria ácido-láctica (LAB)

El grupo reconocido como Bacteria ácido-láctica (*LAB* por sus siglas en inglés), es aquel grupo de bacteria gran-positivo unido por características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Son cocos o varillas que se agrupan por ser no esporulantes, con metabolismo anaeróbico pero tolerantes a la presencia de aire. Entre las características fisiológicas se encuentran la tolerancia ampliamente variable a pH menores a 5.0, tolerancia a temperaturas por arriba de los 40°C, la mayoría son considerados como *generalmente considerados como seguros* (GRAS por sus siglas en inglés), y la necesidad de medios con fuentes de nitrógenos complejas (necesidad de aminoácidos y vitaminas para el crecimiento bacteriano y la producción de ácido láctico). Las familias incluidas dentro del grupo son: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae* [19, 23].

Por morfología, LAB no poseen un sistema respiratorio funcional por lo que obtienen su energía de fosforilación a nivel de sustrato. Las hexosas pueden ser fermentadas por dos rutas previamente descritas: homo o hetero fermentativa. La fermentación homo láctica se basa en glucólisis (ruta Embden-Meyenhorf-Parnas) en donde a partir de un mol de glucosa consumido se generan 2 moles de ATP y prácticamente sólo se produce ácido láctico. Por el contrario, en la fermentación hetero láctica se sigue la ruta de pentosa fosfocetolasa para producir generalmente 1 mol de ATP por cada mol de glucosa consumida debido a la producción de otros componentes como etanol o dióxido de carbono aparte del ácido láctico.

Según Vinderola *et al*, el género *Lactobacillus* puede separarse en tres grupos según su ruta fermentativa operativa: [19].

- a. Grupo I lactobacilli: homo fermentativo. (ej. *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*).
- b. Grupo II lactobacilli: facultativamente hetero fermentativa, es decir, fermentan las hexosas de manera homo láctica y las pentosas de manera hetero láctica. (ej. *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*).
- c. Grupo III lactobacilli: hetero fermentativa. (ej. *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*).

1. *Lactobacillus leichmannii*.

En conjunto con las especies *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus bulgarius* conforman un grupo de genospecies de *Lactobacillus delbrueckii*. La cepa constituye al género *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, genera únicamente el isómero D (-) y posee un crecimiento constante a una temperatura de 48°C, pero no a 15°C. Puede fermentar una amplia gama de azúcares (hexosas en su mayoría) entre las cuales se incluyen celulosa, lactosa, glucosa, manosa, sacarosa y se excluyen otras como galactosa y melibiosa.

En términos generales, las subespecies del género *Lactobacillus delbrueckii* son gram positivo, varillas no esporulantes con extremos redondeados, ocurren individualmente y en cadenas cortas. Generan colonias

rugosas y no pigmentadas, con 1-3 mm de diámetro; su crecimiento se ve mejorado por la tensión de O₂ reducido o en condiciones anaeróbicas [21].

D. Aplicaciones industriales

El ácido láctico posee una demanda de aproximadamente de 85% en industrias alimenticias o relacionadas con la misma, debido a que es *reconocido generalmente como seguro* (GRAS según sus siglas en inglés). El restante 15% corresponde a la demanda por parte de la industria no alimenticia; no obstante, la disparidad en su demanda no disminuye el amplio rango de aplicaciones que posee en el sector comercial (Figura 8). Posee distintas aplicaciones en alimentos, como preservativo y acidulante en el sector de bebidas, como saborizante, buffer de pH e inhibidor de bacterias en productos para consumo a largo tiempo (jaleas, dulces, mayonesa, cerveza, entre otros). Es utilizado también no directamente en la producción de productos alimenticios sino en la desinfección y envasado de cadáveres como aves o peces para reducir el deterioro microbiano [6]

Fuera de la industria alimenticia, también es utilizado en la industria farmacéutica, industria de cosméticos, industria química y en la industria de materia prima química. En farmacia es altamente utilizado para la creación de ungüentos tópicos, lociones y soluciones parenterales, usado para la generación de biopolímeros encontrados en suturas quirúrgicas o prótesis. En cosmético funge como hidratante por su capacidad de retención de líquidos, y se ha demostrado que tiene efectos de rejuvenecimiento y aclaramiento de piel por su capacidad de suprimir la formación de tirosinasa.

En la industria química o generación de materia prima para la misma, es usado para producir la base de productos altamente demandador por los consumidores como por ejemplo polímeros para plásticos y fibras (liderado actualmente por PLA con un mercado con tasa de crecimiento anual de 18.7% actualmente), disolventes para formulación y preparación de químicos de limpieza, o químicos industriales oxigenados (propilenglicol, óxido propileno, ácido acrílico, éster de acrilato, entre otros). Varios de sus catalogados son catalogados como solventes “verdes” ya que son amigables con el ambiente; particularmente los ésteres de lactato que son reconocidos como ingredientes inertes con toxicidad insignificante y excelente perfil ambiental por parte de la Agencia de Protección de Ambiente de los Estados Unidos de América (EPA por sus siglas en inglés) [6].

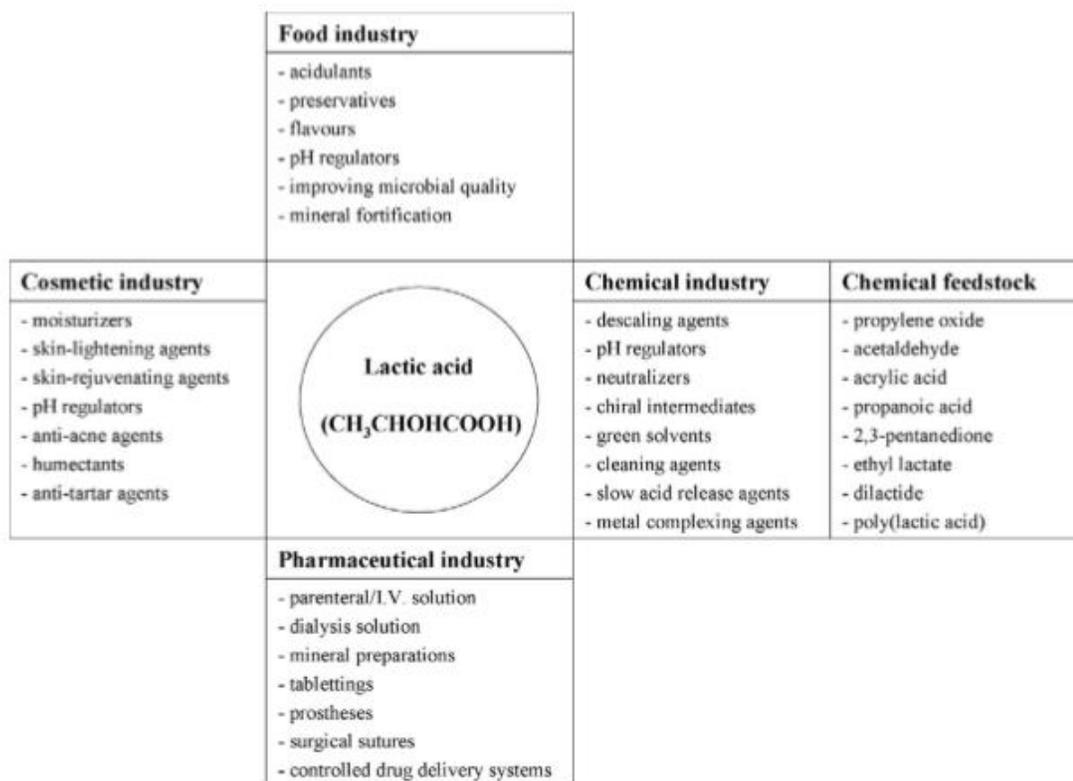


Figura 8. Diagrama de aplicaciones comerciales para el ácido láctico en distintas presentaciones. [6]

E. Mercado a nivel mundial

Por sus múltiples aplicaciones en la industria, el ácido láctico ha aumentado considerablemente su demanda el mercado mundial y pretende seguir en aumento en un futuro próximo. En el año 2013, el mercado global de ácido láctico fue estimado en 714.2 kilotoneladas y se espera alcance los 1,960.1 kilotoneladas para finales del año 2020; teniendo una tasa compuesta de crecimiento (CAGR por sus siglas en inglés) de 15.5% entre los años 2014 al 2020 (Figura 9). Por otra parte, en términos de ingresos, el mercado fue evaluado en USD 1.29 billones (cifra equivalente a Q9.94 billones al cambio de \$1 por Q7.70319) y se espera alcanzar cifras de USD 4.31 billones (cifra equivalente a Q33.2 billones al cambio de \$1 por Q7.70319). Se tiene pronóstico de mantener el crecimiento con un CAGR de 18.7% desde el año 2018 al año 2025, esperando obtener ingresos de USD 8.7 billones (cifra equivalente a Q67.0 billones al cambio de \$1 por Q7.70319). [8]

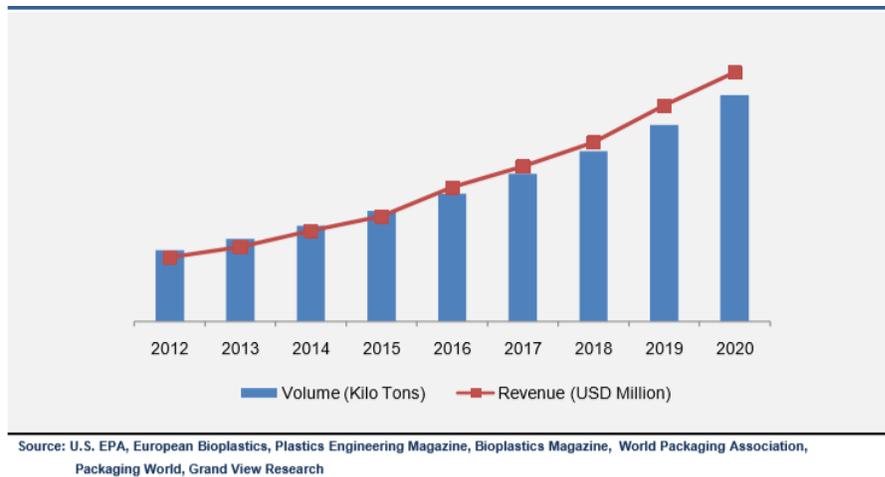


Figura 9. Mercado global de ácido láctico (volumen e ingresos) entre el año 2012 al año 2020. [8]

El avance tecnológico en las metodologías de producción de ácido láctico ha incrementado la viabilidad de utilización de materias primas de fuentes renovables (melaza, almidón, celulosa, entre otros) como fuente de carbono; repercutiendo directamente en una disminución significativa de costos por sustrato. Por el incremento en la sustitución de fuentes, los ingresos pronosticados en base a datos históricos por la utilización de los mismos se reflejan en la siguiente Figura [8]:

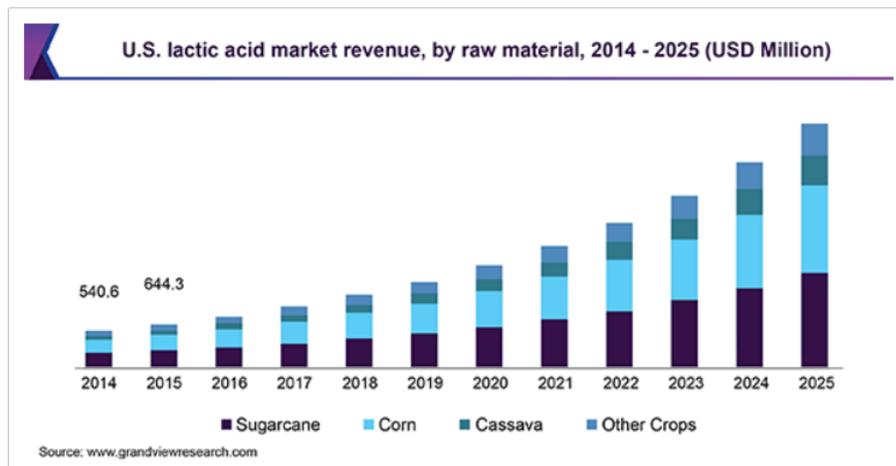


Figura 10. Pronóstico de ingresos de distintos materiales para el año 2025 por su uso como fuente de carbono sustituto en la producción de ácido láctico.

F. Cinética química

Se le denomina cinética química al área de estudio de la velocidad o rapidez con la que ocurre una reacción. Esta abarca aspectos tales como: la predicción de la velocidad que tendrá una reacción a condiciones de operación determinadas (temperatura, concentración, catalizador, entre otras) y la comprensión del mecanismo por el que tiene lugar la reacción operada.

La velocidad de reacción indica la variación de una propiedad específica en el tiempo, en otras palabras, expresa la rapidez con la que se consume un reactivo dado o se forma un producto. Esta se ve afectada por factores como la concentración de reactivos y productos según su índole, temperatura, presión, modelo de contacto, entre otros [20].

Ecuación 1. Variación de propiedad cuantitativa con el tiempo

$$v = \frac{\Delta x}{\Delta t}$$

En donde:

v : Velocidad

x : Propiedad (concentración, conductividad, entre otros)

t : Tiempo

A su vez existen factores de los cuales la velocidad de reacción depende: 1) concentración, en donde se define la ecuación de velocidad (relación entre la última con las concentraciones de reactivos o productos), el orden de reacción y las constantes correspondientes de velocidad; 2) temperatura, en sistemas no isotérmicos en donde la velocidad de reacción se ve afectada por el cambio de temperatura se aplica la ecuación de Arrhenius (ecuación 2); 3) catálisis, efecto de la modificación de la velocidad de reacción sin sufrir un cambio permanente en el procesos como consecuente del uso de catalizadores [20].

Ecuación 2. Ecuación de Arrhenius.

$$k = k_0 * e^{\frac{-Ea}{RT}}$$

En donde:

k : Constante de velocidad de reacción

k_0 : Factor pre exponencial o factor de frecuencia

Ea : Energía de activación del sistema

R : Constante de gases

T : Temperatura

G. Reactor intermitente ideal

Denominado reactor intermitentes ya que opera de manera no estacionaria, en donde existe una única carga inicial, un tiempo de reacción y por último una descarga completa del volumen; es decir, se tiene una composición variando con el tiempo, aunque considerada uniforme en todos los puntos del reactor [11].

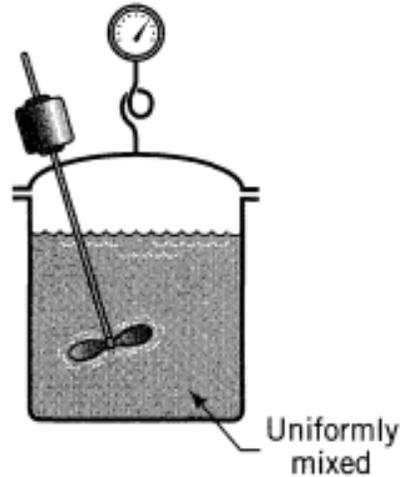


Figura 11. Reactor intermitente ideal [11]

Debido a que no existe entrada o salida alguna de reactor durante la reacción, el balance de materia descrita para un componente específico corresponde a la velocidad de pérdida del reactivo por reacción química equivalente al negativo de la velocidad de acumulación de reactivo, ambos dentro del elemento de volumen. La desaparición y acumulación del componente específico se encuentran relacionados de manera que [11]:

Ecuación 3. Ecuación de desaparición del componente A por reacción.

$$(-r_A)V = -N_{A0} * \frac{dX_A}{dt}$$

En donde:

$-r_A$: Velocidad de reacción del componente A

V : Volumen del fluido

N_{A0} : Número de moles iniciales del componente A

$\frac{dX_A}{dt}$: Cambio de la fracción de componente A que ha reaccionado en el tiempo.

H. Análisis químico.

Se denomina análisis químico a la parte práctica de la Química Analítica en la cual se aplican distintos métodos de análisis desarrollados en la última, con la finalidad de resolver problemas de identificación y naturaleza química de la materia. En general, este puede clasificarse de dos maneras: análisis cuantitativo, en donde se establece la identidad química de las especies en la muestra; y análisis cualitativo, determinación numérica de las especies que componen la muestra.

En un análisis cuantitativo, los métodos analíticos pueden clasificarse en: 1) métodos clásicos, basado en propiedades químicas del analito (gravimetría o volumetría); 2) métodos instrumentales, basado en propiedades fisicoquímicas, y se subdivide según la propiedad a medir; 3) de separación, cuya finalidad es la separación para identificar especies individuales, eliminar interferencias o facilitar la medida posterior con otro método [3].

1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución, por sus siglas en inglés *HPLC*, consiste en un método de separación para análisis químico basado en la separación de componentes de una mezcla. Consiste en una columna o fase estacionaria no polar, generalmente de sílice tratada, y una fase móvil que actúa como portador de la muestra. El análisis de la muestra principia con la inyección de esta en la fase móvil, luego los componentes de la solución emigran de acuerdo sus interacciones no covalentes que tengan con la columna; los distintos tiempos de las interacciones químicas determinan la separación de los contenidos de la muestra. Su aplicación es principalmente para la separación de compuestos orgánicos semi volátiles [3].

2. Cuantificación de población microbiana.

Existen distintos métodos para la determinación de manera cuantitativa de la población microbiana en un sistema; sin embargo, el método a utilizar puede diferir de acuerdo a su finalidad de dos maneras: identificación del número de células o densidad celular. El método estándar para la identificación del número de células es recuento en placa, el cual consiste en diluir una muestra para hacer un conteo individual de bacterias con mayor precisión, a manera de determinar y distinguir (por tamaño o forma) las unidades formadoras de colonias distintas (UFC). Se trabaja bajo la suposición de que cada célula viable se puede convertir en una única colonia discreta (UFC), lo que significa que, el número de colonias indica el número de bacterias que pueden crecer en las condiciones de incubación empleadas. En dicho método se tienden a usar herramientas específicas que faciliten el conteo celular como la cámara de Neubauer que delimita secciones de población mediante la utilización de una malla cuadrada [13].

