

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la fermentación de melaza de caña de azúcar empleando bacterias lácticas para la producción de ácido láctico

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por

María José Suasnívar Ardón

para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala,

2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la fermentación de melaza de caña de azúcar empleando bacterias lácticas para la producción de ácido láctico

Trabajo de graduación en modalidad de trabajo profesional presentado por

María José Suasnávar Ardón

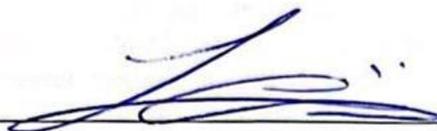
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala,

2022

Vo. Bo.:

(f)



Ing. Luis Ernesto Núñez González

Tribunal Examinador:

(f)

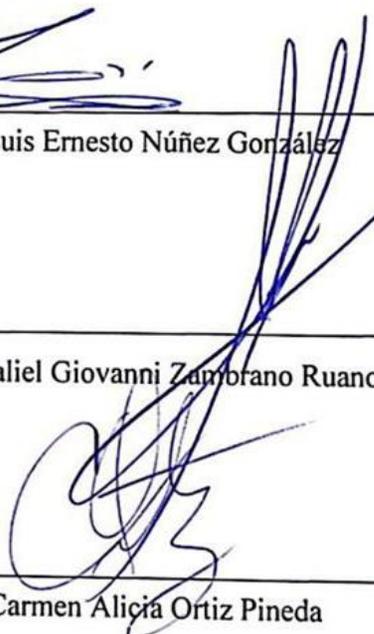


Ing. Luis Ernesto Núñez González

(f)

Ing. Gamaliel Giovanni Zapirano Ruano

(f)



Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala, 16 de junio 2022

PREFACIO

La elaboración de este trabajo surgió del interés por el desarrollo de la industria biotecnológica en Guatemala que puede ampliarse a través de la adaptación y transformación de ingenios azucareros en biorrefinerías. Estudiando en este trabajo la producción de ácido láctico a partir de melaza empleando bacterias lácticas, aportando como Ingeniero en Biotecnología Industrial la generación de modelos cinéticos para el escalamiento del proceso.

Agradezco a mis padres que me apoyaron incondicionalmente en este camino, a mis catedráticos que fueron mis guías, a mis hermanos y amigos que hicieron el camino más agradable, a la Universidad del Valle de Guatemala que me abrió las puertas de su casa de estudios y a la Fundación de la Universidad del Valle que patrocinó parte de mi carrera.

A la memoria de mi padre, siempre conmigo.

ÍNDICE

PREFACIO	V
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ECUACIONES	XV
RESUMEN.....	XVI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	3
A. OBJETIVO GENERAL	3
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	6
A. ÁCIDO LÁCTICO	6
B. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR VÍA BIOTECNOLÓGICA	11
C. AZÚCAR	15
D. CINÉTICA QUÍMICA.....	22
V. ANTECEDENTES	27
VI. METODOLOGÍA.....	31
A. ACTIVACIÓN DE CEPAS	31
B. PREPARACIÓN DE INÓCULO PARA FERMENTACIÓN.....	32
C. PREPARACIÓN DE MELAZA SIN TRATAMIENTO.....	33
D. HIDRÓLISIS DE MELAZA.....	34
E. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE EXTRACTO DE LEVADURA	35
F. PRUEBA FACTORIAL DE FERMENTACIÓN DE MELAZA VARIANDO TRATAMIENTO DE MELAZA, CONCENTRACIÓN DE MELAZA Y CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA.....	36

G. ANÁLISIS FACTORIAL DE FERMENTACIÓN DE MELAZA VARIANDO TRATAMIENTO DE MELAZA, CONCENTRACIÓN DE MELAZA Y CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA.....	39
H. FERMENTACIÓN DE MELAZA SUPLEMENTADA CON EXTRACTO DE LEVADURA PARA GENERACIÓN DE MODELO CINÉTICO DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	40
I. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS	41
J. ANÁLISIS DE MUESTRAS CON HPLC	42
K. DETERMINACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO QUE DESCRIBE EL CRECIMIENTO CELULAR Y CONSUMO DE SUSTRATO, UTILIZANDO EL SOFTWARE BERKELEY MADONNA ®.....	43
VII. RESULTADOS.....	44
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
IX. CONCLUSIONES	64
X. RECOMENDACIONES.....	65
XI. BIBLIOGRAFÍA	66
XII. ANEXOS	69
A. DATOS ORIGINALES.....	69
B. DATOS CALCULADOS.....	79
C. MUESTRA DE CÁLCULOS	90
D. ANÁLISIS DE ERROR	92
E. DATOS DE REACTIVOS Y EQUIPO	93
F. ILUSTRACIONES.....	97
G. CURVAS DE CALIBRACIÓN HPLC.....	98
H. ANÁLISIS FACTORIAL	99
I. CÓDIGOS DE BERKELEY MADONNA.....	104
XIII. GLOSARIO.....	106

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de ácido láctico	7
Cuadro 2. Composición promedio de miel final de caña de azúcar generada en ingenios guatemaltecos durante la zafra 2019-2020.	20
Cuadro 3. Datos de fermentación de ácido láctico usando varios sustratos, cepas microbianas, modos operativos y métodos con sus respectivas condiciones optimizadas	29
Cuadro 4. Parámetros óptimos estimados para la fermentación de lactosa por <i>L. plantarum</i>	30
Cuadro 5. Diseño factorial de fermentación de melaza	38
Cuadro 6. Porcentaje de hidrólisis de sacarosa en melaza de caña de azúcar por hidrólisis ácida utilizando ácido clorhídrico	44
Cuadro 7. Comparación de producción de ácido láctico por fermentación empleando <i>L. casei</i> a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada.....	45
Cuadro 8. Comparación de producción de ácido láctico por fermentación empleando <i>L. plantarum</i> a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada.....	46
Cuadro 9. Constantes cinéticas de la producción de ácido láctico empleando <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> a partir de melaza de caña de azúcar obtenidas de Berkeley Madonna	54
Cuadro 10. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y <i>L. casei</i>	69
Cuadro 11. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y <i>L. plantarum</i>	69
Cuadro 12. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y <i>L. casei</i>	70
Cuadro 13. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y <i>L. plantarum</i>	70
Cuadro 14. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y <i>L. casei</i>	71
Cuadro 15. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y <i>L. plantarum</i>	71

Cuadro 16. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y <i>L. casei</i>	72
Cuadro 17. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y <i>L. plantarum</i>	72
Cuadro 18. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de <i>L. casei</i>	73
Cuadro 19. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de <i>L. casei</i> – duplicado.....	73
Cuadro 20. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de <i>L. plantarum</i>	74
Cuadro 21. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de <i>L. plantarum</i> – duplicado.....	74
Cuadro 22. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de <i>L. casei</i>	75
Cuadro 23. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de <i>L. casei</i> – duplicado	75
Cuadro 24. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de <i>L. plantarum</i>	76
Cuadro 25. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de <i>L. plantarum</i> – duplicado.....	76
Cuadro 26. pH de muestras para modelo cinético de <i>L. casei</i>	77
Cuadro 27. pH de muestras para modelo cinético de <i>L. casei</i> – duplicado.....	77
Cuadro 28. pH de muestras para modelo cinético de <i>L. plantarum</i>	78
Cuadro 29. pH de muestras para modelo cinético de <i>L. plantarum</i> – duplicado ...	78
Cuadro 30. Concentración de azúcares y ácido láctico de inóculos y melaza para fermentación por <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> de melaza no hidrolizada	79
Cuadro 31. Concentración de azúcares y ácido láctico de inóculos y melaza para fermentación por <i>L. casei</i> de melaza hidrolizada.....	79