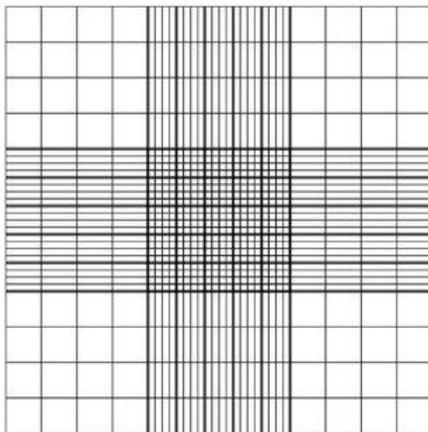


Figura 12. Imagen de la malla cuadriculada visible en una cámara de Neubauer utilizada para conteo celular [13].

Por otra parte, la densidad celular de una muestra puede ser calculada comúnmente por dos métodos de manera indirecta: turbidimetría y gravimetría o peso seco. La turbidimetría se basa en la capacidad de los cultivos celulares de absorber luz, mediante el uso de un espectrofotómetro y ecuaciones respectivas se determina la cantidad total de células en la muestra analizada (vivas o muertas); se tiene entonces que, a mayor turbidez mayor concentración celular. El método gravimétrico o peso seco consta de la utilización de balanzas analíticas para definir la masa bacteriana en una muestra después de que se le ha eliminado el agua en su totalidad. Este último método posee las limitaciones de no diferenciar entre células vivas de las muertas y que puede incurrir en mediciones erróneas si no se corrigen los resultados por la presencia de sólidos distintos a biomasa [13].

I. Berkeley Madonna

Berkeley Madonna corresponde al nombre de un software utilizado para la resolución numérica de sistemas de ecuaciones diferencias ordinarias (EDO), ecuaciones diferenciales y ecuaciones diferenciales estocásticas. Así mismo, brinda al usuario la oportunidad de generar modelos matemáticos mediante un editor de texto simple o utilizando una interfaz gráfica intuitiva; a medida que se crea el modelo visual, las ecuaciones correspondientes se ensamblan automáticamente.

Consiste en una plataforma altamente utilizada a nivel mundial, no solo en el ámbito laboral sino también en el académico tanto a profesionales graduados como a personal con poca formación computacional; con la finalidad de difundir el conocimiento de la construcción y simulaciones de modelos a partir de la literatura científica e investigaciones de vanguardia [12].

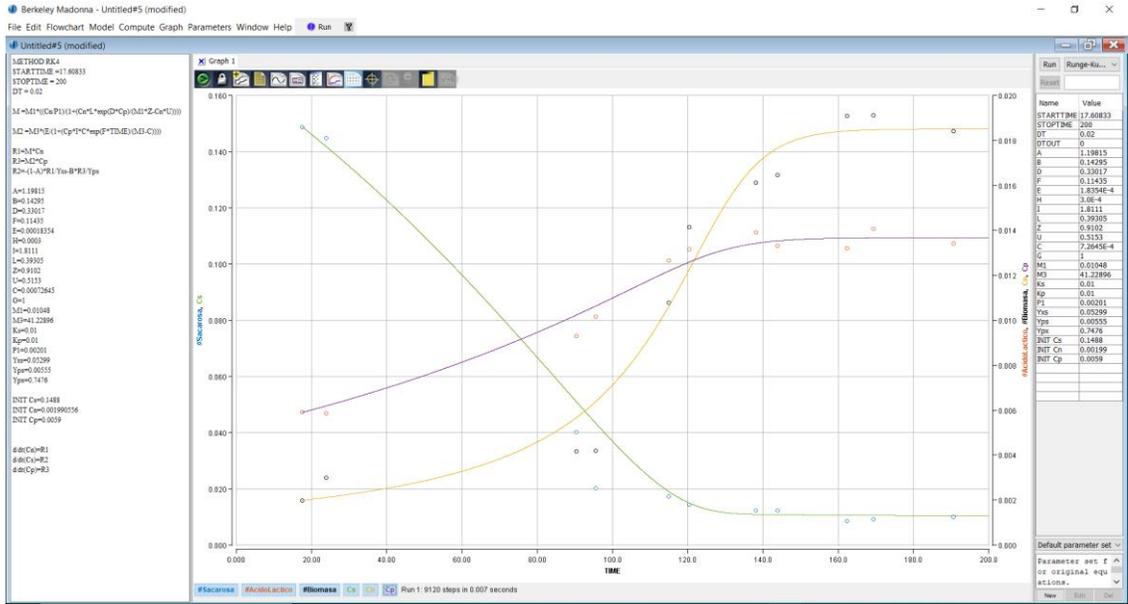


Figura 13. Ejemplo de plataforma del software Berkeley Madonna [12]

V. ANTECEDENTES

En la Universidad del Valle de Guatemala se han realizado estudios anteriormente acerca del ácido láctico y su producto posteriormente deseado PLA. En el año 2011 se realizó un estudio de la *obtención de ácido láctico a partir de la caña de azúcar*, PROYECTO FODECYT No. 003-2008. En él, emplearon dos tipos de microorganismos para la comprobación de ácido láctico de trocitos de caña a punto de corte: bacterias lácticas (entre las cuales destacó *L. lactis* DSM 4366) y el hongo *R. oryzae* CBS 146.22. El mayor rendimiento fue alcanzando por parte del hongo, con un valor de 0.89, y ambos presentaron una inhibición por ácido láctico disociado acumulado cuando el pH descendió por debajo de 4.6 [18].

Por otra parte, cabe mencionar del estudio anterior, la evaluación realizada a distintos medios de cultivo con el fin de aumentar el rendimiento y la tasa de producción de ácido láctico; dentro de las opciones de medio se tuvo la melaza como opción. En dicha etapa las bacterias lácticas *B.coagulan* DSM 23080, *L. lactic* DSM 4366 y *L.paracasei* DSM 2008 usaron como fuente de carbono la glucosa o sacarosa presente, y en medios más complejos como el jugo de caña, consumieron también fructosa. Determinaron que las bacterias requerían de una fuente compleja de nitrógeno y vitaminas, extracto de levadura adicional en proporción de 5 g/L y K₂HPO₄ en proporción de 1g/L; mientras que el hongo asimiló sin problemas los tres tipos de azúcar, este requirió únicamente de una fuente de nitrógeno inorgánico adicional en el medio [18].

Es de alta importancia la determinación del tipo y especie de cepa fermentadora a utilizar, como previamente se describió en la parte de marco teórico, no solo para la determinación de posibles subproductos sino también la viabilidad que se tiene para utilizar distintas fuentes de carbono como sustrato. La posibilidad de utilizar distintas fuentes de carbono, o de mayor complejidad, permite en aspectos económicos la reducción de costos en procesos industriales o de mayor escala en donde la inversión y área financiera poseen gran peso en la tomas de decisiones. En un estudio realizado por Weiss, N.; Schillinger, U; y Kandler, T. en 1983 de *Lactobacillus lactis*, *lactobacillus leichmannii* y *Lactobacillus bulgarius* como sinónimos subjetivos de *Lactobacillus delbruekkii*, con el objetivo de analizar la similitud homológica entre cepas y su capacidad de consumo de distintas azúcares; se demostró que la cepa *Lactobacillus leichmannii* es capaz de fermentar glucosa, fructuosa, sacarosa y otros disacáridos de mayor complejidad. El cuadro de la siguiente figura demuestra sus resultados de la capacidad fermentativa de los distintos microorganismos estudiados [14].

Table 1. Carbohydrate fermentation pattern and cleavage of arginine

Original designation	Amygdalin	Cellobiose	Esculin	Galactose	Lactose	Maltose	Mannose	Melibiose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Trehalose	Ammonia from arginine	New designation <i>L. delbrueckii</i>
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20074*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	} subsp. <i>delbrueckii</i>
<i>L. delbrueckii</i> NCDO 1744	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. leichmannii</i> DSM 20076*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	} subsp. <i>lactis</i>
<i>L. leichmannii</i> DSM 20355	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. leichmannii</i> NCDO 2486	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. lactis</i> DSM 20072*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. lactis</i> DSM 20073	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. lactis</i> NCDO 270	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. lactis</i> NCDO 280	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. lactis</i> NCDO 820	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. lactis</i> isolate 14/83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>L. bulgaricus</i> DSM 20081*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	subsp. <i>bulgaricus</i>

All strains fermented glucose and fructose; none fermented ribose, arabinose, xylose, rhamnose, mannitol, sorbitol, melezitose and gluconate. + = not determined; * = type strain.

Figura 14. Capacidad de *L. delbrueckii*, *L. Leichammii*, *L. lactis* y *L. bulgaricus* de fermentación de distintos sustratos para la formación de ácido láctico [14]

El modelo cinética del proceso fermentativo para la producción de un producto deseado no solo brinda la data que explique el comportamiento de componentes como sustrato, producto y biomasa, sino que permite e diseño de equipo o procesos en donde se pueda controlar las condiciones del sistema; así mismo hace factible la posibilidad de escalamiento de procesos en planta piloto a aquellos industriales de mayor magnitud. En 1996 Moteagudo, J. *et al* realizaron un estudio en la Universidad de Castilla-La Mancha,

España, en donde plantearon un modelo cinético para la formación de ácido láctico con *Lactobacillus delbrueckii* CECT 286 a partir de melaza de remolacha en un procesos de tipo intermitente; obteniendo un coeficiente de rendimiento de ácido láctico frente a sacarosa de 0.91. Su modelo plantea un crecimiento microbiano en el tiempo definido por la tasa específica de crecimiento, dada por la ecuación de Monod, multiplicado por la concentración de biomasa y un término $(1-P/P_{\max})$ que representa el crecimiento restringido por la inhibición de formación de producto [16]:

Ecuación 4. Función de cinética microbiana en el tiempo planteada por Monteagudo *et al.*

$$dX/dt = \mu X(1 - P/P_{\max})$$

En donde:

$$\mu = \mu_{\max}[S/(K_S + S)]$$

A su vez, la expresión utilizada para la formación de producto (ecuación 4) se basa en el estudio de Luedeking y Piret en donde establecen una producción por la combinación de la atribución asociada y no asociada al crecimiento microbiano. El modelo lo adaptaron a su estudio incluyendo el mismo factor de inhibición por producto establecido en la cinética de crecimiento microbiano. Finalmente, la función para el consumo de sustrato en el tiempo (ecuación 5) se asoció al consumo de sustrato para crecimiento microbiano, el sustrato requerido para la formación de ácido láctico y el necesario para el mantenimiento microbiano. El acoplamiento del modelo a la data experimental obtenida en el estudio se observa en la Figura 15, por otra parte, en la Figura 16 se presentan los parámetros de fermentación resultantes [16].

Ecuación 5. Función cinética de formación de ácido láctico en el tiempo planteada por Monteagudo *et al* [16].

$$dP/dt = (A dX/dt + BX)(1 - P/P'_{\max})$$

Ecuación 6. Función cinética de consumo de sustrato en el tiempo planteada por Monteagudo *et al* [16].

$$dS/dt = -1/Y_{X/S} dX/dt - 1/Y_{P/S} dP/dt - mX$$

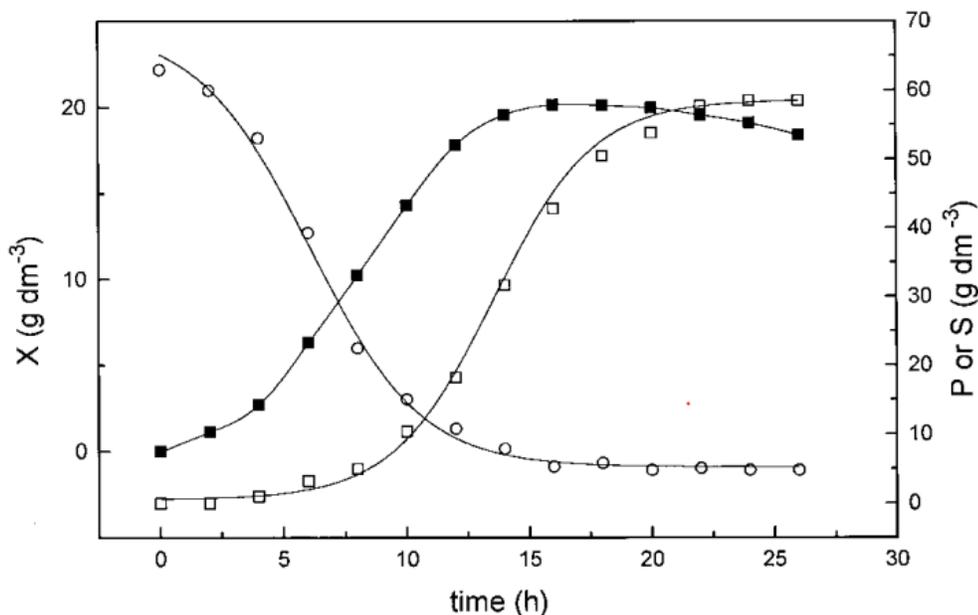


Figura 15. Simulación matemática de fermentaciones batch obtenido en experimentación por Monteagudo *et al*, (-), modelo teórico; (○ sacarosa, □ ácido láctico, ■ biomasa) data experimental [16].

TABLE 2
Fermentation Parameters for *L. delbrueckii* Grown on Beet Molasses

A (g lactic acid g^{-1} biomass)	0.235
B (g lactic acid h^{-1})	0.087
m (g sucrose $h^{-1} g^{-1}$ biomass)	0.090
μ_{max} (h^{-1})	0.831
$Y_{X/S}$ (g cells g^{-1} sucrose)	0.270
$Y_{P/S}$ (g lactic acid g^{-1} sucrose)	0.910

Figura 16. Parámetros de fermentación para *L. delbrueckii* utilizando melaza de remolacha, por Monteagudo *et al* [16].

No obstante, no siempre es posible modelar el crecimiento microbiano con la tasa de crecimiento específico dependiente de la concentración de sustrato como lo presenta la ecuación de Monod. En 1994, Abdeltif Amrane y Yves Prigent desarrollaron un modelo matemático para la formación de ácido láctico en un proceso intermitente a partir de lactosa y utilizando *Lactobacillus helveticus* cepa *milano*. En este, se genera una curva de tipo sigmoidea en donde la tasa de crecimiento específico para la ecuación cinética de

crecimiento de microorganismos con inhibición se encuentra dependiente de la concentración de ácido láctico formado y coeficientes constantes de inhibición del modelo [1]:

Ecuación 7. Ecuación de tasa de crecimiento específico para el modelo del cambio de microorganismos en el tiempo establecido por Armane y Prigent.

$$\mu = \frac{dx}{x dt} = \mu_m \frac{1}{1 + \frac{c e^{dt}}{\mu^m - c}}$$

Adicionalmente, la ecuación utilizada para el modelo de formación de ácido láctico (ecuación 8) expresa la dependencia de la concentración de producto en la tasa de crecimiento específica, junto a coeficientes de producción asociado al crecimiento, aquel asociado al mantenimiento y otro adicional que permite la una mejor convergencia de datos (ver Figura 17 y 18 para gráficas de modelado y Figura 19 para parámetros cinéticos) [1].

Ecuación 8. Función cinética de formación de ácido láctico en el tiempo planteada por Armane y Prigent [1].

$$\frac{dp}{dt} = \{A\mu + B[1 - \exp(-F\mu)]\} x$$

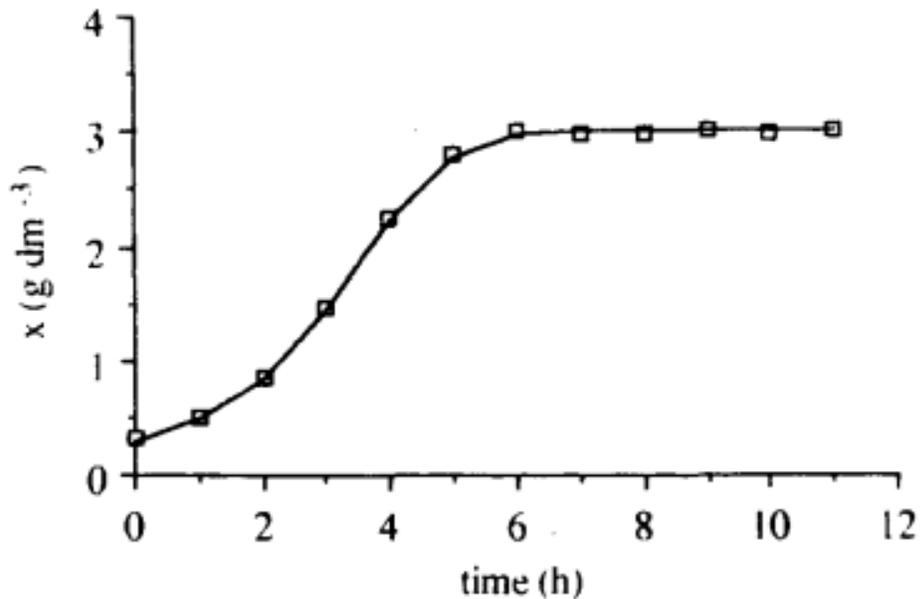


Figura 17. Variación de biomasa de *L. helveticus* durante fermentación batch. (□): concentración de biomasa total observada; (-): modelo generado por Armane y Prigent [1].

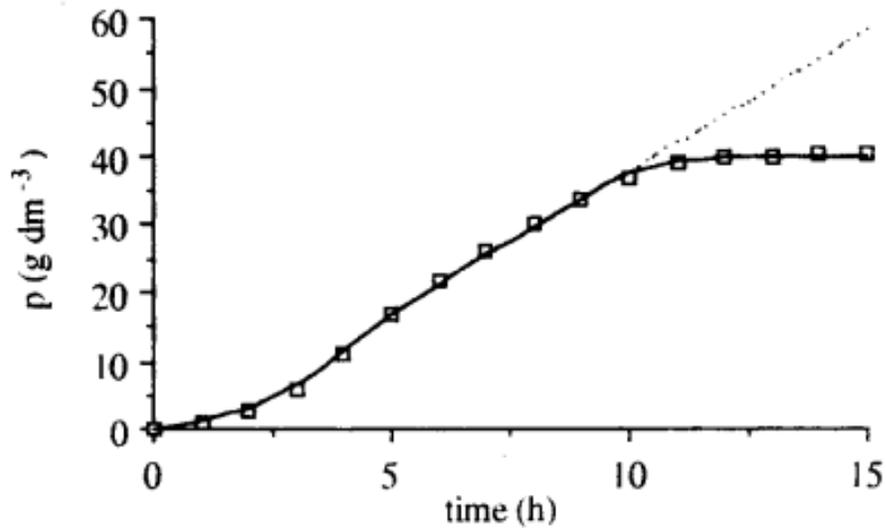


Figura 18. Cinética de producción de ácido láctico en fermentación batch. (□): data observada de ácido láctico producido; (-): modelo generado por Armane y Prigent [1].

TABLE 1
Optimal Set of Parameters Determined for Bacterial Growth and Lactic Acid Production Kinetics

$\mu_m(h^{-1})$	$c(h^{-1})$	$d(h^{-1})$	$a(h^{-1})$	b ($dm^3 g^{-1}$)	A	$B(h^{-1})$	$F(h)$
0.56	0.00467	1.67	0.00985	0.319	3.219	1.359	34790

Figura 19. Parámetros determinados para cinética de crecimiento microbiano y producción de ácido láctico [1].

VI. METODOLOGÍA

A. PRIMERA ETAPA: Producción fermentativa de ácido láctico

1. Inversión de azúcares de melaza

- a. Introducir en Erlenmeyer de 250 mL, 75 mL de melaza, 75 mL de agua destilada y agitador magnético.
- b. Introducir en bureta de 25mL, ácido sulfúrico fumante (H_2SO_4 , ver Cuadro 19 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificación del reactivo) y colocar en soporte universal utilizando pinzas.
- c. Posicionar el Erlenmeyer en estufa con agitación a modo que quede posicionado debajo de la boquilla de la bureta con H_2SO_4 .
- d. Posicionar, usando pinzas y el soporte universal, un termómetro de bulbo (rango de 0-100°C) dentro de la solución de melaza y agua en el Erlenmeyer.
- e. Encender la agitación a 250 rpm y la temperatura a 90°C. Esperar a que la mezcla en Erlenmeyer se homogenice.
- f. Entre los 25 y 28°C, agregar por goteo el ácido sulfúrico en la solución de melaza hasta alcanzar el pH de 4. Medir el pH utilizando un potenciómetro digital.
- g. Dejar calentar el sistema de manera gradual, una vez alcanzado el pH requerido, hasta alcanzar 80°C (lectura en termómetro de bulbo). Mantener la agitación constante.
- h. Medir 45 minutos usando cronómetro cuando el sistema haya alcanzado los 80°C.
- i. Introducir el producto resultante en un tubo de ensayo limpio y con tapadera, rotulado de manera correspondiente.
- j. Preparar en otro tubo de ensayo, utilizando una micropipeta de 1000µl, una dilución 1:10 de melaza invertida y agua destilada para análisis de cromatografía líquida.
- k. Repetir procedimiento anterior variando pH: 4, 2.5 y 1; y tiempo de reacción: 45,60 y 90 minutos (90 minutos para la condición de pH 1 únicamente)

2. Crecimiento microbiano y preparación inóculo

- a. Pesar en papel parafinado con una balanza analítica (ver Cuadro 25 para especificaciones de equipo usado), 33g de agar sólido MRS marca *Scharlau* (ver Cuadro 23 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificación del reactivo)
- b. Medir con probeta de 100mL, 500 mL de agua destilada e introducir en Erlenmeyer de 1000 mL. Posicionar el Erlenmeyer en estufa con agitación e introducir un agitador magnético.
- c. Encender la agitación de la estufa a 150 rpm e incorporar los 33g de agar sólido pesado previamente. Mantener la agitación constante.
- d. Calentar la solución de agar hasta el punto de ebullición, asegurando que se disuelva todo el agar.
- e. Encender el autoclave, posicionar la temperatura a 121°C e introducir agua destilada hasta el nivel requerido por el equipo.
- f. Tapar la boquilla de Erlenmeyer con papel aluminio y hacer un pequeño agujero en el tope para liberar presión durante la esterilización
- g. Ingresar el Erlenmeyer tapado en el autoclave y poner a funcionar el equipo. Una vez alcance la temperatura de 121°C, dejar esterilizar por 15 minutos.
- h. Desinfectar una superficie con etanol y posicionar la cantidad de mecheros de alcohol requeridos para mantener las cajas Petri a llenar estériles (6-8 cajas por mechero aproximadamente). Encender los mecheros.
- i. Sacar el Erlenmeyer del autoclave utilizando guantes de seguridad y verter en las cajas Petri (posicionadas alrededor de cada mechero) la cantidad de agar indicado por la misma.
- j. Dejar enfriar con tapadera media puesta y cerrar hasta alcanzar la temperatura ambiente. El agar debe tener una consistencia sólida.
- k. Desinfectar área en campana de extracción con etanol.
- l. Destapar paquete con cepa *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, quebrar el contenido y frotar el hisopo interno a manera de asegurar la captura de la cepa.
- m. Agarrar una caja Petri con agar ya sólido, y sembrar con el hisopo con *Lactobacillus leichmannii* haciendo estrías sobre la superficie.
- n. Repetir el paso anterior hasta completar el número de cajas Petri con agar RMS preparadas anteriormente.

- o. Introducir cajas Petri ya sembradas en incubadora a 35°C (ver Cuadro 30 para especificaciones de equipo usado), por un periodo de 48h.
- p. Pesar con papel parafinado, en balanza analítica, 44 g de medio líquido MRS para lactobacilos marca *Criterion* (ver Cuadro 24 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo).
- q. Medir con probeta de 100mL, 800 mL de agua destilada e introducir en beaker de 1000 mL. Posicionar el beaker en estufa con agitación e introducir un agitador magnético.
- r. Encender la agitación de la estufa a 150 rpm e incorporar los 44 g de medio líquido MRS pesado previamente. Mantener la agitación constante.
- s. Calentar la solución de agar hasta el punto de ebullición, asegurando que se disuelva todo el sólido.
- t. Encender el autoclave, posicionar la temperatura a 121°C e introducir agua destilada hasta el nivel requerido por el equipo.
- u. Trasvasar el medio líquido MRS a frascos de 250mL de vidrio (previamente lavados) utilizando probeta de 100mL. Introducir en cada frasco 200 mL de medio y cerrar con tapón sin enroscar por completo.
- v. Ingresar los frascos en el autoclave y poner a funcionar el equipo. Una vez alcance la temperatura de 121°C, dejar esterilizar por 20 minutos.
- w. Sacar los frascos del autoclave utilizando guantes de seguridad y enroscar por completo la tapadera. Dejar enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente.
- x. Extraer de incubadora las cajas Petri y en caso de no tener listo el medio líquido para inóculo, dejar enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente y luego refrigerar envueltas en papel aluminio hasta su momento de uso.
- y. Tomar una caja Petri con cultivo ya crecido, y con un asa de siembra previamente esterilizada, tomar una muestra de *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 (ver Figura 33 en apartado de *ilustraciones*).
- z. Introducir la muestra tomada anteriormente en un frasco con medio líquido MRS a temperatura ambiente. Realizar procedimiento en campana de extracción previamente desinfectada.
- aa. Cerrar el frasco con muestra e introducir a agitador con incubadora (ver Cuadro 29 para especificaciones de equipo usado), a 35°C por 48h. Repetir procedimiento hasta que estén posicionados todos los frascos en el agitador.

- bb. Tomar una alícuota de 1mL con una micropipeta del inóculo preparado, luego de transcurrido 48h, y realizar conteo celular por peso seco (120°C) en balanza de humedad marca OHAUS (ver Cuadro 26 para especificaciones de equipo usado). Determinar la concentración utilizando el cálculo 3 del apartado de cálculos de muestra en *apéndice*.
3. Fermentación para análisis comparativo de rendimiento entre melaza con y sin azúcares invertidas.
- a. Sistemas con melaza no invertida.
- 1) Medir 70 mL de melaza previamente diluida con agua esterilizada (2:1) utilizando una probeta de 100mL y verter en Erlenmeyer de 250mL. Introducir así mismo 105mL de agua destilada.
 - 2) Pesar con papel parafinado, en balanza analítica (ver Cuadro 25 para especificaciones de equipo usado), 0.8750 gramos de peptona de carne (ver Cuadro 20 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo) y 0.8750 gramos de extracto de levadura (ver Cuadro 21 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo). Verter en Erlenmeyer con agua y melaza.
 - 3) Posicionar el Erlenmeyer en estufa con agitación y agitador magnético introducido. Calentar sistema con agitación constante a 35°C para asegurar la disolución los sólidos por completo.
 - 4) Tapar sistema con tapón correspondiente, introducir a autoclave y esterilizar por 15 minutos a 121°C.
 - 5) Sacar Erlenmeyer ya estéril del autoclave utilizando guantes de seguridad y dejar enfriar, sin abrir, a temperatura.
 - 6) Dividir la cantidad de inóculo requerida por el sistema (ver sección de *crecimiento microbiano y preparación de inóculo*) en 8 tubos de vidrio de 10 mL con tapón para centrifuga manera que todos queden con un volumen equitativo.
 - 7) Introducir frascos en centrifuga marca Fisher Scientific y operar a 1200 rpm durante 15 minutos.
 - 8) Decantar líquido sobrante luego de centrifugación y diluir sólidos (biomasa) en 0.5 mL de caldo fermentativo ya esterilizado. Verter la dilución en Erlenmeyer.
 - 9) Introducir Erlenmeyer ya inoculado a agitador con incubadora durante 144h a 35°C (ver Cuadro 29 para especificaciones de equipo usado), muestreo únicamente al finalizar el periodo. Repetir proceso hasta completar los tres sistemas, variando la cantidad de melaza y agua de uno de ellos a 50.8mL y 124.2mL respectivamente.

b. Sistemas con melaza invertida

- 1) Medir 75 mL de melaza previamente hidrolizada (ver sección de *inversión de azúcares en melaza*; condiciones de pH 1 y 60 minutos de reacción) utilizando una probeta de 100mL y verter en Erlenmeyer de 250mL. Introducir así mismo 100mL de agua destilada.
- 2) Posicionar el Erlenmeyer en estufa con agitación y agitador magnético introducido.
- 3) Calentar sistema con agitación constante a 25°C mientras se vierte con espátula hidróxido de potasio marca Fermont (pureza de 87.7%, ver Cuadro 22 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo) hasta alcanzar pH de 5.8-6.0. Realizar medición de pH con potenciómetro digital.
- 4) Pesar con papel parafinado, en balanza analítica (ver Cuadro 25 para especificaciones de equipo usado), 0.8750 gramos de peptona de carne (ver Cuadro 20 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo) y 0.8750 gramos de extracto de levadura (ver Cuadro 21 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo). Verter en Erlenmeyer con agua y melaza invertida a pH corregido.
- 5) Mantener sistema con agitación constante a 25°C para asegurar la disolución los sólidos por completo.
- 6) Tapar sistema con tapón correspondiente, introducir a autoclave y esterilizar por 15 minutos a 121°C.
- 7) Sacar Erlenmeyer ya estéril del autoclave utilizando guantes de seguridad y dejar enfriar, sin abrir, a temperatura.
- 8) Dividir la cantidad de inóculo requerida por el sistema (sección de *crecimiento microbiano y preparación de inóculo*) en 8 tubos de vidrio de 10 mL con tapón para centrífuga, a manera que todos queden con volumen equitativo.
- 9) Introducir frascos en centrifuga marca Fisher Scientific y operar a 1200 rpm durante 15 minutos.
- 10) Decantar líquido sobrante luego de centrifugación y diluir sólidos (biomasa) en 0.5 mL de caldo fermentativo ya esterilizado. Verter la dilución en Erlenmeyer.
- 11) Introducir Erlenmeyer ya inoculado a agitador con incubadora durante 144h a 35°C (ver Cuadro 29 para especificaciones de equipo usado), muestreo únicamente al finalizar el periodo. Repetir proceso hasta completar los tres sistemas con las mismas condiciones.

4. Fermentación a escala mayor en bioreactor *Bioflo 415*

- a. Medir 3.5L de melaza de caña de azúcar con un pichel de 2L y diluir en cubeta con 12.50L de agua suavizada.
- b. Pesar con papel parafinado, en balanza analítica (ver Cuadro 25 para especificaciones de equipo usado), 80 gramos de peptona de carne (ver Cuadro 20 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo) y 80 gramos de extracto de levadura (ver Cuadro 21 en *datos de reactivos* apartado de *apéndice* para especificaciones del reactivo).
- c. Verter la peptona de carne y el extracto de levadura en beaker de 2000 mL. Introducir 1000 mL de agua esterilizada utilizando una probeta de 100mL.
- d. Posicionar le beaker con agua y nutrientes en estufa con agitación y agitador magnético introducido. Calentar sistema con agitación constante a 45°C hasta disolver los sólidos por completo.
- e. Añadir la solución con nutrientes en la cubeta con melaza y agua. Agitar con paleta de madera hasta generar una mezcla homogénea de 16 L aproximadamente.
- f. Trasvasar, utilizando un embudo de vidrio, el caldo fermentativo previamente preparado al reactor fermentador BioFlo 415 (ver Cuadro 31 para especificaciones de equipo usado). Realizar un “*ciclo de esterilización*” al caldo fermentativo en el biorreactor de 3 horas a 110°C.
- g. Dividir la cantidad de inóculo requerida (sección de *crecimiento microbiano y preparación de inóculo*) en 8 tubos plásticos de 50 mL con tapón para centrífuga (ver Cuadro 27 para especificaciones de equipo usado), a manera que todos queden con un volumen equitativo (ver Figura 35 en *ilustraciones*).
- h. Introducir frascos en centrifuga marca Eppendorf AG y operar a 1200 rpm durante 15 minutos a 30°C.
- i. Decantar líquido sobrante luego de centrifugación y diluir sólidos (biomasa) en 2 mL de caldo fermentativo ya esterilizado. Verter la dilución en bioreactor utilizando un embudo de vidrio previamente esterilizado.
- j. Repetir proceso de centrifugación hasta completar la cantidad de inóculo requerido para alcanzar 0.002 g/mL de biomasa inicial en el sistema (ver cálculo 3 en cálculos de muestra, apartado de *apéndice*, para la determinación de inóculo requerido). Este representa el tiempo 0h.
- k. Introducir inóculo ya centrifugado, utilizando un embudo de vidrio, en el equipo de bioreactor (tiempo: 0h) y fermentar a 35°C y 150 RPM durante 190.7 horas.

- l. Realizar toma de muestras del biorreactor en tubo de ensayo con tapadera, 5-10 mL para análisis de azúcares, ácido láctico y biomasa, cada dos horas (dentro de los horarios disponibles de asistencia a laboratorio) hasta completar el periodo de fermentación (190.7 h). Almacenar en recipiente debidamente identificado en refrigerador hasta el momento de realización de análisis correspondiente.
- m. Al finalizar el periodo de fermentación drenar el contenido producido y almacenar en recipiente correspondiente para la purificación posterior del ácido láctico.
- n. Realizar proceso de esterilización por 3 horas a 110°C con agua del biorreactor para evitar futura corrosión o mal funcionamiento.

5. Análisis de muestras

- a. Cuantificar azúcares en cada muestra realizada según lo establecido previamente (ver secciones de *fermentación*).
 - 1) Tomar con una micropipeta de 1000µl, 0.5mL de la muestra correspondiente de fermentación y verter en tubo de ensayo de vidrio con tapón previamente lavado y esterilizado.
 - 2) Introducir en tubo de ensayo de vidrio con tapón anterior, 4.5mL de agua destilada medida con micropipeta de 1000µl. Agitar para homogeneizar.
 - 3) Filtrar una alícuota de 0.5-1 mL de la muestra preparada anteriormente utilizando una jeringa y microfiltro de 5 µm.
 - 4) Realizar análisis de cromatografía líquida con detector de índice de refracción utilizando columna Hi plex H.
- b. Cuantificar ácido láctico en cada muestra realizada lo establecido previamente (ver secciones de *fermentación*).
 - 1) Tomar con una micropipeta de 1000µl, 0.5mL de la muestra correspondiente de fermentación y verter en tubo de ensayo de vidrio con tapón previamente lavado y esterilizado.
 - 2) Introducir en tubo de ensayo de vidrio con tapón anterior, 4.5mL de agua destilada medida con micropipeta de 1000µl. Agitar para homogeneizar.
 - 3) Filtrar una alícuota de 0.5-1 mL de la muestra preparada anteriormente utilizando una jeringa y microfiltro de 5 µm.
 - 4) Realizar análisis de cromatografía líquida con detector de índice de refracción utilizando columna Hi plex H.

- c. Cuantificar concentración microbiana en cada muestra realizada según lo establecido previamente (ver secciones de *fermentación*).
- 1) Tomar alícuota de 10mL de muestra tomada en un momento específico. Medir con una probeta de 10mL.
 - 2) Introducir alícuota anterior en tubo plástico para centrifugación junto a 30mL de agua destilada medida con probeta de 50 mL. Cerrar con tapón correspondiente.
 - 3) Agitar hasta homogeneizar. Repetir pasos anteriores hasta completar con 8 tubos de muestra.
 - 4) Centrifugar en equipo marca Fisher Scientific y operar a 2500 rpm durante 20 minutos (ver Cuadro 30 para especificaciones de equipo usado).
 - 5) Decantar líquido sobrante e introducir nuevamente a tubo 40 mL de agua destilada. Agitar nuevamente hasta homogeneizar.
 - 6) Centrifugar nuevamente en equipo marca Fisher Scientific y operar a 2000 rpm durante 15 minutos (ver Cuadro 30 para especificaciones de equipo usado).
 - 7) Apuntar el peso del recipiente (Erlenmeyer o beaker pequeño) a utilizar para el análisis de conteo microbiano mediante peso seco.
 - 8) Decantar nuevamente el líquido sobrante de los tubo de ensayo y extraer los sólidos residuales con 5mL de agua destilada, utilizando una pipeta volumétrica de 5mL. Introducir solución con sólidos en recipiente ya tarado. Pesar y apuntar el nuevo peso.
 - 9) Repetir el proceso anterior hasta completar la preparación de todas las muestras correspondientes. Asegurar la anotación de los pesos y el volumen de todas las muestras preparadas.
 - 10) Introducir las muestras en recipiente, en horno de convección marca VWR a 60°C por 48h (ver Cuadro 28 para especificaciones de equipo usado); en Figura 36 del apartado de *ilustraciones* se representa el sistema ya en horno.
 - 11) Sacar las muestras del horno, luego del periodo correspondiente, y dejar enfriar a temperatura ambiente.
 - 12) Pesar para definir peso final de las muestras. Determinar la concentración de microorganismos utilizando el cálculo 4 del apartado de cálculos de muestra en *apéndice*.