Cuadro 32. Concentración de azúcares y ácido láctico de inóculos y melaza para fermentación por <i>L. plantarum</i> de melaza hidrolizada	79
Cuadro 33. Biomasa seca de inóculos y melaza para fermentación por <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> de melaza no hidrolizada	80
Cuadro 34. Biomasa seca de inóculo y melaza para fermentación por <i>L. casei</i> de melaza hidrolizada	80
Cuadro 35. Biomasa seca de inóculo y melaza para fermentación por <i>L. plantarum</i> de melaza hidrolizada.....	80
Cuadro 36. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza no hidrolizada empleando <i>L. casei</i>	81
Cuadro 37. Biomasa seca en fermentación de melaza no hidrolizada empleando <i>L. casei</i>	81
Cuadro 38. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza no hidrolizada empleando <i>L. plantarum</i>	82
Cuadro 39. Biomasa seca en fermentación de melaza no hidrolizada empleando <i>L. plantarum</i>	82
Cuadro 40. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza hidrolizada empleando <i>L. casei</i>	83
Cuadro 41. Biomasa seca en fermentación de melaza hidrolizada empleando <i>L. casei</i>	83
Cuadro 42. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza hidrolizada empleando <i>L. plantarum</i>	84
Cuadro 43. Biomasa seca en fermentación de melaza hidrolizada empleando <i>L. plantarum</i>	84
Cuadro 44. Consumo de sustrato por fermentación empleando <i>L. casei</i> a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada	85
Cuadro 45. Consumo de sustrato por fermentación empleando <i>L. plantarum</i> a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada	86
Cuadro 46. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por <i>L. casei</i> para modelo cinético	87

Cuadro 47. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por <i>L. casei</i> para modelo cinético - duplicado	87
Cuadro 48. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por <i>L. plantarum</i> para modelo cinético	88
Cuadro 49. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por <i>L. plantarum</i> para modelo cinético - duplicado.....	88
Cuadro 50. Concentración promedio de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por <i>L. casei</i> para modelo cinético	89
Cuadro 51. Concentración promedio de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por <i>L. plantarum</i> para modelo cinético	89
Cuadro 52. Melaza	93
Cuadro 53. Caldo MRS para lactobacilos	93
Cuadro 54. Agar MRS.....	94
Cuadro 55. Extracto de levadura granulado	94
Cuadro 56. Hidróxido de sodio	94
Cuadro 57. Ácido clorhídrico fumante.....	94
Cuadro 58. Balanza de laboratorio.....	94
Cuadro 59. Balanza analítica.....	95
Cuadro 60. Centrifugadora para tubos Falcon de 50 mL	95
Cuadro 61. Centrifugadora de capacidad de un 1L.....	95
Cuadro 62. Incubadora	95
Cuadro 63. Incubadora con agitación.....	96
Cuadro 64. Horno de convección.....	96
Cuadro 65. Potenciómetro.....	96
Cuadro 66. Información de equipo HPLC para análisis de concentración de azúcar	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isómeros de ácido láctico.....	6
Figura 2. Demanda global de ácido láctico en diferentes sectores de 2018.....	8
Figura 3. Secuencia de producción de ácido láctico por síntesis química.	9
Figura 4. Reacciones estequiométricas involucradas en la reacción de producción de ácido láctico por fermentación.	10
Figura 5. Diagrama de flujo de proceso de la producción de ácido láctico por fermentación a partir de recursos orgánicos.	11
Figura 6. Vías metabólicas de BAL para producción de ácido láctico.	12
Figura 7. Estructuras desarrolladas y reacción química entre glucosa y fructosa para la formación de sacarosa.	15
Figura 8. Proceso de producción de azúcar.....	17
Figura 9. Producción de azúcar por zafra en Guatemala	18
Figura 10. Ventas de azúcar en el mercado interno y exportaciones de la Agroindustria en Guatemala	19
Figura 11. Hidrólisis de sacarosa	21
Figura 12. Curva de crecimiento bacteriano	23
Figura 13. Velocidad de crecimiento específica en función de la concentración de sustrato según modelo de Monod.	26
Figura 14. Gráfica de efectos principales para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, <i>L. casei</i>	47
Figura 15. Gráfica de interacción para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, <i>L. casei</i>	47
Figura 16. Gráfica de efectos principales para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, <i>L. plantarum</i>	48
Figura 17. Gráfica de interacción para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, <i>L. plantarum</i>	48

Figura 18. Balance de masa del sistema MB3 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza no hidrolizada empleando <i>L. casei</i>	49
Figura 19. Balance de masa del sistema MHA2 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza hidrolizada empleando <i>L. casei</i>	49
Figura 20. Balance de masa del sistema MB3 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza no hidrolizada empleando <i>L. plantarum</i>	50
Figura 21. Balance de masa del sistema MHB1 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza hidrolizada empleando <i>L. plantarum</i>	50
Figura 22. Consumo de azúcares y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de <i>L. casei</i>	51
Figura 23. Consumo de azúcares y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de <i>L. plantarum</i>	51
Figura 24. Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los datos experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de azúcares y producción de ácido láctico de <i>L. casei</i>	55
Figura 25. Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los datos experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de azúcares y producción de ácido láctico de <i>L. plantarum</i>	56
Figura 26. Consumo de azúcares totales y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de <i>L. casei</i>	97
Figura 27. Consumo de azúcares totales y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de <i>L. plantarum</i>	97
Figura 28. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de sacarosa	98
Figura 29. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de glucosa.....	98
Figura 30. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de fructosa	98
Figura 31. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de ácido láctico	98
Figura 32. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando <i>L. casei</i> a partir melaza no hidrolizada.....	99

Figura 33. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando <i>L. casei</i> a partir melaza hidrolizada.....	99
Figura 34. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando <i>L. plantarum</i> a partir melaza no hidrolizada.....	100
Figura 35. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando <i>L. plantarum</i> a partir melaza hidrolizada.....	100
Figura 36. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Tratamiento de melaza, <i>L. casei</i>	101
Figura 37. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de melaza, <i>L. casei</i>	101
Figura 38. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de extracto de levadura, <i>L. casei</i>	102
Figura 39. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Tratamiento de melaza, <i>L. plantarum</i>	102
Figura 40. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de melaza, <i>L. plantarum</i>	103
Figura 41. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de extracto de levadura, <i>L. plantarum</i>	103

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación logística para crecimiento microbiano	24
Ecuación 2. Crecimiento de biomasa en función del tiempo.	25
Ecuación 3. Ecuación de Monod para el crecimiento de biomasa.	25
Ecuación 4. Ecuación de Monod para el consumo de sustrato.	25
Ecuación 5. Ecuación integrada del modelo de Monod.....	25
Ecuación 6. Ecuación de Monod empleando <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> para la producción de ácido láctico.....	52
Ecuación 7. Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo empleando <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> para la producción de ácido láctico	52
Ecuación 8. Ecuación cinética de producción de ácido láctico en función del tiempo empleando <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i>	53
Ecuación 9. Ecuación cinética de consumo de azúcares en función del tiempo empleando <i>L. casei</i> y <i>L. plantarum</i> para la producción de ácido láctico	53
Ecuación 10. Propagación de error de sumas y restas	92
Ecuación 11. Propagación de error de multiplicaciones y divisiones.....	92
Ecuación 12. Desviación estándar.....	92