B. SEGUNDA ETAPA: Generación de modelo microbiano.

1. Generación de modelo microbiano para consumo de azúcares totales, producción de ácido láctico y generación de biomasa (*Lactobacillus leichmannii*).
 - a. Tabular en Excel los valores de concentración azúcares totales, concentración de ácido láctico y número de células vivas correspondiente a cada tiempo de muestra tomada.
 - b. Generar gráficos de dispersión: concentración de azúcares totales contra tiempo, concentración de ácido láctico contra el tiempo y biomasa contra el tiempo. La finalidad es visualizar e identificar un posible modelo microbiano preexistente.
 - c. Generar gráfico de cambio de concentración de biomasa en el tiempo contra formación de ácido láctico en el tiempo; con el fin de visualizar si existe o no asociación de producción por crecimiento de microorganismos.
 - d. Generar una ecuación que describa la producción de ácido láctico en el tiempo, basado en el modelo cinético generado por Armane y Prigent en 1994. Se toma dependencia únicamente de la tasa de crecimiento específica, la concentración de producto y el tiempo. Tomar en cuenta coeficientes constantes adicionales para convergencia entre datos experimentales y el modelo.
 - e. Generar una ecuación que describa el crecimiento microbiano de la cepa *Lactobacillus leichmannii* en un plazo de tiempo basado en el modelo cinético generado por Armane y Prigent en 1994. Se toma dependencia de la tasa de crecimiento específica y la concentración de ácido láctico y microorganismos. Tomar en cuenta coeficientes constantes adicionales para convergencia entre datos experimentales y el modelo; principalmente asociado a la inhibición por formación de ácido láctico.
 - f. Generar una ecuación que describa el consumo de azúcares totales en el tiempo que tome en cuenta la tasa de sustrato utilizado para crecimiento microbiano celular y la producción de ácido láctico.
 - g. Verificar afinidad de ecuaciones de modelo microbiano generadas anteriormente a los valores experimentales obtenidos mediante la utilización de Software *Berkley Madonna* (ver Figura 20 del apartado de *resultados*), realizando un análisis de error medio cuadrático (RMSE) para cada curva de modelo generada; ver Figura 21 de análisis de error, apartado de *apéndice*, en dónde se expresan las barras de error generadas por RMSE individual para cada dato de muestra analizado.

VII. RESULTADOS

Cuadro 1. Comparación de condiciones de reacción para la inversión de azúcares en melaza mediante hidrólisis ácida con ácido sulfúrico.

Prueba	pH (± 0.5)	Tiempo (± 0.73 min)	Sacarosa hidrolizada (% m/m)	Monosacáridos resultantes	
				Glucosa (g/mL)	Fructosa (g/mL)
1	4	40	37.6%	0.0248	0.0404
2	4	60	37.9%	0.0236	0.0396
3	2.5	45	36.2%	0.0234	0.0390
4	2.5	60	36.7%	0.0320	0.0402
5	2.5	80	38.9%	0.0390	0.0406
6	1	45	93.3%	0.1538	0.1592
7	1	60	93.5%	0.1572	0.1630
8	1	90	93.6%	0.1610	0.1648

La temperatura trabajada en todas las pruebas fue de 80°C para minimizar la posibilidad de degradación de glucosa o fructosa en 5-MHF. Se utilizó ácido sulfúrico fumante y se agregó en cada sistema en forma de goteo hasta alcanzar el pH correspondiente, ver apartado de *metodología*. Valor porcentual representa el valor masico de sacarosa final con respecto al valor inicial del mismo en del sistema

Cuadro 2. Comparación de producción fermentativa de ácido láctico con *Lactobacillus leichmannii* a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada.

Sistema	Azúcares invertidas	Ácido láctico (g/mL)	Yp/s (m/m)	Consumo de sustrato en fermentación (% m/m)			
				Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Totales
1	No	0.0339	0.2676	82%	81%	77%	81%
2	No	0.0179	0.1050	100%	24%	8%	78%
2.1	No	0.0162	0.0964	100%	21%	1%	77%
4	Sí	0.0039	0.0297	-	75%	76%	75%
4.1	Sí	0.0031	0.0221	-	77%	76%	77%
4.2	Sí	0.0037	0.0279	-	75%	76%	75%

Tiempo de fermentación para todos los sistemas fue de 144h. Los sistemas 1,2 y 2.1 tuvieron concentraciones iniciales de 15% m/v y 21% m/v de azúcares totales iniciales (11% m/v y 15% m/v de sacarosa) correspondientemente. Todos los sistemas con numeración 4 tenían un total de 14% m/v de monosacáridos totales. Notación utilizada: Yp/s = rendimiento de formación de producto contra consumo de sustrato. Valor porcentual de azúcares representa el valor masico final de cada azúcar con respecto al su valor inicial en el sistema.

Cuadro 3. Resultados de fermentación de melaza, con azúcares no invertidas, y *Lactobacillus leichmannii* para la formación de ácido láctico.

Parámetro	Valor	Unidad
Tiempo de fermentación	190.75	h
Producción ácido láctico	7.1560E-5	g*mL ⁻¹ *h ⁻¹
Ácido láctico total	218.40	g
Biomasa final	1.8755E-2	g*mL ⁻¹
Consumo sacarosa	93.0%	-
Consumo glucosa	50.0%	-

Fermentación realizada en bioreactor *Bioflo* 415 con 16L de caldo fermentativo. Las condiciones de caldo iniciales se describen en el Cuadro 12 del apartado de *datos originales* en apéndice. Se trabajó a una temperatura constante de 35°C y 120 rpm de agitación.

Figura 20. Ajuste del modelo a los datos experimentales de crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de producto en el tiempo.

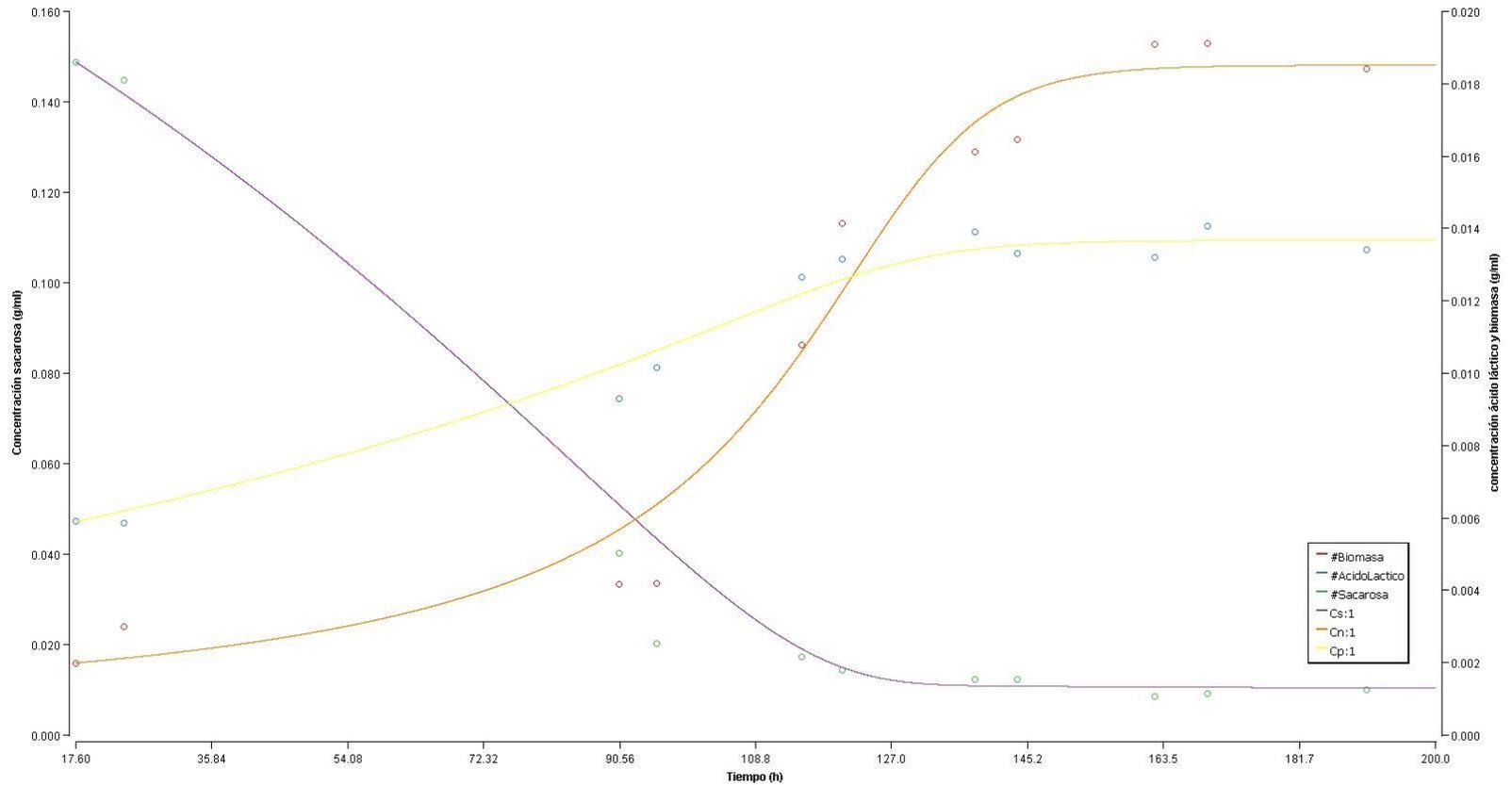


Gráfico de consumo de sacarosa, formación de ácido láctico y crecimiento microbiano en el tiempo, \circ : datos experimentales; — : modelo cinético generado. Notación utilizada: #Biomasa=datos exp. de biomasa; #Ácidoláctico=datos exp. de ácido láctico; #Sacarosa=datos exp. de sacarosa; Cs:1=modelo de sacarosa; Cn:1=modelo de biomasa; Cp:1=modelo de ácido láctico.

Ecuación 9. Ecuación de cinética de formación de ácido láctico para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando *Lactobacillus Leichmannii*.

$$\frac{dCp}{dt} = \mu_{Cp} * Cp$$

En donde:

$$\mu_{Cp} = \frac{\mu_{max,Cp}}{1 + \frac{Cp * I * C * e^{F*t}}{\mu_{max,Cp} - C}}$$

Descripción de variables:

- μ_{Cp} : Tasa de crecimiento específico para formación de producto [h-1]
- $\mu_{max,Cp}$: Tasa de crecimiento específico máximo para formación de producto [h-1]
- Cp : Concentración de ácido láctico en tiempo específico [g*mL-1]
- I : Coeficientes constantes de inhibición en el modelo de formación de producto [mL*g-1]
- C, F : Coeficientes constantes de modelo de formación de producto, provenientes del modelo de Armane y Pignet (1994) [h-1]
- t : Tiempo [h]

Cuadro 4. Definición cuantitativa de las constantes de cinética de formación de ácido láctico para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando *Lactobacillus Leichmannii*

Coefficiente	Valor	Unidad
$\mu_{max,Cp}$	7.5672E-3	h-1
I	1.8111	mL*g-1
C	7.2645E-4	h-1
F	0.1144	h-1

Valores obtenidos utilizando el software de Berkeley Madonna

Ecuación 10. Ecuación de cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción fermentativa de ácido láctico

$$\frac{dCn}{dt} = \mu_{Cn} * Cn$$

En donde:

$$\mu_{Cn} = \frac{\frac{\mu_{max,Cn} * Cn}{P_{max}}}{1 + \frac{Cn * L * e^{D * Cp}}{\mu_{max,Cn} * Z - Cn * U}}$$

Descripción de variables:

- μ_{Cn} : Tasa de crecimiento específico para crecimiento microbiano [h-1]
 $\mu_{max,Cn}$: Tasa de crecimiento específico máximo para crecimiento microbiano [h-1]
 Cn : Concentración de microorganismos en tiempo específico[g*mL-1]
 Cp : Concentración de ácido láctico en tiempo específico [g*mL-1]
 P_{max} : Concentración de ácido láctico máximo antes de inhibición por producto [g*mL-1]
 L, D, U : Coeficientes constantes de inhibición en el modelo de crecimiento microbiano [mL*g-1]
 Z : Tiempo en alcanzar $\mu_{max,Cn}$ luego de la fase de latencia [h]

Cuadro 5. Definición cuantitativa de las constantes de cinética de crecimiento microbiano para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando *Lactobacillus Leichmannii*.

Coeficiente	Valor	Unidad
$\mu_{max,Cn}$	0.0105	h ⁻¹
P_{max}	0.0201	g*mL ⁻¹
L	0.3931	mL*g ⁻¹
D	0.3302	mL*g ⁻¹
U	0.5153	mL*g ⁻¹
Z	0.9102	h

Valores obtenidos utilizando el software de Berkeley Madonna

Ecuación 11. Ecuación de cinética de consumo de sacarosa para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando *Lactobacillus Leichmannii*.

$$\frac{dCs}{dt} = -(1 - A) * \frac{dCn}{dt} - B * \frac{dCp}{dt}$$

Descripción de variables:

- $\frac{dCn}{dt}$: Cambio de concentración de microorganismos en el tiempo[g*mL-1*h-1]
 Y_{xs} : Coeficiente de rendimiento de biomasa frente a sacarosa [-]
 $\frac{dCp}{dt}$: Cambio de concentración de ácido láctico en el tiempo [g*mL-1*h-1]
 Y_{ps} : Coeficiente de rendimiento de ácido láctico frente a sacarosa [-]
 A : Coeficiente constante fraccional de crecimiento microbiano [-]
 B : Coeficiente constante fraccional de formación de ácido láctico. [-]

Cuadro 6. Definición cuantitativa de las constantes de cinética de consumo de sacarosa para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de melaza, usando *Lactobacillus Leichmannii*.

Coefficiente	Valor	Unidad
A	1.1982	-
Y_{xs}	0.0529	m/m
B	0.1430	-
Y_{ps}	0.0055	m/m

Valores obtenidos utilizando el software de Berkeley Madonna

VIII. DISCUSIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El objetivo general del trabajo de graduación presente es la determinación de un modelo de cinética microbiana para la síntesis de ácido láctico, con melaza como fuente de carbono y *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 como cepa fermentadora. En la fermentación láctica, las rutas metabólicas más comunes parten de glucosa, por lo que inicialmente se evaluó la necesidad de un procedimiento de hidrólisis de azúcares en la melaza previo la experimentación fermentativa a mayor escala; ya que este es un residuo de la industria azucarera rica en sacarosa ($0.3556 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y pobre en glucosa y fructosa ($0.0536 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0.0588 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente). Para el cumplimiento de lo anterior, se inició con la determinación de condiciones de reacción de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico (H_2SO_4) para el análisis comparativo a pequeña escala de la producción de ácido láctico entre un sistema fermentativo de melaza con y sin azúcares invertidas. Por consiguiente, el sustrato seleccionado fue utilizado en una fermentación a mayor escala (16L de caldo fermentativo), es decir en un bioreactor marca *Bioflo 145*, para la obtención de datos experimentales de concentración de microorganismos, consumo de sustrato y formación de ácido láctico en el tiempo, que permitan la obtención de ecuaciones respectivas para la generación del modelo de cinética microbiana.

Los resultados de experimentación de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico fumante (H_2SO_4) en melaza se expresan en el Cuadro 1 (ver apartado de *resultados*). Según la teoría, la glucosa y fructosa se degradan a hidroximetilfurfural (5-HMF) en temperaturas por arriba de 106°C y a pH menores a 1; en base a ello se decidió experimentar a una única temperatura de 80°C y realizar distintas corridas, variando tiempo y pH. Se eligieron las condiciones que presentaran una conversión representativa de sacarosa, por lo que las seleccionadas posteriormente para fermentación fue la inversión de azúcares con pH 1, a 80°C y por 60 minutos. Este resultado presentó 0.1% menos de conversión de sacarosa que la mejor opción, pero treinta minutos menos de reacción, que así mismo disminuye la probabilidad de degradación de glucosa por la acidez del sistema.

La fermentación para el análisis comparativo de producción de ácido láctico entre caldo de melaza con azúcares no invertidas, y aquel con azúcares invertidas mediante hidrólisis ácida se realizó en sistemas compuestos de 175 mL del caldo de melaza correspondiente, 0.002 g/mL de biomasa inicial y, peptona de carne y extracto de levadura como nutriente adicional (0.5% m/v de cada uno) en Erlenmeyers de 250mL cada sistema. Se resalta que entre los productos presentados en todos los sistemas luego del periodo de fermentación se encontraron ácido láctico, dióxido de carbono y ácido acético; así mismo, se apreció visualmente una mayor cantidad de biomasa (en forma de precipitados) en los sistemas con melaza invertida en comparación a los sistemas opuestos (ver Figuras 31 y 32 del apartado de *ilustraciones*).

A partir de los resultados presentados en el Cuadro 2 del apartado de *resultados*, se puede afirmar que la fermentación con melaza sin azúcares invertidas presenta ventaja sobre una con azúcares previamente hidrolizadas. En primera instancia, en dichas condiciones se obtiene un mayor rendimiento específico de ácido láctico sobre sacarosa lo que concurre en una producción superior de ácido láctico al finalizar el periodo de fermentación. Por otra parte, en su totalidad hay un considerable consumo de las azúcares presentes (alcanzando valores de 81%). En un estudio de homología genética realizado por Weiss *et al* en 1983, entre distintas especies de *Lactobacillus delbrueckii*, afirmó que la cepa *Lactobacillus leichmannii* (conocida también como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) posee la capacidad enzimática de fermentar distintos disacáridos como sacarosa, maltosa y lactosa. La información previa apoya los resultados obtenidos en la experimentación de fermentación entre melazas con y sin azúcares invertidas y permite adquirir la suposición de que la cepa es capaz de hidrolizar la sacarosa presente en el caldo y procesar la glucosa y fructosa resultante en su ruta metabólica correspondiente para la producción de ácido láctico.

Luego de determinar la utilización de melaza sin azúcares invertidas como fuente de carbono, se realizó la fermentación a mayor escala en bioreactor *Bioflo 415* con 16 litros de caldo fermentativo y condiciones iniciales de: $0.1445 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de sacarosa ($0.2068 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azúcares totales), $1.2756\text{E-}3 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración de biomasa inicial y 0.5% m/v de peptona de carne y extracto de levadura como nutriente adicional. Como resultado del periodo de fermentación (190.75 h) se obtuvo un total de 216.20g de ácido láctico en los 16L de caldo fermentativo, producción de $1.3513\text{E-}2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, así mismo concentración de microorganismos final de $1.8755\text{E-}2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por otra parte, el consumo porcentual de azúcares fue: 93% de sacarosa y 50% de glucosa (no hubo consumo de fructuosa aparte de la obtenida a partir de la hidrólisis de sacarosa). Además de la obtención de ácido láctico como producto, se generaron otros subproductos como ácido cítrico (identificado en análisis de cromatografía HPLC) y dióxido de carbono (identificado de manera visual como espuma durante experimentación). En términos generales, se puede expresar que, a partir de 3.5L de melaza inicial (azúcares totales de 46.8% m/v, con sacarosa constituyendo 35.56% m/v) se obtienen luego de 190.75 horas de fermentación, 216.20g de ácido láctico como producto principal deseado y 302.40g de ácido cítrico como parte de los subproductos de mayor presencia. Sin embargo, es sugerido realizar un análisis característico cuantitativo de todos los componentes residuales, subproductos, nutrientes u otros inertes dentro de la reacción, presentes en el caldo fermentativo final debido a que pueden presentar productos de valor a ser purificados y utilizados luego; de igual manera, su identificación permite establecer un procedimiento de purificación posterior de mayor precisión para la obtención del ácido láctico resultante con la pureza deseada para su uso futuro.

Se debe tomar en cuenta que el caldo fermentativo resultante, al plantear un proceso de purificación posterior para la obtención en primera instancia de ácido láctico de alta pureza, de otros ácidos orgánicos o alcoholes formados, puede fungir como materia prima para otro proceso y es algo recomendable a estudiar rigurosamente en futuras investigaciones. En cuanto a azúcares finales se tiene un total de 6.03% m/v en donde 4.01 %m/v corresponde a sacarosa, 1.42% m/v a glucosa y 3.60% m/v a fructosa; es posible general otra fermentación de mayor eficiencia ya conocida, por ejemplo, producción de etanol usando alguna especie

de levadura, o generación de ácidos orgánicos como ácido cítrico a partir de fructosa. Por otra parte, el producto reducido en volumen y libre de alcoholes o ácidos presentes admite la posibilidad de ser utilizado en la producción de comida para ganado; no obstante, es requerido analizar el impacto de la presencia de componentes como nutrientes de peptona de carne y extracto de levadura, en la nutrición diaria del animal. Todo lo anterior, con la finalidad de alcanzar una economía circular para el proceso fermentativo de producción de ácido láctico.

A pesar de la generación de subproductos como ácido cítrico y dióxido de carbono, no se puede afirmar que la cepa fermentadora utilizada, *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, es homoláctica o heteroláctica. Debido a limitaciones del equipo, el sistema poseía bajas pero constantes entradas de aire por lo que no se operó bajo condiciones anaeróbicas en su totalidad. De acuerdo con un estudio generado por Makarova *et al* en el año 2006, de secuencia de genomas a distintas especies de microorganismos LAB, algunas especies son categorizadas como microaerofílicas por lo que requieren de cantidad específicas de oxígeno para su sobrevivencia y crecimiento. Durante la fase de fermentación del presente trabajo, la entrada de aire al sistema no era cuantificable por lo que se puede suponer que esta era mayor a la requerida por la cepa para su sobrevivencia y que los subproductos generados poseen dos posibles razones: 1) la cepa es capaz de funcionar de manera homofermentativa o heterofermentativa según las condiciones de operación y el oxígeno adicional permite la fermentación por ruta metabólica 6PG/PK (heterofermentativa) en donde el acetyl-CoA generado como subproducto intermedio es reducido a etanol, ácido cítrico u otro ácido orgánico y 2) la cepa funciona únicamente bajo una ruta metabólica iniciando con glucólisis (homofermentativa) y finaliza con la producción de piruvato, que en primera instancia, es convertido a ácido láctico, pero la presencia de oxígeno extra degrada el piruvato en acetyl-CoA que luego se convierte en otro producto como lo mencionado anteriormente. En ambos casos teóricos, se tiene la presencia de dióxido de carbono como producto residual. La determinación de la ruta metabólica utilizada y la razón de los subproductos identificados de la fermentación requieren de mayor estudio, tanto de la secuencia genética de la cepa fermentadora usada como del requerimiento y efecto de oxígeno sobre el sistema.

A partir de las muestras tomadas durante el periodo de fermentación, se generó una gráfica con curvas respectivas para el cambio en el tiempo de la población de microorganismos, consumo de sacarosa y formación de ácido láctico (ver Figura 20 apartado de *resultados*). Los datos de sustrato corresponden únicamente al consumo de sacarosa como fuente de carbono y son los valores considerados posteriormente para la generación de las ecuaciones cinéticas por dos motivos: 1) es la azúcar con mayor conversión según los datos experimentales obtenidos, a pesar de que también existió un consumo de glucosa, esta fue mínima en comparación con el consumo de sacarosa y 2) como se mencionó previamente, antecedentes han indicado que la cepa *Lactobacillus leichmannii* es capaz de fermentar al disacárido y operar los productos en su ruta metabólica correspondiente. En función de los datos experimentales obtenidos se definieron ecuaciones cinéticas para cada variable (sustrato, microorganismo y producto) y su cambio en el tiempo.

Inicialmente se definió la dependencia de formación de ácido láctico con el crecimiento microbiano. Se puede observar en la Figura 27 (ver apartado de ilustraciones en *apéndice*) que el cambio de la población de *Lactobacillus leichmannii* en el tiempo contra la producción de ácido láctico en el tiempo no poseen tendencia lineal o de alguna forma en específico, en consecuencia, se trabajó bajo la suposición de que no se tiene una formación de ácido láctico asociado al crecimiento microbiano. Es necesario resaltar que lo anteriormente supuesto se debe a la metodología de conteo microbiano utilizado. Debido a la disponibilidad de equipo y a la dificultad de trabajar el caldo fermentativo en equipo de mayor tecnología por sus características fisicoquímicas de coloración oscura, alta viscosidad y densidad, el conteo se realizó por método de peso seco. La desventaja de dicho procedimiento radica en la imposibilidad de definir la viabilidad dentro de la población estudiada ya que solo determina el peso en su totalidad y no identifica diferencia alguna entre tamaño de células, es decir, no permite cuantificar la población de microorganismos que se encuentra viva y aquella que se encuentra muerta. No obstante, en virtud de la independencia establecida, se generaron curvas y modelos de cinética correspondiente para cada variable.

La propuesta del modelo de la cinética de fermentación obtenida durante la experimentación es de alta importancia debido a que funge como herramienta para identificar alcances y limitaciones del sistema en las condiciones operadas; es decir permite reconocer oportunidades de mejora para su implementación en futuras investigaciones o en procesos de mayor escala. Debido a que el objetivo de la fermentación es la obtención de ácido láctico, se analiza tanto la fuente de sustrato a transformar en producto y el comportamiento de la población microbiana encargada de ello. En virtud de lo anterior, es requerido generar un modelo que se acople de manera precisa, en su mayor posibilidad, a los data observada durante la experimentación. El modelo base utilizado para la determinación de las ecuaciones para crecimiento microbiano y formación de ácido láctico es el de Armane y Prigent (1994), modelo definido para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de lactosa, debido a su figuración de una curva sigmoidea; debido a su índole, este se aplicó a partir de las 17.60h, donde se consideró finalizada la etapa de latencia y comienza la fase de crecimiento exponencial para la cepa microbiana. Se inició con la propuesta del modelo de cinética correspondiente al producto; se puede observar en la *ecuación 9* que la generación de ácido láctico en el tiempo equivale a la tasa de crecimiento específico para la formación de este [h^{-1}] por su concentración en un momento en el tiempo [$g \cdot mL^{-1}$]; a su vez la tasa de crecimiento específico depende únicamente de la concentración de ácido láctico en instantes concretos, el tiempo en fermentación y coeficientes que son constantes. Dentro de los coeficientes se encuentran la tasa de crecimiento específico máximo para formación de producto con valor de $7.5672E-3 h^{-1}$, una constante I de inhibición con valor de $1.8111 mL \cdot g^{-1}$, y constantes C y F que pertenecen al modelo original de Armane y Prigent, con valores de $7.5245E-4 h^{-1}$ y $0.1144 h^{-1}$ respectivamente. El término de C_p multiplicado por el coeficiente I , no hallado en la ecuación base, se integró como corrección por transferencia de masa en la remoción del producto de la célula fermentadora.

Por otra parte, la ecuación cinética de crecimiento microbiano en el tiempo se define por el producto entre la tasa de crecimiento específico [h^{-1}] y la concentración de microorganismos en un momento dado [$g \cdot mL^{-1}$], ver *ecuación 10* de la sección de *resultados*. La tasa de crecimiento específico depende de la concentración

de biomasa y ácido láctico, una tasa de crecimiento específico máximo para crecimiento microbiano con valor de 0.0105 h^{-1} , y coeficientes considerados como constantes. En este caso se trata una dependencia del incremento de población no en tiempo sino en la concentración de producto a causa de la naturaleza de la fermentación. El aumento de ácido láctico, y otros subproductos ácidos, disminuyen el pH del caldo fermentativo por lo que se espera principiar con un descenso en la velocidad de reacción hasta alcanzar fase de muerte celular por el nivel alto de acidez; lo que hace adquirir la suposición de una fermentación con inhibición de producto. En el trabajo presente se obtuvo un pH de 2.36 al finalizar la etapa de experimentación, sin embargo, como se puede observar en la Figura 28 (ver ilustraciones en apartado de *apéndice*) la curva de biomasa de los datos de muestreo expone una tendencia a fase estacionaria sin alcanzar aun la fase de muerte celular. Para determinar con exactitud la acidez que resulta en el descenso de la población y poder analizar las concentraciones de producto causantes, es necesario realizar estudios con etapas experimentales de mayor prolongación.

En lo que respecta a los coeficientes constantes de la ecuación de crecimiento microbiano, se tiene un valor de $0.0201 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de concentración máxima de ácido láctico antes de alcanzar una inhibición total por el mismo (fase de muerte celular); aunque durante la fermentación dicha concentración no fue alcanzada, de acuerdo con la tendencia de los datos experimentales obtenidos, se esperaría una inflexión en la curva de crecimiento microbiano al llegar a la misma. A su vez, se presenta una constante Z que representa el tiempo (0.9102 h) en que la tasa de crecimiento específico alcanza su valor máximo. Los coeficientes D , L y U son constantes de inhibición; la D proviene del modelo original y la L y U , multiplicado por la concentración de microorganismo, son términos de corrección de transferencia de masa por la disminución de velocidad enzimática que ocurre con la formación de ácido láctico y, su repercusión en la acidez continua del medio. Estos poseen valores de $0.3302 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, $0.3931 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ y $0.5153 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ respectivamente.

Adicionalmente, la ecuación cinética para el consumo de sacarosa en el tiempo se expresa en la *ecuación 11*, apartado de *resultados*. Por balance de materia, esta equivale a la resta de la velocidad de formación de microorganismos y la resta de la velocidad de formación de ácido láctico, ambos divididos entre su coeficiente de rendimiento frente al consumo de sacarosa correspondiente; cada termino es corregido por coeficientes constantes A y B respectivamente. Los valores de rendimientos obtenidos para la adaptación del modelo fueron: 0.0529 de crecimiento de biomasa frente a sacarosa y 0.055 de formación de ácido láctico frente a sacarosa; cómo se puede observar el coeficiente de rendimiento del producto es mucho menor que el de biomasa debido a que se producen más compuestos aparte del ácido láctico analizado para la generación del modelo cinético. El coeficiente constante B es integrado como valor fraccionario de corrección para la síntesis múltiple de productos y posee un valor de 0.1430 adimensional. El término $(1-A)$, y su resultado negativo al ingresar dígitos, es una constante como causalidad de la falta de determinación de viabilidad en el conteo microbiano realizado. La cuantificación de células vivas en el medio de las muestras tomadas para la creación de cinética, y no de la población total de aquellas vivas y muertas, repercutiría en la velocidad de reacción, directamente en la disminución de la tasa de crecimiento microbiana específica (ver Figura 30 en

el apartado de *ilustraciones* para las curvas de velocidad de reacción para el comportamiento actual (Figurado), aunque sin datos experimentales no se puede especificar la magnitud del descenso como efecto.

El error cuadrático medio (RMSE) para el modelo generado de crecimiento de microorganismos, la formación de ácido láctico y el consumo de sacarosa es de $1.1442\text{E-}3$, $4.7277\text{E-}4$ y $7.8694\text{E-}3$ respectivamente. Se obtuvo un error medio porcentual máximo con respecto a la data experimental de 2.695% en la cinética de consumo sacarosa, de 0.015% en el modelado de formación de ácido láctico y 0.114% para el crecimiento microbiano. El error más alto obtenido fue para el modelo del consumo de sacarosa, que corresponde a la curva que menos se adapta a los valores experimentales según la Figura 20 del apartado de *resultados*. Se recomienda realizar un estudio fermentativo de comparación, utilizando otra metodología de conteo microbiano con la finalidad de realizar un análisis entre resultados obtenidos y su efecto en la asociación de formación de producto con el crecimiento microbiano, los coeficientes constantes establecidos y las velocidades de reacción resultantes. De igual manera, existen otros factores a analizar en futuras investigaciones con la finalidad de mejorar la cinética propuesta en el presente trabajo, principalmente las condiciones de operación utilizadas para la fermentación: concentraciones y características de nutrientes presentes, dependencia y efecto de la temperatura en sistemas no isotérmicos, velocidad de agitación y su causalidad sobre la transferencia de masa en el medio, entre otros factores. El propósito es generar posteriormente una cinética fermentativa de mayor precisión que parta del resultado presente en el trabajo presente.

La fuente principal de error radica en la melaza utilizada como fuente de sustrato, y sus propiedades fisicoquímicas, como previamente fue mencionado. La coloración oscura y presencia de impurezas sólidas limitan la utilización de métodos convencionales para el análisis de muestras como el uso de equipo de alta sensibilidad para conteo microbiano, de igual manera disminuyen la precisión de la cuantificación de variables, como la determinación de la población de microorganismos por densidad óptica o peso seco. Su alta viscosidad y turbidez pueden representar obstáculos de transferencia de masa y energía entre los sistemas sustrato-microorganismo o producto-microorganismo.

Dentro de los aspectos como enfoque de estudio para investigaciones futuras se puede incluir el ahondamiento en el efecto del oxígeno como parte de factor para supervivencia y crecimiento en la especie *Lactobacillus leichmannii* para la síntesis fermentativa de ácido láctico con el objetivo de reconocer su función en el mecanismo de reacción e incluirlo, de ser requerido, como carácter a ser considerado dentro de la cinética de fermentación. Por otra parte, otra orientación de análisis puede ser la comparativa entre diferentes escalas de fermentación para la evaluación del impacto en la transferencia de masa y energía por volumen tratado o la consecuencia sobre el rendimiento del producto final en la modificación del tipo de reactor utilizado (por ejemplo, flujo de pistón o CSTR) en contraste con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

El ácido láctico es un producto altamente utilizado en distintas industrias alrededor del mundo, con gran potencial de crecimiento en el mercado como se describió anteriormente en el marco teórico de este trabajo

(18.7% de tasa de crecimiento anual para el año 2019-2025); y es en base a su uso final futuro, que se seleccionan las actividades correspondientes para la obtención de pureza deseada. En primera instancia, como parte del proyecto global del cual el presente trabajo nació, se pretende un uso final de ácido láctico como monómero para la generación ácido poliláctico (PLA) para venta tanto dentro como fuera del país. Es por ello, que finalmente como ultimo enfoque sugerido, se sugiere la generación de un estudio de proceso de purificación del producto obtenido, con la finalidad de alcanzar un ácido láctico con pureza mínima del 80% para su aplicación para generación de resinas plásticas o la requerida según su utilización posterior.

IX. CONCLUSIONES

1. Las condiciones de reacción establecidas para la reacción de hidrólisis ácida de azúcares en melaza para la comparativa de producción posterior fueron: temperatura de 80°C, pH de 1 y tiempo de reacción de 60 minutos; con una conversión final de 93.5% de sacarosa.
2. Se seleccionó la fermentación sin azúcares invertidas para la experimentación en reactor de 16L debido a que la producción de ácido láctico se encuentra entre 0.0162-0.0339 g*mL⁻¹ y se alcanza un consumo, con relación a la cantidad inicial, de 81% de azúcares totales; esto frente a la producción de ácido láctico de 0.0039 g*mL⁻¹ y consumo del 77% de azúcares de la fermentación con melaza hidrolizada.
3. La fermentación de caldo de melaza con azúcares sin invertir durante 190.75h generó un total de 218.40g de ácido láctico en los 16L de medio, producción de 1.3513E-2 g*mL⁻¹*h⁻¹; con una conversión de sacarosa de 93% y glucosa de 50%; en condiciones de operación de 35°C, 150 RPM, 20.68% m/v de azúcares iniciales, 0.0013 g/mL de biomasa inicial y 0.5% m/v de peptona de carne y extracto de levadura como nutriente adicional. Se obtuvieron como subproductos ácido cítrico (cuantificado con cromatografía HPLC) y dióxido de carbono (burbujeo y espuma constante durante fermentación).
4. Se obtuvo una propuesta de modelo cinético de fermentación, en donde se definió la formación de ácido láctico dependiente del tiempo de fermentación, el crecimiento microbiano dependiente de la concentración de ácido láctico en tiempo específico y el consumo de sustrato como resultado del balance de masa del producto formado y el crecimiento microbiano (ver ecuación 9,10 y 11 de *resultados* para cada expresión cinética respectivamente). Los valores de coeficientes para cada el modelo propuesto de cada variable se expresan en los Cuadro 4, 5 y 6 de *resultados*, respectivamente.