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es evaluar la fermentación de melaza de caña de azúcar empleando *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* para la producción de ácido láctico, evaluando el efecto de la hidrólisis, concentración de melaza y concentración de extracto de levadura en el rendimiento de producción de ácido láctico sobre sustrato. Se determinó que la hidrólisis de melaza no tiene un efecto positivo en el rendimiento de producción de ácido láctico sobre azúcares totales. Así mismo, se observó que la concentración de melaza y extracto de levadura en el medio poseen un efecto significativo en el rendimiento de producción de ácido láctico y biomasa sobre azúcares totales; obteniendo el mayor rendimiento global (0.8876 y 0.8576 g/g, para *L. casei* y *L. plantarum*, respectivamente) a una concentración de 170 g/L de melaza y 15 g/L de extracto de levadura. Finalmente, el crecimiento microbiano, la producción de ácido láctico y el consumo de azúcares totales fueron descritos por ecuaciones cinéticas. Determinando los valores de las constantes cinéticas como tasa máxima de crecimiento específica (μ_{max}), 2.37 h⁻¹ y 0.619 h⁻¹; constante de afinidad al sustrato (k_s), 3.44 g/L y 46.0 g/L; constante de inhibición por sustrato (k_s), 8.24 y 59.8 g/L; constante de inhibición por producto (k_p), 14.0 y 36.5 g/L; constante asociada al crecimiento para la producción de ácido láctico (α), 5.55 y 4.02 g/g; constante no asociada al crecimiento para la producción de ácido láctico (β) 7.69 y 11.4 g/(g*h) para *L. casei* y *L. plantarum*, respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico (AL) es un ácido orgánico de importancia industrial con aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica y química, siendo el producto químico básico más vendido a nivel mundial. Su demanda tiene un crecimiento anual de 5.8% y en el año 2017 tuvo una producción anual mayor a 350,000 toneladas. Este tiene un gran potencial de expansión en el mercado por su nueva aplicación como monómero en la síntesis de ácido poliláctico (PLA) capaz de sustituir a los plásticos convencionales. La producción de PLA tiene un incremento de 12-15% anual y se tiene proyectado un aumento de demanda de 45.5% (Anaya y López, 2018; Munilla y Carracedo, 2005; Joglekar *et al.*, 2006; Jarvis, 2001).

La producción biotecnológica de ácido láctico ha adquirido gran importancia industrial con respecto a la síntesis química debido al uso de materias primas renovables de bajo costo y condiciones de reacción suaves, que requieren un menor consumo de energía. En décadas recientes las investigaciones han sido direccionadas a la optimización de la producción de este ácido, con la premisa de lograr mayor productividad, rendimientos y bajo costo. La fermentación de sustratos ricos en carbohidratos empleando bacterias y hongos produce enantiómeros ópticamente puros de ácido láctico. Los microorganismos comúnmente empleados son las bacterias ácido-lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus*, como *L. casei* y *L. plantarum*. Ambas bacterias son heterofermentativas facultativas, que fermentan azúcares de hexosas a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas, produciendo lactato y etanol a partir de glucosa y lactosa (García, Arrazola y Durango, 2010; Anaya y López, 2018).

Por otro lado, la melaza de caña de azúcar es una fuente potencial de carbono para la producción biotecnológica de ácido láctico. La conversión de ingenios azucareros en biorrefinerías es una oportunidad clave para aumentar la rentabilidad de estos. Una biorrefinería de melaza podría producir productos químicos básicos, con alto volumen de producción y costo reducido, mediante fermentación. El bioproceso para la conversión de melaza en productos químicos se lleva a cabo en cuatro etapas: pretratamiento para aumentar la disponibilidad de azúcares fermentables en el sustrato y eliminar la contaminación, fermentación que se realiza en biorreactores, recuperación y purificación (Anaya y López, 2018; Abdur *et al.*, 2020).

En este caso, el planteamiento de un modelo matemático de crecimiento microbiano es necesario para escalar procesos realizados a nivel laboratorio. Estos para el estudio de procesos de fermentación tienen entre sus principales aplicaciones correlacionar datos experimentales y hacer una predicción cuantitativa del proceso, reducir costos en diseño experimental y considerar variables que afecten su desarrollo (Altioek, Tokatl y Harsa, 2006).

El objetivo de este trabajo es evaluar la fermentación de melaza de caña de azúcar empleando *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* para la producción de ácido láctico. Teniendo como objetivos específicos evaluar el efecto de la hidrólisis ácida de melaza como método de pretratamiento en el rendimiento de producción de ácido láctico; determinar las concentraciones de melaza y extracto de levadura en el medio que maximicen el rendimiento de ácido láctico; y determinar el modelo cinético de la fermentación de ambas bacterias que describa el crecimiento microbiano, la producción de ácido láctico y el consumo de sustrato.

II. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la fermentación de melaza de caña de azúcar empleando *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* para la producción de ácido láctico.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la hidrólisis ácida de melaza como método de pretratamiento en el rendimiento de producción de ácido láctico en una fermentación por *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*.
2. Determinar las concentraciones de melaza y extracto de levadura en el medio de cultivo que generen el mayor rendimiento de producción de ácido láctico a través de fermentaciones a escala laboratorio.
3. Plantear la cinética de reacción de la producción de ácido láctico, empleando el pretratamiento y concentraciones de melaza y extracto de levadura en el medio de cultivo que generen el mayor rendimiento.

III. JUSTIFICACIÓN

La problemática ambiental, social y económica derivada de la dependencia hacia los productos de origen fósil ha traído consigo la necesidad de desarrollar alternativas sustentables para la generación de productos similares a estos. Una de ellas son las biorrefinerías, que son estructuras que integran procesos de conversión de biomasa y equipamiento para producir combustibles, energía y productos químicos con valor agregado. La conversión o adaptación de ingenios azucareros en biorrefinerías es una oportunidad potencial para ampliar la gama de productos que esta posee y aumentar su rentabilidad, aprovechando los subproductos como la melaza para generar productos de valor agregado. La industria azucarera nacional es de gran importancia en Guatemala puesto que el azúcar es el cuarto producto de mayor exportación en el país, representando el 6.5% de exportaciones totales, así mismo es el sexto país exportador de azúcar en el mundo y tercero de Latinoamérica. En la zafra 2018/2019 la molienda de caña de azúcar fue de 27.5 millones de toneladas y en promedio se producen 38.3 galones de melaza por tonelada de caña, lo que equivale a 1,051,600 toneladas por zafra. La melaza de caña de azúcar es un subproducto y debido a su composición mayoritaria de sacarosa tiene gran potencial para convertirse en la materia prima principal de una biorrefinería (Méndez, 2020; Anaya y López, 2018; CENGICANA, 2020).

Uno de los productos químicos básicos más vendido a nivel mundial es el ácido láctico, el cual en el año 2010 representó casi el 80% del mercado mundial de productos químicos renovables en conjunto con el glicerol. Actualmente se observa un aumento en su demanda, ya que este se utiliza como materia prima para la síntesis del biopolímero ácido poliláctico (PLA) que es una alternativa biodegradable, biocompatible y prometedora como sustituto de los plásticos derivados de petroquímicos. La producción de ácido láctico puede ser tanto por síntesis química como por vía biotecnológica empleando bacterias ácido-lácticas, siendo la segunda la preferida, ya que por esta vía se obtiene ácido láctico ópticamente puro, que es una característica crucial para las propiedades físicas del PLA, además que puede producirse a partir de fuentes renovables (Anaya y López, 2018). Dado al aumento de demanda de este producto y la potencial rentabilidad que este tendría al producirse a partir de un subproducto abundante como la melaza, se planteo en este proyecto el estudio de la producción de ácido láctico a partir de melaza empleando bacterias lácticas.

En el presente la manufactura de este ácido en las industrias por fermentación se lleva a cabo con azúcares puros, resultando en un aumento en el costo de materias primas. Adicionalmente, la fermentación aún lidia con problemas en términos de productividad y el principal obstáculo en esta a gran escala es alcanzar un alto rendimiento y pureza óptica

con sustratos de bajo costo. La melaza representa un sustrato económicamente favorable que puede sustituir a las materias primas usualmente utilizadas. Sin embargo, esta puede requerir un pretratamiento para hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa, según las preferencias de sustrato que posea el microorganismo empleado. Así mismo, la concentración de melaza en el medio es uno de los factores que puede influenciar en el rendimiento de producción, ya que una concentración elevada podría causar inhibición en el microorganismo, así como una concentración baja podría provocar un crecimiento y producción deficiente. Por otro lado, las bacterias ácido-lácticas son microorganismos fastidiosos que requieren la suplementación del medio con fuentes de nitrógeno y vitaminas para su adecuado crecimiento (Anaya y López, 2018). Por lo cual en este trabajo se evaluó el efecto de la hidrólisis ácida de melaza en el rendimiento de producción de AL y se determinó la concentración de melaza y extracto de levadura que genere el mayor rendimiento de producción de ácido láctico.