X. RECOMENDACIONES

1. Se requiere de estudios de secuencia genética e identificación enzimática para la determinación con mayor precisión de la ruta metabólica adquirida por la cepa *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, para el razonamiento de los subproductos generados en la etapa de fermentación. Adicional a lo anterior, el efecto cuantitativo del oxígeno en el medio y como se incorpora en la ruta metabólica utilizada. Esto con el fin de determinar las cantidades requeridas para la sobrevivencia de la cepa, en caso de demostrar ser una especie microaerofílica y su integración a la cinética fermentativa del proceso.
2. Se recomienda la realización de un estudio con fermentaciones de mayor prolongación para la determinación experimental de la concentración de ácido láctico máximo antes de presentar una inhibición por producto, tal como se definió como parte de la cinética de crecimiento microbiano en el presente trabajo para su análisis comparativo.
3. Se sugiere una investigación con distintos métodos de conteo microbiano a manera de realizar un análisis comparativo contra la data experimental obtenida en el presente trabajo y su efecto sobre el modelo cinético de fermentación propuesto.
4. Se recomienda realizar un estudio comparativo de fermentación para formación de ácido láctico a diferentes escalas y en diferentes condiciones de operación (temperatura, agitación, escala operacional, concentración y características de nutrientes, entre otros) con la finalidad de identificar las diferencias de transferencia de masa y energía a existir y su efecto sobre la cinética de reacción del proceso, en relación o contraste con la data y resultados expuestos en el presente trabajo para adquirir una propuesta de modelo cinético de mayor precisión.
5. Se recomienda la caracterización y cuantificación de componentes residuales en el caldo fermentativo final aparte del ácido láctico sintetizado (producto de principal interés en el trabajo presente), como otros ácidos orgánicos, alcoholes, sales o nutrientes formados o inertes, previo a la etapa de purificación pertinente como proceso continuo. Esto con la finalidad de identificar todos los elementos de valor a ser recuperados durante la purificación, y luego definir el uso del producto final residual para el cumplimiento de una economía circular.

6. Debido a la alta utilización actual del producto en el mercado a nivel mundial y su continuo crecimiento, se sugiere la realización de un estudio de un proceso de purificación para la obtención de ácido láctico con una pureza final de 80% o mayor, para su uso posterior en generación de resinas plásticas u otro producto, según lo requerido por la índole de este.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Amrane A., Prigent Y. 1994. Mathematical Model for Lactic Acid Production from Lactose in Batch Culture: Model Development and Simulation. *Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology*. 60 (1994) 241-246.
- [2] Buenaventurada, P & Yutaka, T. 2007. Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. Springer Science+Business Media B.V., *Biotechnol Lett*. 29 (2007) 1329-1332.
- [3] Campillo, N. 2012. TEMA 1: introducción al análisis químico, grado Bioquímica. Universidad de Murcia, España.
- [4] CENGICAÑA. 2014. *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Librerías Artemis Edinter, S.A. Guatemala.
- [5] CENGICAÑA. *Actualización continua. Producción de azúcar de Guatemala (toneladas métricas)*. En: <https://public.tableau.com/>. [consultado en ene/2021].
- [6] Datta, R. *et al.* 1995. Technological and economic potential of poli(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews*, ELSEVIER. 16 (1995)221-231.
- [7] Dumprebatil, A. *et al.* 2007. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (2008) 333-335.
- [8] Grand view research. 2019. Lactic Acid Market Size, Share & Trend Analysis Report By Raw Material (Corn, Sugarcane), By Application (Industrial, Food & Beverages, Polylactic Acid), By Region, And Segment Forecasts, 2019 – 2025. Report ID: 978-1-8038- 126-9. PP 118.
- [9] Hofvendahl, K. & Hahn-Hagerdal, B. 2000. *Factor affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources*. Lund University, Sweden. ELSEVIER. *Enzyme and Microbial Technology*. 26 (2000) 87-107.
- [10] Kotzamanidis, Ch. *Et al.* 2002. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18 (2002) 441-448.

- [11] Levenspiel, O. 1999. *Chemical reaction engineering*. Third edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, United States of America.
- [12] Marcoline, F. *et al.* 2020. *Berkeley Madonna User's Guide, version 10.1.2*. En: <https://www.berkeleymadonna.com/>. [consultado en dic/2020] MindTouch. 2020. *Bacterial numbers & Measurements of Microbial Mass*. En: <https://bio.libretexts.org/>. [consultado en dic/2020]
- [13] Monteagudo, J. *et al.* 1993. Determination of the Best Nutrient Medium for the Production of L-Lactic Acid from Beet Molasses, A Statistical Approach. Universidad de Castilla- La Mancha, Spain. *Acta Biotechnol.* 13 (1992) 103-110.
- [14] Monteagudo, J. *et al.* 1994. Optimization of the Conditions of the Fermentation of Beet Molasses of Lactic Acid by *Lactobacillus delbrueckii*. Universidad de Castilla-La Mancha, Spain. 14 (1994) 251-260.
- [15] Monteagudo, J. *et al.* 1996. *Kinetics of Lactic Acid Fermentation by Lactobacillus delbrueckii Grown on Beet Molasses*. Universidad de Castilla- La Mancha, Spain. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 68 (1997) 271-276.
- [16] Rojan, P. & Madhavan, K. 2006. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. Springer-Verlag. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74 (2007) 524-534.
- [17] Rolz, E. *et al.* 2011. INFORME FINAL: Obtención de ácido láctico a partir de la caña de azúcar. PROYECTO FODECYT No. 003-2008. Guatemala.
- [18] Vinderola, G. *et al.* 2019. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5th edition). Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida. 765 pp.
- [19] Viruela, F. *et al.* 2010. *Laboratorio Química Física I, CINETICA*. Universidad de Valencia, España.
- [20] Weiss, N. *et al.* 1983. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, Subjective Synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and Description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *System, Appl. Microbiol.* 4 (1983) 552-557.
- [21] Yadav, A. *et al.* 2011. *Bioconversion of renewable resources into lactic acid: an industrial view*. Informa Healthcare USA; Inc. DOI: 10.3109/07388550903420970.
- [22] Yixing, Z. & Vadlani, P. *D-Lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via Lactobacillus delbrueckii fermentation*. Springer-Verlag Berlin Heiderberg. *Bioprocess Biosyst Eng.* DOI: 10.1007/s00449-013-0965-8.

- [23] Young-Jung W., *et al.* 2006. *Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications*. Chonnan National University, Republic of Korea. Food Technol Biotechnol 44 (2006) 163-172.
- [24] Yukihiro, T. *et al.* 2010. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41. Springer-Verlag. Appl Microbiol Biotechnol. 89 (2011) 1741-1750.

XII. APÉNDICE

A. Datos originales

Cuadro 7. Propiedades fisicoquímicas de la melaza utilizada.

Propiedad	Valor	Unidad
Densidad [25°C]	1.25±0.006	g*mL ⁻¹
Humedad en base seca	2.54±0.27	%
Viscosidad cinemática [25°C]	2.37E4±161	cSt
Viscosidad dinámica [25°C]	2.95E4±161	cP
Grados brix [25°C]	87.15±0.293	%
pH [20°C]	5.11±0.030	-

Características fisicoquímicas determinadas en estudio previo generado por el mismo experimentador. En el presente estudio se trabajó con la misma materia prima.

Cuadro 8. Concentración de azúcares presentes en la melaza utilizada.

Azúcar	Concentración (% m/v)
Sacarosa	35.56
Glucosa	5.36
Fructosa	5.88

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), corregidos con factor de dilución para análisis (1:2)

Cuadro 9. Datos de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico realizada en melaza

Prueba	pH	Tiempo (min)	Concentración azúcares (% m/v)		
			Sacarosa	Glucosa	Fructosa
1	4	40	22.20	2.48	4.04
2	4	60	22.08	2.36	3.96
3	2.5	45	22.68	2.34	3.90
4	2.5	60	22.50	3.20	4.02
5	2.5	80	21.74	3.90	4.06
6	1	45	2.38	15.38	15.92
7	1	60	2.32	15.72	16.30
8	1	90	2.28	16.10	16.48

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:10)

Cuadro 10. Concentración de azúcares iniciales y finales de fermentación a microescala para análisis comparativo de producción fermentativa de ácido láctico entre melaza con azúcares invertidas y sin azúcares invertidas.

Sistema	Melaza invertida	Concentración inicial (% m/v)			Concentración final (% m/v)		
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
1	NO	11.28	2.14	1.85	2.00	0.41	0.42
2	NO	15.57	2.95	2.56	-	2.25	2.35
2.1	NO	15.54	2.95	2.55	-	2.34	2.52
4	SÍ	-	7.28	7.48	-	1.83	1.82
4.1	SÍ	-	7.28	7.48	-	1.65	1.78
4.2	SÍ	-	7.28	7.48	-	1.79	1.83

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:10). Cada microsistema consistía de 175mL de caldo, 0.002 g*mL⁻¹ de biomasa inicial, 0.5% m/v de peptona de carne y 0.5% m/v de extracto de levadura. Periodo de fermentación de 144h.

Cuadro 11. Concentración de productos en fermentación a microescala para análisis comparativo de producción fermentativa de ácido láctico entre melaza con azúcares invertidas y sin azúcares invertidas.

Sistema	Melaza invertida	Concentración de productos (% m/v)		
		Ácido láctico	Etanol	Ácido acético
1	NO	3.39	-	3.42
2	NO	1.79	-	1.95
2.1	NO	1.62	-	1.87
4	SÍ	0.39	-	1.89
4.1	SÍ	0.31	-	1.64
4.2	SÍ	0.37	-	1.76

Valores cuantificados con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:10). Cada microsistema consistía en 175mL de caldo, 0.002 g*mL⁻¹ de biomasa inicial, 0.5% m/v de peptona de carne y 0.5% m/v de extracto de levadura. Periodo de fermentación de 144h.

Cuadro 12. Condiciones iniciales de caldo fermentativo en bioreactor *Bioflo 415*.

Parámetro	Valor	Unidad
Volumen de melaza	3.5	L
Volumen caldo total	16.0	L
Concentración sacarosa	14.45	% m/v
Concentración glucosa	2.897	% m/v
Concentración fructosa	3.330	% m/v
Peptona de carne	0.5	% m/v
Extracto de levadura	0.5	% m/v
Concentración biomasa	0.0013	g*mL ⁻¹

Concentraciones de azúcares cuantificados con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:10). Volumen de melaza inicial utilizada calculada utilizando la ecuación de cálculo 1, apartado de muestras de cálculos en *apéndice*. Valor de concentración de biomasa calculado usando peso seco.

Cuadro 13. Datos experimentales de fermentación en bioreactor *Bioflo 415* tomadas en el tiempo.

Muestra	Código	Tiempo (h)	Azúcares (% m/v)			Productos (% m/v)		
			Sac.	Glu.	Fruc.	A.Lac.	Et.	A.Citri.
1	MF5.1	0.00	14.450	2.897	3.330	0.059	-	3.83
2	MF5.2	2.67	14.520	2.850	3.330	0.57	-	3.77
3	MF5.3	16.42	15.030	2.901	3.490	0.6	-	3.84
4	MF5.4	18.80	14.730	2.830	3.380	0.58	-	3.75
5	MF5.5	22.82	14.420	2.790	3.310	0.6	-	3.69
6	MF5.6	25.17	14.550	2.820	3.320	0.57	-	3.74
7	MF5.7	89.75	5.570	6.610	9.660	1.51	-	8.83
8	MF5.8	91.13	2.490	3.130	4.280	0.93	-	3.95
9	MF5.9	94.25	2.010	2.781	3.948	1.03	-	4.17
10	MF5.10	96.75	2.020	1.820	3.320	1	-	3.7
11	MF5.11	113.77	1.760	1.930	3.687	1.21	-	2.41
12	MF5.12	116.10	1.690	1.610	3.380	1.32	-	2.56
13	MF5.13	120.00	1.520	1.560	3.536	1.28	-	2.14
14	MF5.14	120.75	1.360	1.440	3.570	1.35	-	2.06
15	MF5.15	136.92	1.340	1.490	3.797	1.41	-	1.91
16	MF5.16	139.50	1.130	1.380	3.480	1.37	-	1.97
17	MF5.17	142.75	1.340	1.480	3.797	1.32	-	1.84
18	MF5.18	145.17	1.120	1.420	3.550	1.34	-	1.88
19	MF5.23	161.13	0.840	1.420	3.636	1.29	-	1.89
20	MF5.22	163.58	0.870	1.420	3.682	1.35	-	1.88
21	MF5.21	168.70	0.910	1.410	3.744	1.42	-	1.87
22	MF5.20	170.17	0.930	1.440	3.726	1.39	-	1.92
23	MF5.19	190.75	1.010	1.420	3.602	1.34	-	1.89

Código corresponde al nombre utilizado para la identificación de muestra para análisis de cromatografía. Concentraciones de azúcares y productos cuantificados con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); resultados ya corregidos con factor de dilución para análisis (1:10). Notación utilizada: Sac=sacarosa; Glu=glucosa; Fruc=fructosa; A.Lac=ácido láctico; Et=etanol; A.Citri=ácido cítrico.

B. Datos calculados

Cuadro 14. Coeficiente de rendimiento y conversión de azúcares en micro fermentación para análisis comparativo entre melaza con azúcares invertidas y sin azúcares invertidas.

Sistema	Melaza invertida	Yps (m/m)	Conversión de azúcares			
			Sacarosa	Glucosa	Fructosa	En total
1	NO	0.2676	82%	81%	77%	81%
2	NO	0.1051	100%	24%	8%	78%
2.1	NO	0.0965	100%	21%	1%	77%
4	SÍ	0.0298	-	75%	76%	75%
4.1	SÍ	0.0222	-	77%	76%	77%
4.2	SÍ	0.0279	-	75%	76%	75%

Porcentaje de conversión relaciona la cantidad final luego de la fermentación con respecto a la cantidad inicial. Notación utilizada: Yps=coeficiente de rendimiento de formación de ácido láctico contra consumo de sustrato. Valor porcentual de azúcares representa el valor masico final de cada azúcar con respecto a su valor inicial en el sistema.

Cuadro 15. Datos suavizados de fermentación: sacarosa, ácido láctico y biomasa en tiempo específico a ser utilizados en el modelo de cinética microbiana.

Dato	Tiempo (h)	Concentración (g*mL ⁻¹)		
		Sacarosa	Ácido láctico	Biomasa
1	0.0	0.1445	0.0006	0.0016
2	2.7	0.1452	0.0057	0.0018
3	17.6	0.1488	0.0059	0.0020
4	24.0	0.1449	0.0059	0.0030
5	90.4	0.0403	0.0093	0.0042
6	95.5	0.0202	0.0102	0.0042
7	114.9	0.0173	0.0127	0.0108
8	120.4	0.0144	0.0132	0.0141
9	138.2	0.0124	0.0139	0.0161
10	144.0	0.0123	0.0133	0.0165
11	162.4	0.0086	0.0132	0.0191
12	169.4	0.0092	0.0141	0.0191
13	190.8	0.0101	0.0134	0.0184

Datos suavizados obtenidos mediante promedio de cada dos valores diarios.

Cuadro 16. Determinación de peso seco para conteo microbiano durante experimentación de fermentación.

Muestra	Tiempo (h)	Vol. (mL)	P. rec. (g)	P. final (g)	P bio. (g)	Biomasa (g/mL)
1	0.0	10	84.1782	84.1910	0.0128	0.0013
2	2.7	10	29.3915	29.4096	0.0181	0.0018
3	16.4	10	29.4029	29.4215	0.0186	0.0019
4	18.8	10	91.5672	91.5885	0.0213	0.0021
5	22.8	10	29.9438	29.9736	0.0298	0.0030
6	25.2	10	29.0488	29.0788	0.0300	0.0030
7	89.8	10	77.8363	77.8624	0.0261	0.0026
8	91.1	10	32.1927	32.2501	0.0574	0.0057
9	94.3	9.8	89.0503	89.1751	0.1248	0.0127
10	96.8	11.6	31.2355	31.2841	0.0486	0.0042
11	113.8	10.3	85.1265	85.2334	0.1069	0.0104
12	116.1	9.9	88.6811	88.7921	0.1110	0.0112
13	120.0	11.3	92.5781	92.7122	0.1341	0.0119
14	120.8	10	103.2404	103.4048	0.1644	0.0164
15	136.9	11.7	100.4405	100.6292	0.1887	0.0161
16	139.5	10.5	95.0194	95.1646	0.1452	0.0138
17	142.8	9.8	77.8248	77.9842	0.1594	0.0163
18	145.2	10.8	87.8215	88.0016	0.1801	0.0167
19	161.1	8.2	85.9323	86.1024	0.1701	0.0207
20	163.6	8.9	77.1786	77.3338	0.1552	0.0174
21	168.7	8.6	96.3802	96.5447	0.1645	0.0191
22	170.2	10.3	84.4909	84.6436	0.1527	0.0148
23	190.8	8.9	80.4622	80.6261	0.1639	0.0184

Valor de concentración de biomasa ya corregida por blanco de sólidos distintos a biomasa en melaza (blanco=4.4444E-6 g/mL). Notación utilizada: P.rec= peso recipiente utilizado; P.final=peso final luego de secado (60°C por 48h); P.bio=Diferencia entre peso final y peso del recipiente, equivalente al peso seco de la biomasa en la muestra.

Cuadro 17. Error cuadrático medio (RMSE) puntual para cada valor experimental de fermentación.