Un estudio comparativo de la producción de ácido láctico realizado por Nandasana y Kumar (2007) demostró que el trabajo experimental de la producción de AL partir de residuos agroindustriales es alta, mientras que el estudio de modelado y optimización es bajo. Los modelos matemáticos que describen el crecimiento microbiano son útiles para el diseño y control de procesos biológicos, y para predecir la influencia de los parámetros operativos de la fermentación en la tasa de crecimiento celular, la concentración celular, la tasa de utilización del sustrato y la tasa de producción de ácido láctico. Por lo que en este trabajo se planteó la generación de un modelo cinético que describa la fermentación de melaza a partir de *L. casei* y *L. plantarum* para la producción de ácido láctico.

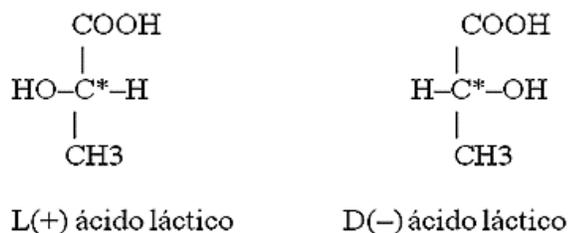
IV. MARCO TEÓRICO

A. ÁCIDO LÁCTICO

1. Definición

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico, ácido hidroxipropiónico) es un ácido orgánico natural formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo, siendo el hidroxiaácido más sencillo. Posee un carbono asimétrico que le confiere actividad óptica, por lo que existen dos isómeros, D (-) y L (+) láctico, y una modificación racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L (+) y D (-). Las dos formas ópticamente activas y la forma racémica se encuentran en estado líquido, son incoloros, solubles en éter, miscibles con agua e insoluble en cloroformo, éter de petróleo y disulfuro de carbono. En estado puro es un sólido altamente higroscópico de punto de fusión bajo. Ambas formas isoméricas pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición. Las propiedades fisicoquímicas del ácido láctico se muestran en el Cuadro 1. El ácido L (+) láctico está clasificado por la FDA como una sustancia GRAS y es reconocido como seguro para uso aditivo alimenticio. Mientras que el isómero D (-) es perjudicial al metabolismo humano y puede generar acidosis y descalcificación, sin embargo aún puede ser utilizado para la producción de polímeros (Munilla y Carracedo, 2005; Serna-Cock y Stouvenel, 2005; García, Arrazola y Durango, 2010).

Figura 1. Isómeros de ácido láctico.



Extraído de García, Arrazola y Durango (2010).

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas de ácido láctico

Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90.08
Índice de refracción	1.4414
Punto de fusión	L (+) y D (-): 52.8 a 54 °C DL (según composición): 16.8 a 33 °C
Punto de ebullición	125-140 °C
Gravedad específica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40.33 mNsm ⁻²
Densidad	1.249
Constante dieléctrica	22 ϵ

Adaptado de Serna-Cock y Stouvenel (2005).

2. Usos del ácido láctico

El ácido láctico es el producto químico básico más vendido a nivel mundial. En el año 2010 representó el 79.2% del mercado mundial de productos químicos renovables en conjunto con el glicerol. Es utilizado en la manufactura de alimentos, bebidas, medicinas, cosméticos y textiles. En la industria alimentaria, farmacéutica y química, es utilizado principalmente como acidulante y conservante, y también como electrolito y fuente de minerales. En la industria química es utilizado como neutralizante, solvente, agente limpiador y como antimicrobiano. Está presente en una gran variedad de alimentos procesados como caramelos, productos de panadería, sopas, lácteos, cerveza, jaleas, mayonesas y huevos procesados. Su capacidad de retención de agua lo convierte en un hidratante altamente utilizado en el sector de cosméticos, además aclara la piel y rejuvenece por su capacidad de frenar el desarrollo de tirosinasa en la piel (García, Arrazola y Durango, 2010; Anaya y López, 2018).

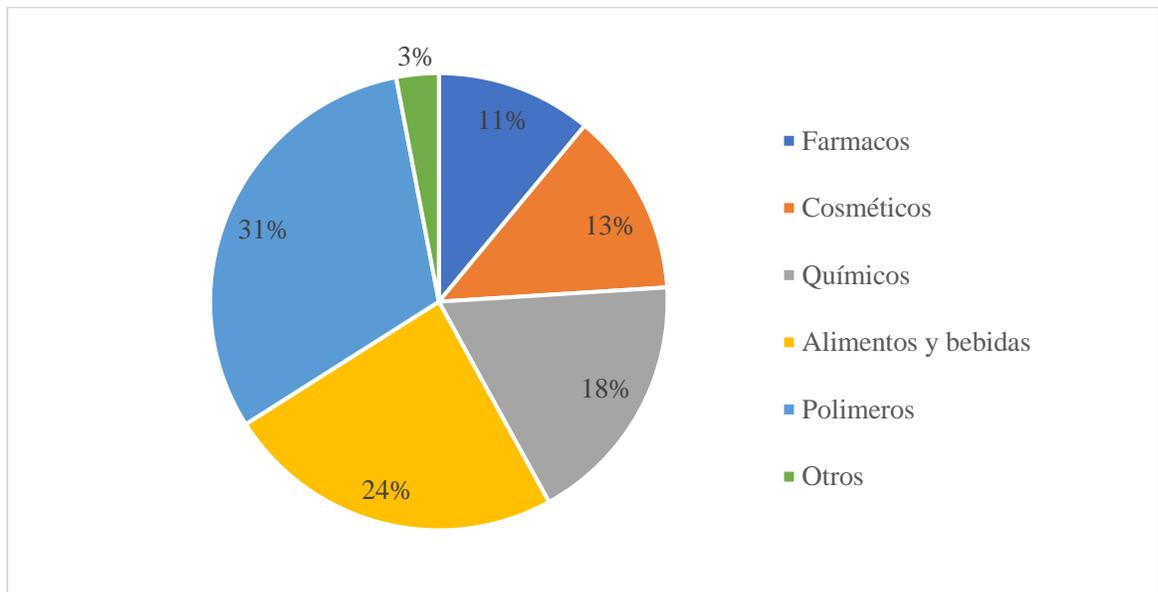
En el año 2011 se proyectó una demanda superior a las 200,000 toneladas métricas de ácido L (+) láctico purificado, de las cuales el 85% de la demanda estaba destinada a la industria alimentaria y el 15% restante a la industria no alimentaria. Su producción y demanda aumento, alcanzando en el año 2017 una producción anual estimada de 367,300 toneladas (García, Arrazola y Durango, 2010; Anaya y López, 2018).

Nuevas aplicaciones de ácido láctico, tales como monómeros y plásticos biodegradables tienen un gran potencial de expansión en el mercado. La polimerización del ácido láctico produce polímeros de ácido poliláctico (PLA), que al mezclarse con otras moléculas poliméricas naturales permiten la obtención de productos biodegradables y reabsorbibles, totalmente compostables. Este polímero cumple con las especificaciones de los materiales de empaque comúnmente empleados, por lo que no hay necesidad de rediseñar productos o ejecutar grandes inversiones en nuevos equipos de proceso. Se puede utilizar en la industria alimentaria, textil, cosmética y médica (Munilla y Carracedo, 2005).

El PLA es uno de los materiales plásticos con mayor potencial para sustituir a los plásticos convencionales por sus propiedades mecánicas y físicas, además de que puede procesarse con maquinarias existentes, a las que se les deben hacer ajustes menores. Estas propiedades dependen de la proporción de ácido poli-D-láctico (PDLA) y ácido poli-L-láctico (PLLA) en el copolímero. La co-cristalización ocurre cuando se mezcla PLLA con PDLA, lo que da como resultado un nuevo PLA estereocomplejo con un punto de fusión más alto. Este hallazgo ha llevado a un mayor interés en la producción de ácido D-láctico ópticamente puro porque el mercado de ácido láctico comercial históricamente ha estado dominado por el ácido L-láctico (Zhang et al., 2016).

La demanda del ácido láctico posee un crecimiento anual estimado de 5.8%. Su precio comercial grado alimenticio ronda entre 1.38 US\$/kg (50% de pureza) y 1.54 US\$/kg (88% de pureza). Sin embargo, para satisfacer las aplicaciones recientes del AL como precursor del PLA y para ser comercialmente viable, los costos globales de producción deben ser iguales o inferiores a 0.8 US\$/kg, para que el precio de venta del PLA sea competitivo con plásticos provenientes del petróleo. La Figura 2 muestra la demanda de ácido láctico en diferentes sectores según los ingresos del mercado mundial de ácido láctico de 2018 (Anaya y López, 2018).

Figura 2. Demanda global de ácido láctico en diferentes sectores de 2018.



Adaptado de Abdur *et al.* (2021).

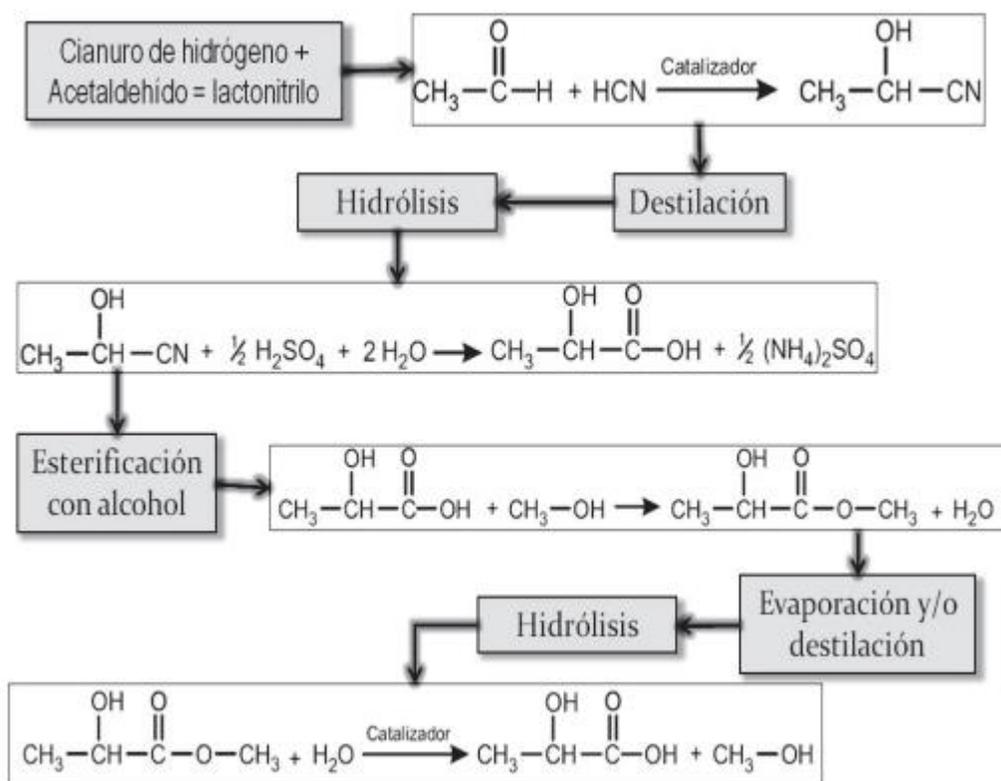
3. Producción de ácido láctico

El ácido láctico se produce comercialmente por síntesis química utilizando fuentes basadas en hidrocarburos o por fermentación microbiana usando rutas biotecnológicas. De la primera se obtiene una forma racémica de ácido láctico D/L (\pm), mientras que de la segunda se pueden obtener los isómeros L (+) o D (-) con alta pureza óptica. Debido al reciente desarrollo en la tecnología de

bioconversión industrial, el ácido láctico se genera predominantemente a través de la fermentación por cepas microbianas apropiadas en condiciones óptimas (Abdur *et al.*, 2020).

La producción química se basa en la reacción a presión alta de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para generar lactonitrilo, el cual se destila e hidroliza con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico para producir ácido láctico, este se somete a una esterificación con metanol donde se produce lactato de metilo el cual se separa y se purifica destilándolo. Finalmente se agrega ácido al producto purificado para producir el ácido láctico, este proceso se observa en la siguiente figura. Otros métodos de síntesis química son acetaldehído con monóxido de carbono y agua a alta presión en presencia de ácido sulfúrico como catalizador, degradación de azúcar catalizada por bases, hidrólisis del ácido cloropropiónico y la oxidación del propileno por ácido nítrico (Serna y Albán, 2003; Abdur *et al.*, 2020).

Figura 3. Secuencia de producción de ácido láctico por síntesis química.

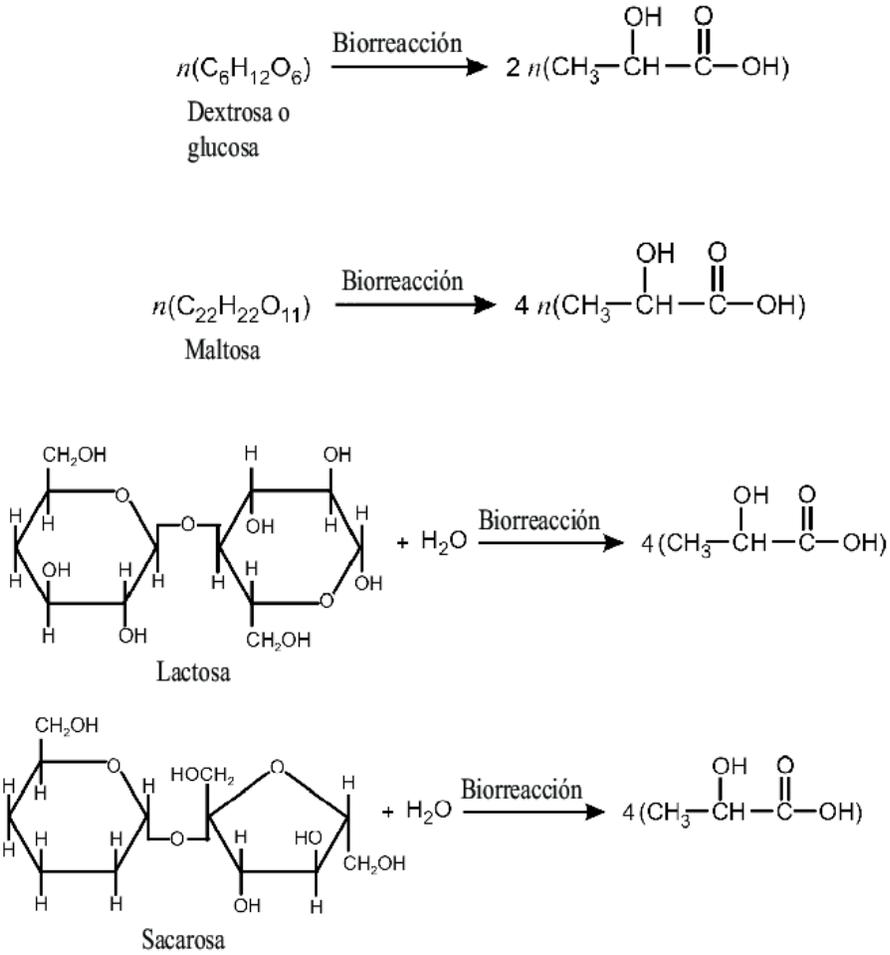


Extraído de Gil, Domínguez y Pacho (2008).