Tiempo (h)	Concentración modelo (g*mL ⁻¹)			Error cuadrático medio (RMSE)		
	Sacarosa	Á. láctico	Biomasa	Sacarosa	Á. láctico	Biomasa
17.6	0.1488	0.0059	0.0020	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
24.0	0.1418	0.0062	0.0021	3.09E-03	3.42E-04	8.67E-04
90.4	0.0510	0.0102	0.0057	1.07E-02	9.32E-04	1.50E-03
95.5	0.0435	0.0106	0.0064	2.33E-02	4.76E-04	2.18E-03
114.9	0.0191	0.0122	0.0106	1.86E-03	4.66E-04	2.01E-04
120.4	0.0150	0.0126	0.0122	5.87E-04	5.66E-04	1.90E-03
138.2	0.0109	0.0134	0.0169	1.44E-03	4.78E-04	8.04E-04
144.0	0.0108	0.0135	0.0177	1.49E-03	2.33E-04	1.20E-03
162.4	0.0106	0.0137	0.0184	2.05E-03	4.51E-04	6.67E-04
169.4	0.0105	0.0137	0.0185	1.35E-03	3.89E-04	6.50E-04
190.8	0.0105	0.0137	0.0185	3.92E-04	2.68E-04	9.74E-05

Datos de RMSE utilizados para la determinación de barras de error en Figura 13 (apartado de análisis de error en *apéndice*). Para la determinación de los valores de RMSE se utilizó como valor observado los datos suavizados del Cuadro 15 a partir de la hora 17.6, y valor generado por modelo los descritos en el Cuadro anterior; ver ecuación 9 (apartado de análisis de error en *apéndice*).

Cuadro 18. Error cuadrático medio (RMSE) para cada curva de modelo cinética generada.

Parámetro de modelo	RMSE
Consumo de sacarosa	7.8694E-3
Formación ácido láctico	4.7277E-4
Crecimiento microbiano	1.1442E-3

Valores de RMSE calculados utilizando la ecuación 12 (apartado de análisis de error en *apéndice*). Para el cálculo de error el valor de muestra total equivale a 13 y corresponde a los datos experimentales a partir de la hora 17.6.

C. Datos de reactivos y equipo

1. Datos de reactivos

Cuadro 19. Datos de ácido sulfúrico utilizado en hidrólisis ácida.

Reactivo	Ácido sulfúrico
Marca	Fisher Scientific
Gravedad específica	1.84
CAS	7664-93-9

Cuadro 20. Datos de peptona de carne usado como nutriente en fermentación.

Reactivo	Peptona de carne por digestión pancreatina granulado
Marca	Merck
T. almacenamiento (°C)	15-25

Cuadro 21. Datos de extracto de levadura usado como nutriente en fermentación.

Reactivo	Extracto de levadura granulado
Marca	Merck
Temperatura almacenamiento (°C)	15-25

Cuadro 22. Datos de hidróxido de potasio usado en fermentación con melaza invertida.

Reactivo	Hidróxido de potasio
Marca	Fermont
Pureza	87.7%
CAS	1310-58-3

Cuadro 23. Datos de agar sólido MRS para siembra y crecimiento de *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830.

Reactivo	Agar sólido MRS
Marca	Scharlau
Condiciones preparación (g de sólido/L agua)	66
pH de medio (25°C)	6.2 ± 0.2

Cuadro 24. Datos de medio líquido MRS para inóculo de *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830.

Reactivo	Medio líquido MRS para lactobacilos
Marca	Criterion
Condiciones preparación (g de sólido/L agua)	55
Temperatura de almacenaje (°C)	2-8

2. Datos de equipo

Cuadro 25. Datos de balanza analítica.

Equipo	Balanza analítica
Marca	OHAUS
Modelo	PA114
Capacidad máxima (g)	110
Legibilidad (g)	0.0001

Cuadro 26. Datos de balanza de humedad para peso seco de inóculo

Equipo	Balanza de humedad en base seca
Marca	OHAUS
Modelo	MB120
Capacidad máxima (g)	120
Legibilidad (g)	0.001

Cuadro 27. Datos de centrífuga para preparación análisis de peso seco.

Equipo	Centrifugadora
Marca	Eppendorf AG
Modelo	5804 R
Clasificación	120V – 60Hz 12A
Número de serie	5805F0033302
Velocidad máxima (rpm)	14000
Densidad de líquido máxima (kg*dm ⁻³)	1.2

Cuadro 28. Datos de horno usado para el secado de muestras de biomasa a analizar en peso seco.

Equipo	Horno de convección
Marca	VWR
Modelo	E191047
Clasificación	120V – 60Hz 1.4kW
Número de serie	041042611A1013

Cuadro 29. Datos de sistema de agitación

Equipo	Agitadora con incubadora
Marca	New Brunswick Scientific
Modelo	Series 25
Velocidad máxima (rpm)	500
Temperatura máxima (°C)	100
Clasificación	120V – 60Hz 12kW

Cuadro 30. Datos de incubadora para crecimiento microbiano.

Equipo	Incubadora
Marca	Fisher Scientific
Modelo	550D
Clasificación	120V – 50/60Hz 17.7A
Número de serie	904N0053

Cuadro 31. Datos de bioreactor *Bioflo 415* para etapa de fermentación

Equipo	Bioreactor fermentador
Marca	New Brunswick Scientific
Modelo	Bioflo 415
Clasificación	208-230V – 50/60Hz 15A

D. Muestra de cálculos

Cálculo 1. Preparación de caldo fermentativo en base a concentración de azúcares

$$\text{volumen melaza} = \frac{(16L) * (10\% \frac{m}{v})}{46.8\% m/v} = 3.45L$$

El cálculo anterior fue utilizado para el cálculo de melaza pura a utilizar para el volumen total de caldo fermentativo a utilizar (volumen total equivale a volumen de melaza más volumen de agua suavizada). El volumen de melaza es el resultado de el volumen total del sistema multiplicado por el porcentaje de azúcares en p/v, dividido el porcentaje de azúcares en melaza pura. **Cálculo no toma en cuenta que la mezcla no es aditiva.**

Cálculo 2. Coeficiente de rendimiento para análisis comparativo entre melaza con y sin azúcares invertidas.

$$Y_{ps} = \frac{(0.0339 - 0.0006)g * ml^{-1}}{(0.1527 - 0.0283)g * ml^{-1}} = 0.2676$$

El cálculo anterior fue aplicado de tal manera únicamente en el análisis de sistemas de melaza con azúcares invertidas contra sin inversión. El coeficiente de rendimiento, de producto frente a sacarosa, es el resultado de la razón entre la formación de ácido láctico y el consumo de azúcares, en el periodo completo de fermentación. Ambos en unidades de concentración.

Cálculo 3. Determinación cantidad de inóculo para caldo de fermentación.

$$\text{Concentración inóculo} = \frac{0.033 g \text{ biomasa}}{1ml} = 0.033 g * ml^{-1}$$

Se inicia con la obtención de peso seco del inóculo usando una balanza de humedad (Cuadro 26 de datos de equipo). Es el resultado de la masa final del secado dividido el volumen de muestra de inóculo inicial.

$$\text{Cantidad de biomasa} = \frac{0.002g \text{ biomasa}}{ml} * 175ml = 0.35 g$$

La cantidad de biomasa requerida, en masa, es el resultado de la concentración final de microorganismos deseados en el sistema multiplicado el volumen total del sistema.

$$\text{Volumen inóculo} = 0.35 g \text{ biomasa} * \frac{1ml}{0.033g \text{ biomasa}} = 10.60 ml$$

Por último, el volumen de inóculo a centrifugar para el sistema específico es el resultado de la cantidad de biomasa requerida multiplicado el inverso de la concentración del inóculo.

El sistema de ecuaciones anterior fue utilizado para el cálculo del volumen de inóculo para todos los sistemas de fermentación preparados durante el estudio.

Cálculo 4. Determinación de concentración biomasa por peso seco.

$$\text{Concentración biomasa} = \frac{(84.1910 - 84.1782)g}{10ml \text{ muestra}} = 1.2800E^{-3}g * ml^{-1}$$

La concentración de biomasa por peso seco es el resultado de la diferencia de peso entre el sistema recipiente+muestra menos el peso del recipiente. El valor resultante es dividido en el volumen de muestra tomada durante experimentación a analizar.

E. Análisis de error

Ecuación 12. Ecuación de error cuadrático (RMSE) medio para modelo cinético.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(y_t - f_t)^2}{n_{tot}}}$$

Descripción de variables:

y_i : Datos experimentales obtenidos, en tiempo t específico.

f_i : Datos generados en modelo en tiempo t específico

n_{tot} : Número total de datos de población

Ecuación anterior utilizada para el cálculo de RMSE de cada curva generada en el modelo descrito anteriormente. Las tres curvas poseen el mismo número total de población, equivalente al número de datos experimentales (11 datos totales a partir de la hora 17.6).

Error medio cuadrático para cada curva de modelo cinética

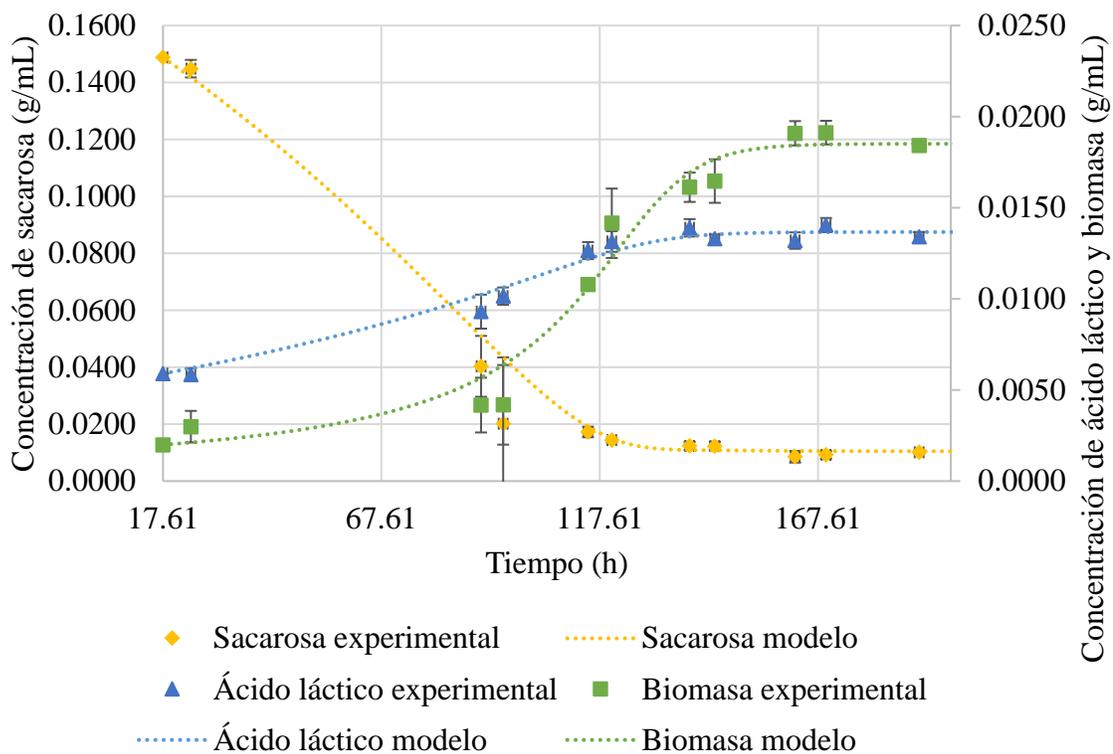


Figura 21. Gráfico con barras de error para los modelos cinéticos definidos.

F. Cromatogramas

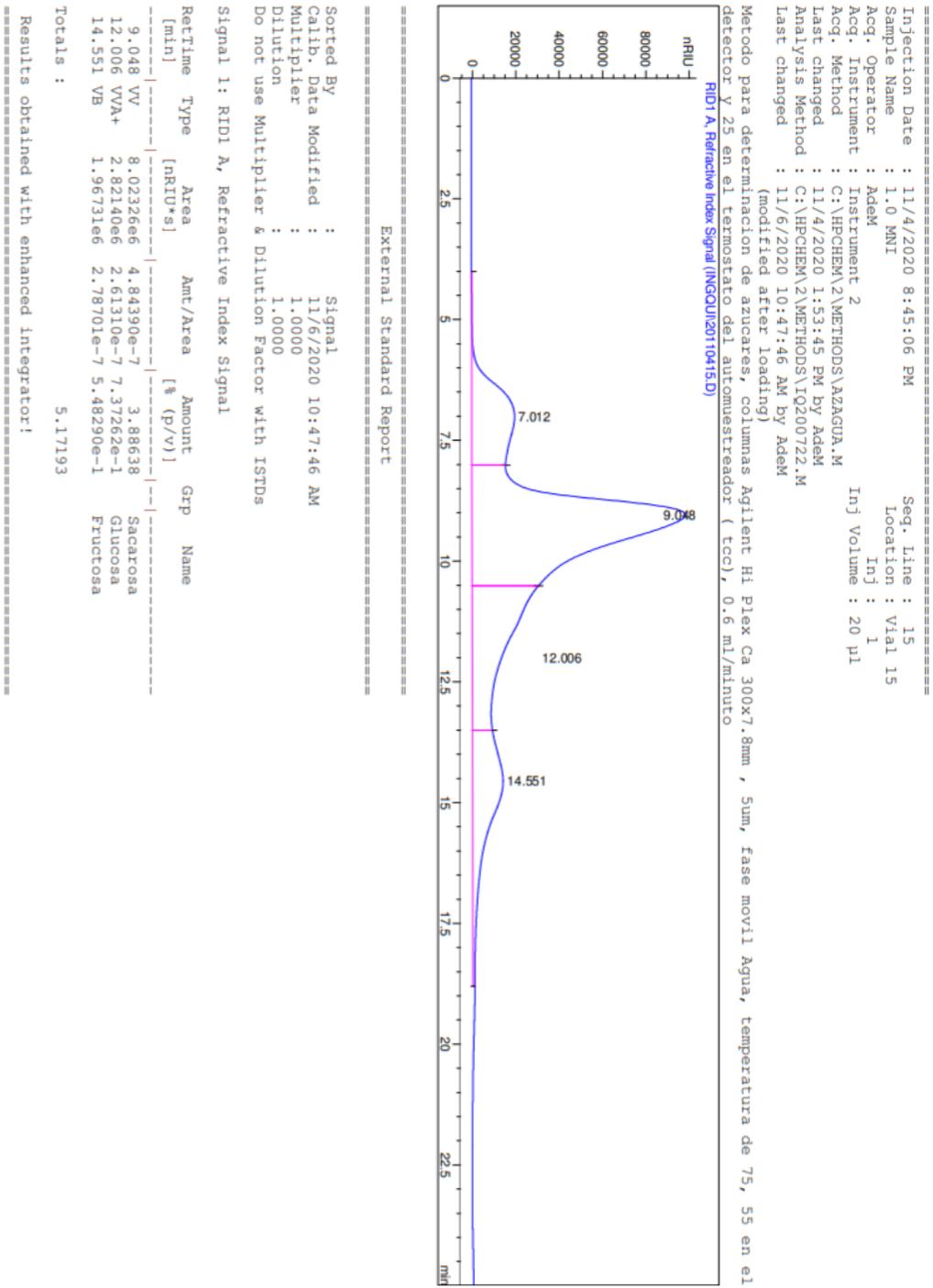


Figura 22. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC de melaza con azúcares no invertidas: análisis de azúcares

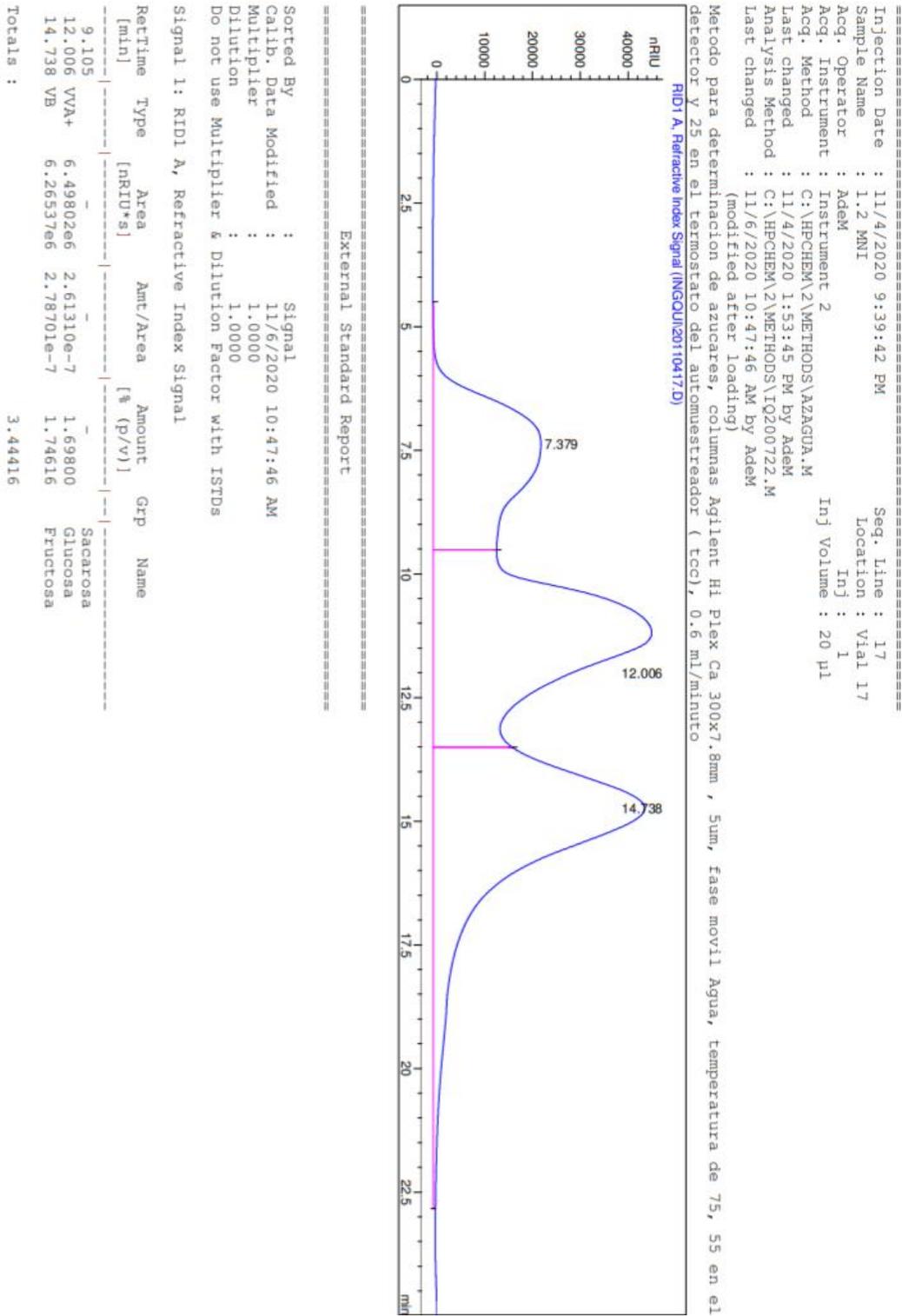


Figura 23. Ejemplo de resultado de cromatograma de HPLC de melaza con azúcares invertidas: análisis de azúcares.