La producción biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por medio de bacterias y hongos para formar enantiómeros ópticamente activos. La fermentación es dependiente del tipo de microorganismo,

condiciones, fuente de carbono, fuente de nitrógeno y método de fermentación empleado. Su producción se ve afectada por factores nutricionales de la bacteria, el exceso de acidez y la inhibición de sustrato y producto. La siguiente figura muestra reacciones estequiométricas de la fermentación de diferentes sustratos (García, Arrazola y Durango, 2010; Anaya y López, 2018).

Figura 4. Reacciones estequiométricas involucradas en la reacción de producción de ácido láctico por fermentación.

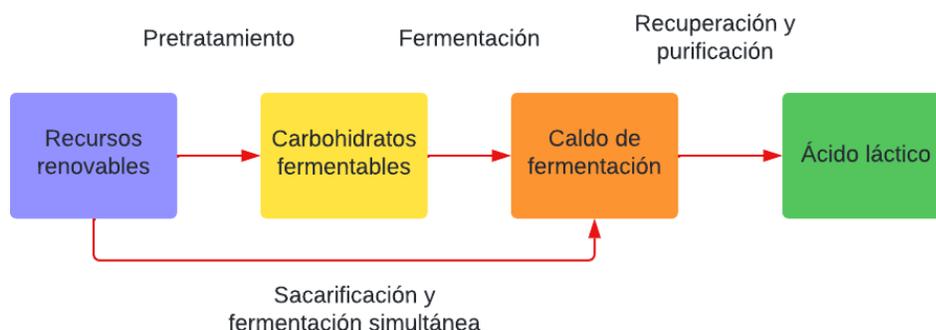


Extraído de Gil, Domínguez y Pacho (2008).

Los bioprocesos fermentativos son preferibles a la síntesis química que emplea combustibles fósiles para la producción de ácido láctico, ya que se obtienen diferentes beneficios como la utilización de desechos orgánicos y recursos renovables, y menor consumo de energía durante los procesos de fabricación. Sin embargo, el proceso de recuperación y purificación, utilizando las tecnologías actuales hace costoso el proceso de producción biotecnológica. Por lo que se realizan investigaciones para mejorar los procesos de fabricación y se evalúan nuevas materias primas que permitan obtener un producto más competitivo económicamente. La siguiente figura muestra un diagrama del

proceso de la producción biotecnológica de ácido láctico (Munilla y Carracedo, 2005).

Figura 5. Diagrama de flujo de proceso de la producción de ácido láctico por fermentación a partir de recursos orgánicos.



Adaptado de Abdur *et al.* (2020).

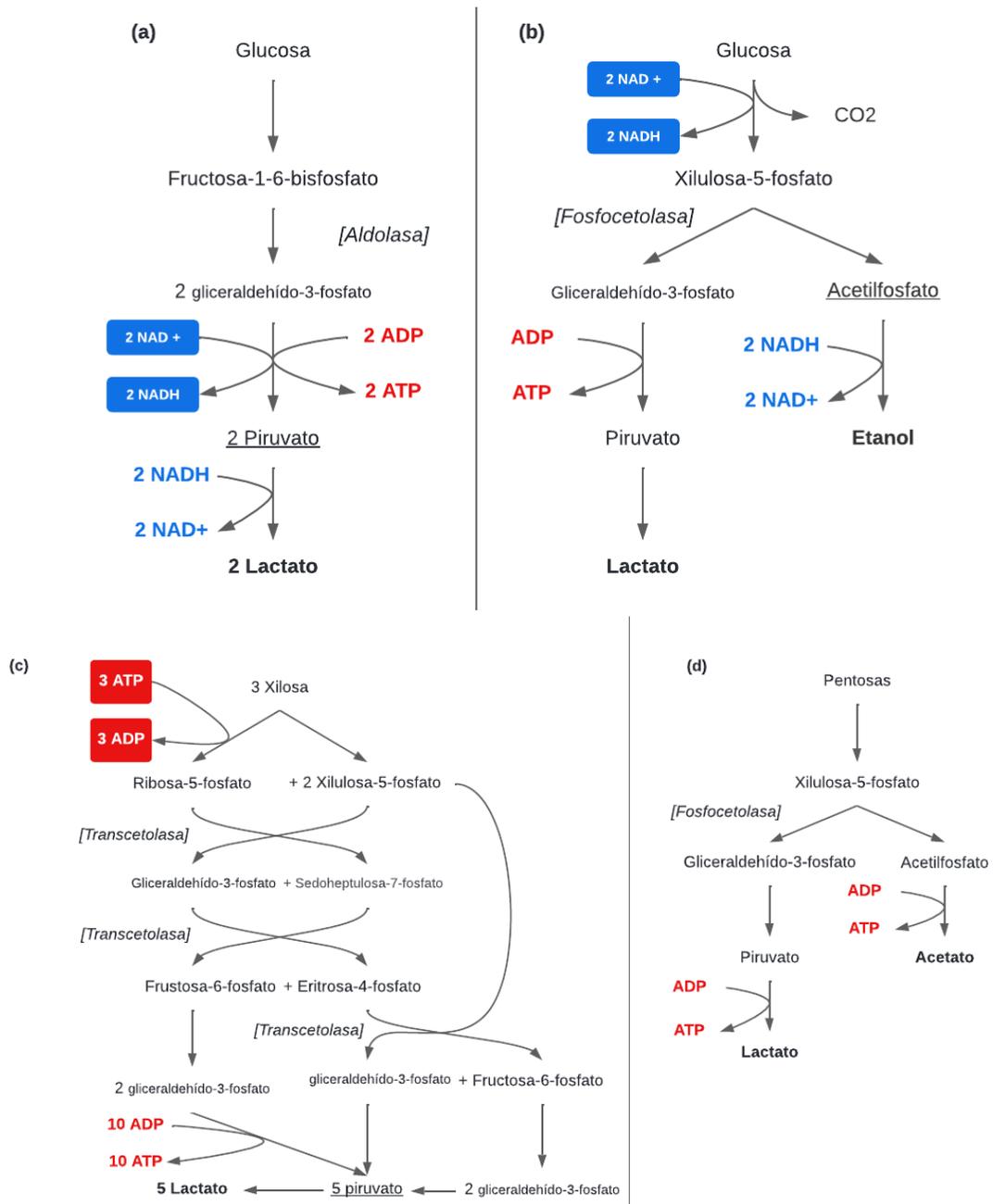
B. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR VÍA BIOTECNOLÓGICA

1. Microorganismos utilizados para la producción de ácido láctico

Las bacterias que se emplean para la producción de ácido láctico se denominan bacterias ácido-lácticas (BAL), estas comúnmente son cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos o anaerobios, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo que crecen entre 5 y 45°C y pH de 5.5-6.5. Estas bacterias requieren nutrientes como vitaminas, minerales, ácidos grasos, carbohidratos, aminoácidos, péptidos y bases nucleótidos para su crecimiento. Las BAL están comprendidas en 20 géneros, entre ellos: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Weisella* y *Leuconostoc*, siendo el primero el más abundante. Así mismo hay otros microorganismos, incluyendo hongos, que producen ácido láctico, como *Rhizopus oryzae* (Abdur *et al.*, 2020; Serna-Cock y Stouvenel, 2005).

Hay dos clases de BAL, homofermentativas, que producen ácido láctico exclusivamente siguiendo la vía Embden Meyerhof Parnas (EMP), y las heterofermentativas, que producen subproductos en cantidades apreciables como etanol, dióxido de carbono y ácido acético, siguiendo la vía de la fosfoacetolasa (PK) o la vía del fosfogluconato. El rendimiento teórico de ácido láctico por glucosa es de 1 g/g y 0.5-0.6 g/g para bacterias homofermentativas y heterofermentativas, respectivamente. En el metabolismo homoláctico generalmente se produce lactato como metabolito principal y piruvato que se puede desviar a acetato o acetoína como productos finales alternativos. Y en el metabolismo heteroláctico se genera lactato y acetato o etanol como metabolitos principales. En la Figura 2 puede observarse las distintas vías metabólicas para las bacterias ácido-lácticas a partir de glucosa y pentosas (Munilla y Carracedo, 2005; Anaya y López, 2018; Gaenzle, 2015).

Figura 6. Vías metabólicas de BAL para producción de ácido láctico.



Nota: Los principales productos finales del metabolismo se observan en **negrita**; puntos de ramificación del metabolismo se observan **subrayados**. La formación de cofactores reducidos/oxidados se observan en azul y la síntesis de ATP en rojo. **(A)** Metabolismo homofermentativo de hexosas a través de la vía Emden-Meyerhoff Parnas. **(B)** Metabolismo heterofermentativo de hexosas a través de la vía de la fosfoacetolasa. **(C)** Metabolismo homofermentativo de las pentosas a través de la pentosa, vía del fosfato. **(D)** Metabolismo heterofermentativo de las pentosas a través de la vía de la fosfoacetolasa. Adaptado de Gaenzle, (2015).

Las bacterias homofermentativas en su metabolismo no producen importantes precursores como purina, pirimidina, ribosa 5-fosfato y aminoácido aromático, en condiciones de crecimiento anaeróbico, por lo que requieren factores de crecimiento específicos. Sin embargo, estas son preferidas comercialmente para la producción industrial de ácido láctico ya que alcanzan mayores rendimientos. Aunque las bacterias heterofermentativas están adquiriendo atención, ya que las homofermentativas no pueden degradar pentosas que son abundantes en la hemicelulosa (Zhang et al., 2016; Liu *et al.*, 2010).

Los *Lactobacillus* tienen una morfología que varía entre cocobacilos a bastoncillos largos y delgados. Cuando se presentan en forma bacilar comúnmente se asocian en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos o microaerófilos, catalasa y citocromos negativos. Excepcionalmente pueden poseer motilidad, se mueven ayudados por flagelos. Estas bacterias son auxótrofas quimioorganotróficas, es decir, necesitan medios complejos para su crecimiento, y degradan la sacarosa para producir lactato. La temperatura óptima de crecimiento de los lactobacilos está entre 30 – 40 °C. Su hábitat natural es variado, se pueden encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves. Principalmente, se utilizan para la producción de productos fermentados y probióticos (Waldir *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2018).

Lactobacillus plantarum es una bacteria heterofermentativa facultativa, es decir que en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis se comporta como homofermentativa fermentando azúcares de hexosas a través de la vía EMP. En condiciones aeróbicas posee una vía PK inducible; en donde convierte la arabinosa en xilulosa-5-fosfato y finalmente en ácido D (-) láctico y ácido acético. *L. plantarum* posee una alta tolerancia a la acidez y se utiliza en la industria de alimentos y salud, presentándose en una gran variedad de alimentos como encurtidos y aceitunas. Se utiliza en la fermentación de masa madre y también se aplica como probiótico (Zhang et al., 2016; Siezen *et al.*, 2011).

Lactobacillus casei es una bacteria heterofermentativa facultativa, que en condiciones batch convierte, en su mayoría, azúcar en ácido L (+) láctico, esta prefiere la lactosa para su crecimiento y producción de ácido láctico, seguido por glucosa y maltosa, y en pocas cantidades sacarosa. Comercialmente, se utiliza para fermentar productos lácteos y también como probiótico (García, Arrazola y Durango, 2010; Hill *et al.*, 2018).

2. Factores que influyen la producción de ácido láctico

Los parámetros del proceso y las características de la materia prima desempeñan una parte integral en la estabilidad del proceso de fermentación, por lo que deben ser continuamente monitoreadas y controladas. Cambios en estos parámetros y características pueden afectar la concentración de ácido láctico e incluso, cesar la fermentación.

Sustratos de fermentación: Los sustratos para la producción de ácido láctico por fermentación deben cumplir con ciertas características para que puedan ser fermentados y sean aptos para su uso a nivel comercial, entre ellas se pueden mencionar: bajo costo, bajo nivel de contaminantes, alta velocidad de fermentación, gran rendimiento en ácido láctico, poca o nula formación de subproductos, posibilidad de ser fermentados con poco o ningún

pretratamiento y disponibilidad durante todo el año. Así mismo, no deben contener altas concentraciones de metales pesados (hierro, zinc, cobre, manganeso, magnesio, calcio) dado a que causan un problema crítico durante la fermentación, ya que inhiben el crecimiento de los microorganismos, influyen en el pH del sustrato y están involucrados en la inactivación de enzimas asociadas (Serna-Cock y Stouvenel, 2005; Kotzamanidis, Roukas y Skaracis, 2002).

La producción de ácido láctico puede darse a partir de medios sintéticos y permeados de suero por bacterias lácticas. Sin embargo, la utilización de estas fuentes de carbono no es económica, ya que el costo de estos sustratos puros constituye en promedio del 40-70% del costo de la producción, por lo que se han considerado otras fuentes de azúcares como los desechos agrícolas, que son ricos en carbohidratos como glucosa, galactosa, xilosa, celobiosa, arabinosa y manosa. Algunos ejemplos de ellos son melaza, bagazo de caña de azúcar, residuos de zanahoria procesada, almidón de papa, lactosuero, almidón hidrolizado y otros. Así mismo, se han estudiado y utilizado otras fuentes de carbohidratos como materiales celulósicos, licores sulfíticos, granos dañados y porciones comestibles de granos y tubérculos. Una producción industrial de ácido láctico económicamente factible por fermentación requiere sustratos costo-efectivos con toxicidad y contaminación mínima (Munilla y Carracedo, 2005; Kotzamanidis, Roukas y Skaracis, 2002; Abdur et al., 2020).

Efecto del Ph: El pH del medio debe mantenerse entre 5 y 7, es importante que este se monitoree dado a que disminuye durante la fermentación y puede generar una disminución significativa de la biomasa de microorganismos y consecuentemente la producción de ácido láctico. Así mismo, un pH bajo y una alta concentración de AL puede inhibir el metabolismo celular ya que el ácido es capaz de traspasar la membrana celular y romperla (Abdur *et al.*, 2020).

Para evitar estos efectos se pueden agregar al medio bases fuertes como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de calcio que neutralizan la acumulación de ácidos. También se puede agregar al inicial al medio carbonato de calcio que puede mantener el pH entre 6.0 y 7.0 neutralizando el ácido láctico producido. Sin embargo, existen algunas desventajas al utilizar agentes neutralizantes ya que generan algunos desechos como yeso y aumentan el costo de purificación de producto. Por lo que se buscan y prefieren cepas tolerantes a la acidez (Kotzamanidis, Roukas y Skaracis, 2002; Abdur *et al.*, 2020).

Otros nutrientes: Las BAL tienen requerimientos nutricionales complejos dado a que tienen una limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B. Para lograr un alto crecimiento celular son importantes tanto los nutrientes como la fuente de carbono, por lo que es esencial suplementar el medio con minerales, vitaminas y nitrógeno. El nitrógeno es indispensable para los procesos anabólicos y catabólicos, este debe estar disponible como aminoácidos, péptidos o compuestos inorgánicos (Anaya y López, 2018; Abdur *et al.*, 2020).