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name	
9.105	1	1	5.04400e-1	3.73257e5	1.35135e-6	Sacarosa
		2	9.44880e-1	2.21955e6	4.25708e-7	
		3	1.93988	3.97723e6	4.87747e-7	
		4	3.84548	7.62396e6	5.04394e-7	
		5	4.54460	9.67855e6	4.69554e-7	
12.006	1	1	3.71400e-1	1.67583e6	2.21622e-7	Glucosa
		2	7.53040e-1	2.81193e6	2.67802e-7	
		3	1.56624	5.78971e6	2.70521e-7	
		4	2.97880	1.17263e7	2.54028e-7	
		5	3.89860	1.47410e7	2.64474e-7	
14.855	1	1	6.04000e-1	2.50810e6	2.40820e-7	Fructosa
		2	1.19700	4.38150e6	2.73194e-7	

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
		3	1.82488	5.97769e6	3.05282e-7
		4	2.41000	9.33083e6	2.58284e-7
		5	3.30660	1.15871e7	2.85368e-7

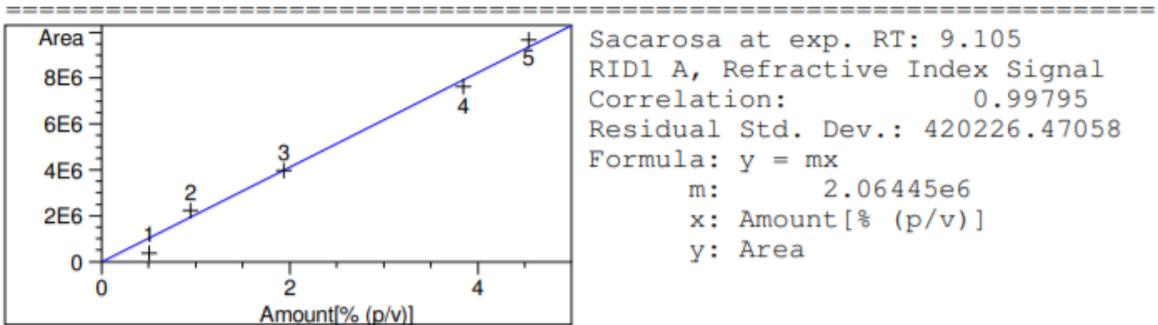
More compound-specific settings:

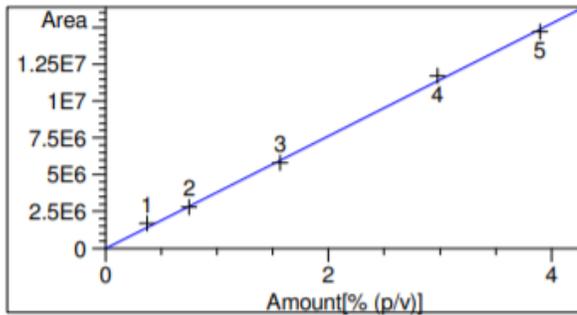
Compound: Sacarosa
Time Window : From 8.241 min To 9.941 min

Compound: Glucosa
Time Window : From 10.300 min To 13.500 min

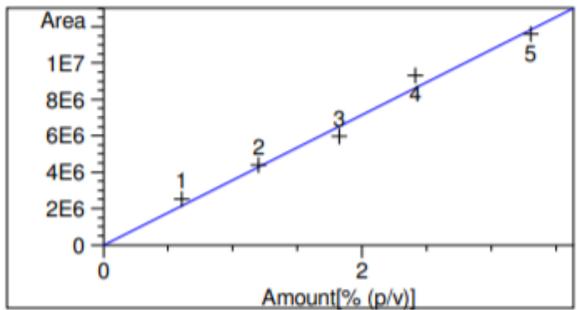
Compound: Fructosa
Time Window : From 13.675 min To 17.648 min

Calibration Curves





Glucosa at exp. RT: 12.006
 RID1 A, Refractive Index Signal
 Correlation: 0.99969
 Residual Std. Dev.: 249979.73652
 Formula: $y = mx$
 m: 3.82687e6
 x: Amount [% (p/v)]
 y: Area



Fructosa at exp. RT: 14.855
 RID1 A, Refractive Index Signal
 Correlation: 0.99824
 Residual Std. Dev.: 498205.91344
 Formula: $y = mx$
 m: 3.58808e6
 x: Amount [% (p/v)]
 y: Area

Figura 25. Curva de calibración en HPLC utilizada para cuantificación de azúcares.

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name	
14.080	1	1	2.00000	3.65317e6	5.47469e-7	Acido Lactico
		2	4.00000	6.84355e6	5.84492e-7	
		3	6.00000	1.03743e7	5.78352e-7	
		4	8.00000	1.38324e7	5.78351e-7	
		5	10.00000	1.63900e7	6.10126e-7	

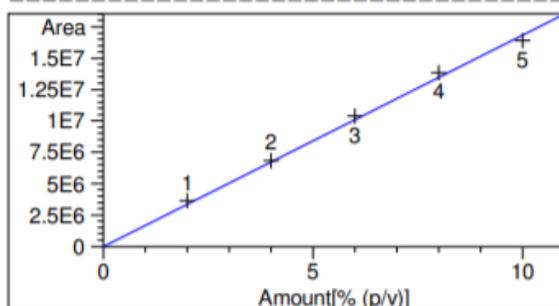
1 Warnings or Errors :

Warning : Compound has no name, (Acido Lactico)

=====

=====

Calibration Curves



Acido Lactico at exp. RT: 14.080
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99961
Residual Std. Dev.: 351324.67937
Formula: $y = mx$
m: 1.68857e6
x: Amount [% (p/v)]
y: Area

=====

Figura 26. Curva de calibración en HPLC utilizada para cuantificación de ácido láctico.

G. Ilustraciones

Cambio de concentración de microorganismos en el tiempo
contra cambio de ácido láctico en el tiempo

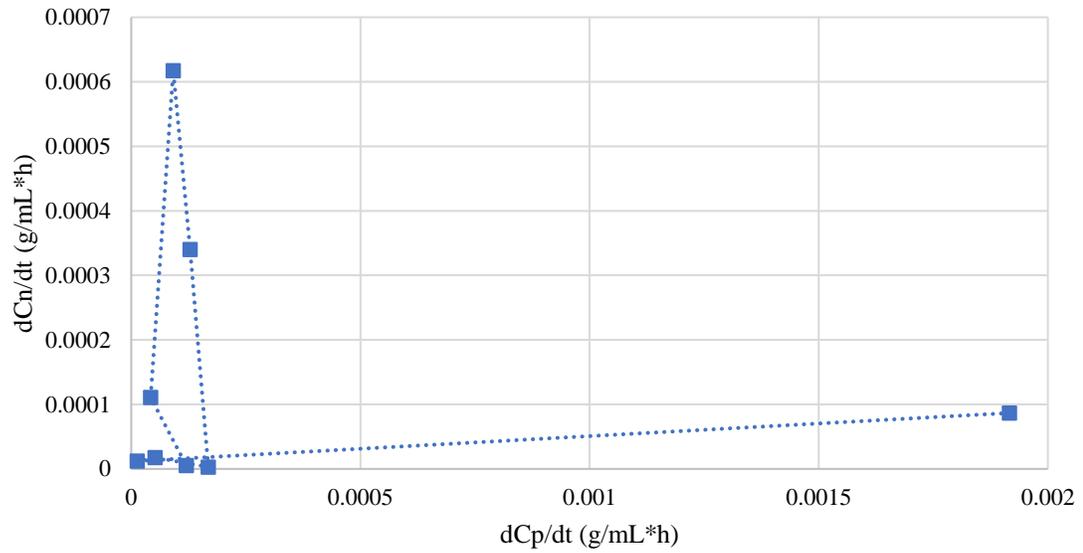


Figura 27. Curva de tendencia en la dependencia del cambio de microorganismos en el tiempo contra cambio de ácido láctico en el tiempo.

Notación utilizada en gráfico anterior: dCn/dt =cambio de concentración de microorganismos en el tiempo, dCp/dt =cambio de formación de ácido láctico en el tiempo.

Curva de datos experimentales de biomasa, sacarosa y ácido láctico en el tiempo suavizada

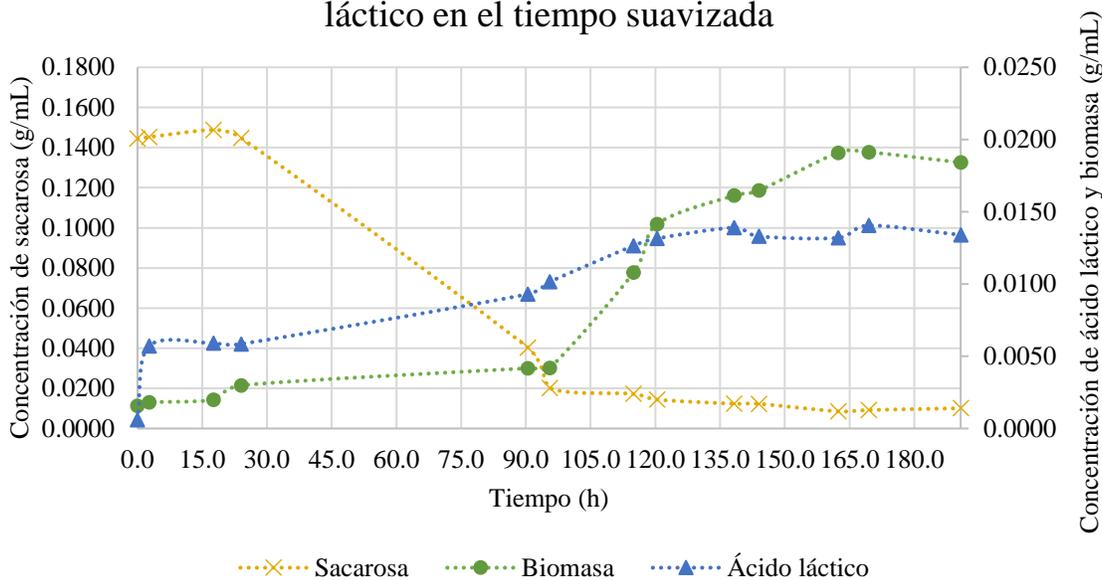


Figura 28. Curva con datos suavizados de concentración de microorganismos, sacarosa y ácido láctico en el tiempo para generación de modelo cinético.

Consumo de azúcares en el tiempo durante fermentación

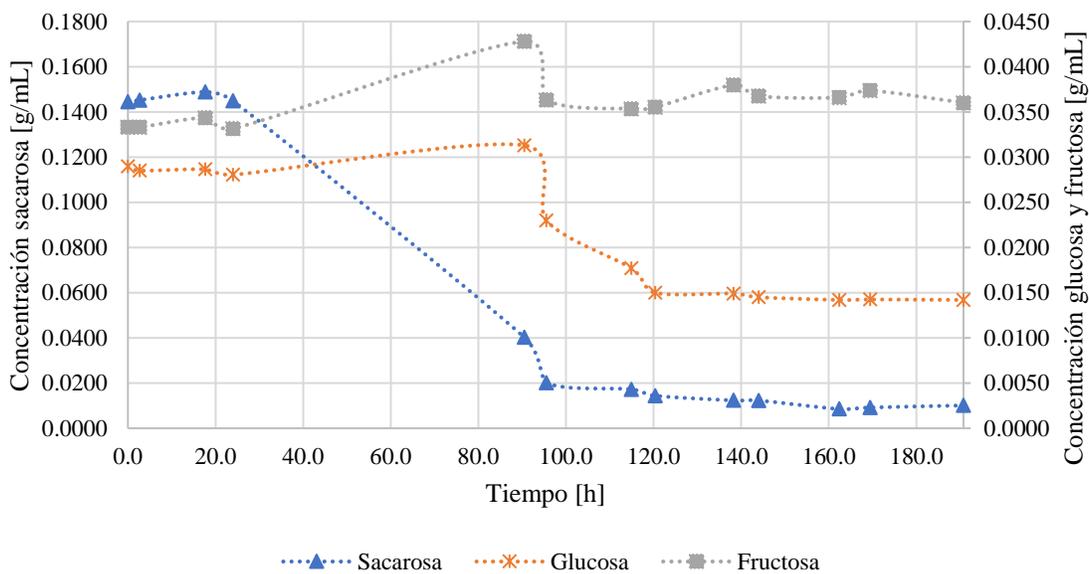


Figura 29. Gráfica de consumo de azúcares en el tiempo durante la etapa de fermentación

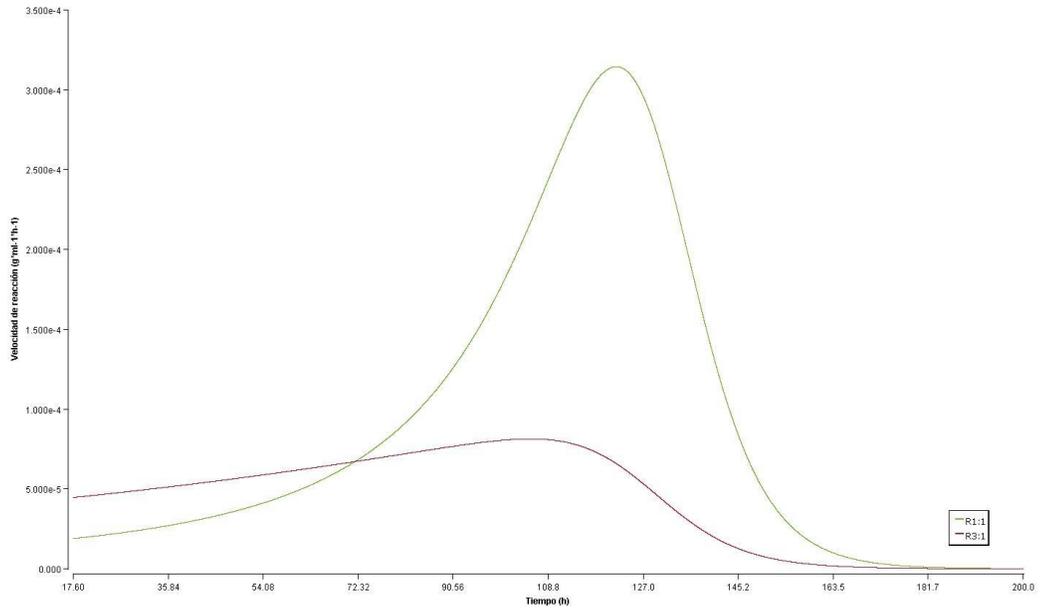


Figura 30. Gráfica de velocidad de reacción para el crecimiento microbiano y la formación de ácido láctico en el tiempo durante el periodo de fermentación generada en Berkeley Madonna.



Figura 31. Sistema de fermentación 1 utilizando melaza sin azúcares invertidas, luego de 144 horas de fermentación utilizando *Lactobacillus leichmannii*

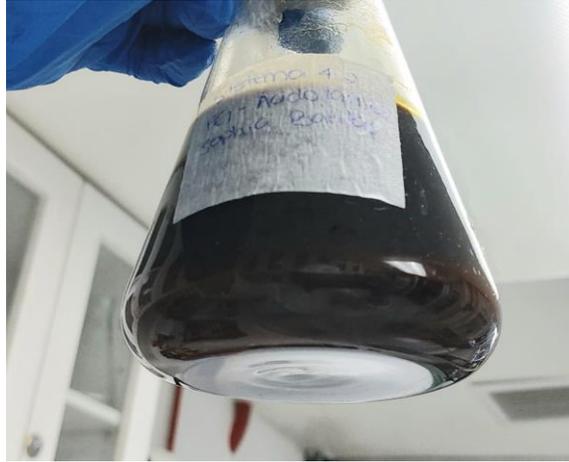


Figura 32. Sistema de fermentación 4 utilizando melaza con azúcares invertidas, luego de 144 horas de fermentación utilizando *Lactobacillus leichmannii*.



Figura 33. Agar MRS sólido con *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 luego de 48 h de incubación para crecimiento.



Figura 34. Caldo fermentativo resultante luego de 190h de fermentación en bioreactor *Bioflo 415*



Figura 35. Sistema con inóculo a centrifugar para su posterior introducción a caldo a fermentar.



Figura 36. Sistema utilizado para peso seco en horno a 60°C por 48h.

XIII. GLOSARIO

ÁCIDO LÁCTICO. Ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo, de la forma $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$). Precursor para la generación del polímero PLA.

AZÚCARES REDUCTORAS. Azúcares con su grupo carbonilo disponible, refiere a la glucosa y fructosa en el presente trabajo.

CINETICA DE REACCIÓN. Análisis de los mecanismos de reacción y su velocidad resultante.

FERMENTACIÓN HETEROLÁCTICA. Fermentación láctica donde se tiene ácido láctico como único producto. Inicia con glucolisis y luego asume la ruta metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

FERMENTACIÓN HOMOLÁCTICA. Fermentación láctica donde se genera una mezcla de productos: ácido láctico, etanol, dióxido de carbono, u otro ácido orgánico. Asume la ruta metabólica 6-PG/PK.

HIDROLISIS. Reacción de descomposición de sustancias complejas, orgánicas o inorgánicas, en otras más sencillas por acción de agua.

LAB. Bacteria ácido-láctica, constituido por grupo de bacteria gram-positiva unida por características de tipo morfológico, metabólico y fisiológico, que poseen la capacidad de producir ácido láctico mediante fermentación.

MELAZA. Residuo del proceso de la cristalización del azúcar de caña, de color oscuro y alta viscosidad. Utilizado comúnmente como materia prima en la industria de bebidas alcohólicas o como suplemento alimenticio para ganado.

RMSE. Error cuadrático medio. Cuantifica el error existente entre dos conjuntos de datos.