Fuentes de nitrógeno como extracto de levadura, peptona, urea y sulfato de amonio pueden ser agregados al medio de cultivo. El extracto de levadura es muy eficiente para la producción de ácido láctico con BAL, ya que posee un alto contenido de compuestos

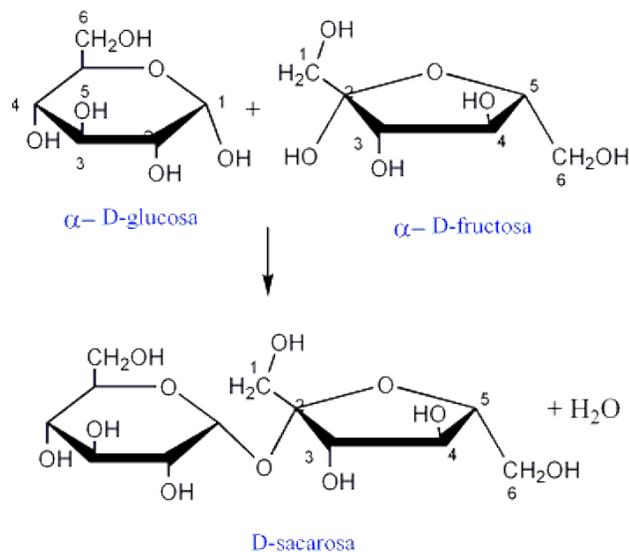
nitrogenados, purinas, bases pirimidínicas y vitaminas, que son suplementos esenciales, dado a que actúan como cofactores en muchas reacciones enzimáticas. Puede contribuir no solo a una alta producción de biomasa sino también a un alto nivel de metabolismo. A la vez, el extracto de levadura puede ser utilizado como una estrategia ante la inhibición del producto, debido a que el medio de cultivo utilizado como factor de crecimiento y nitrógeno proteico está relacionado con la inhibición del microorganismo. Sin embargo, posee un alto costo, logrando alcanzar hasta el 38% del costo de producción de ácido láctico (Anaya y López, 2018; Liu *et al.*, 2010).

Inhibición por producto y sustrato; Se ha demostrado que el ácido láctico ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, esto debido al aumento la presión osmótica. Para mitigar esta inhibición se han propuesto diferentes estrategias, entre ellas uso de tecnologías para eliminar el producto del medio y la neutralización de ácido láctico. A su vez, puede ocurrir una inhibición por altas concentraciones de azúcar en el medio. A lo cual se le atribuye una de las principales limitantes de la producción industrial de AL por fermentación por lotes. Una estrategia para solucionar esta limitante es emplear una fermentación por lotes alimentados (Anaya y López, 2018).

C. AZÚCAR

La sacarosa es el principal componente de interés en la caña de azúcar, este es un disacárido que resulta de la unión química entre dos monosacáridos: glucosa y fructosa, la biosíntesis de esta se realiza en el metabolismo de la caña de azúcar. Los monosacáridos, glucosa y fructosa, se clasifican como azúcares reductores, puesto a que su grupo carbonilo puede reaccionar y reducir cationes (CENGICANA, 2014).

Figura 7. Estructuras desarrolladas y reacción química entre glucosa y fructosa para la formación de sacarosa.



Extraído de: CENGICANA (2014).

1. Producción de azúcar

El proceso industrial de producción de azúcar a partir de caña de azúcar inicia con la recepción de la caña, para lo cual intervienen dos subprocesos: pesaje y muestreo y análisis. Posteriormente continúa el proceso de preparación de la caña, en el que se transforma la caña en un material homogéneo y con mayor densidad para mantener una alimentación uniforme en los molinos. La preparación consiste en la reducción de longitud de la caña en trozos por acción de cuchillas giratorias y la desintegración del tejido de la caña por acción de desfibradoras (CENGICAÑA, 2014).

La caña preparada se alimenta al tándem de molinos, en el cual se realiza la extracción del jugo por acción de molinos de cuatro mazas y por imbibición compuesta. Este último consiste en aplicar agua caliente a 75°C al bagazo que ingresa al último molino, el jugo extraído de este se aplica al penúltimo molino y así sucesivamente. Durante este proceso también se elimina del jugo mezclado las partículas gruesas de bagacillo en suspensión, empleando una malla filtrante (CENGICAÑA, 2014).

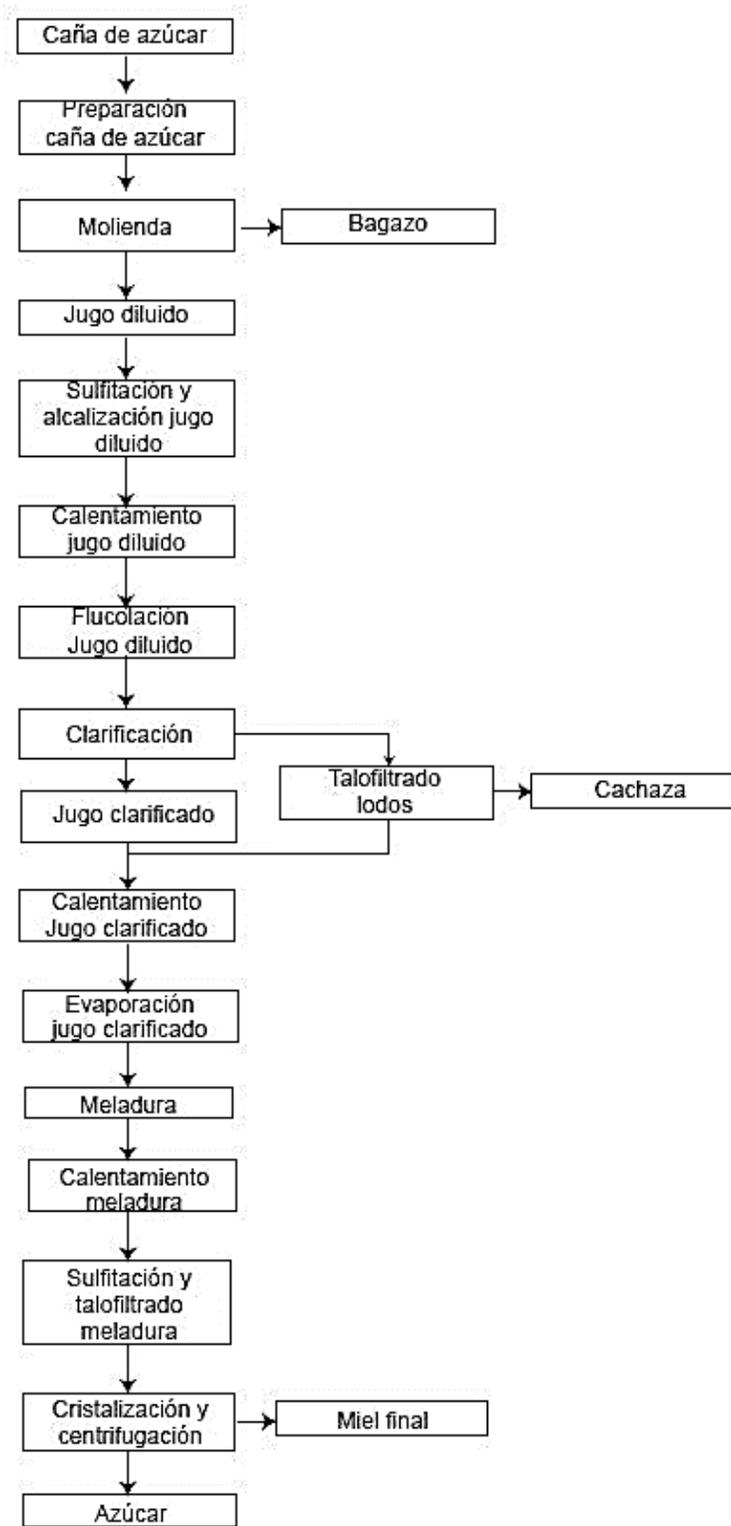
El jugo obtenido del tándem de molinos continúa hacia el proceso de clarificación, que consiste en la remoción de impurezas como tierra, arena, bagacillo y otras firmas de basura propias de la caña. Esto se realiza por alcalización, en el que se forma un sólido sedimentable de composición compleja. Para esto se sulfata el jugo, se añade ácido fosfórico y se lleva el jugo a altas temperaturas (CENGICAÑA, 2014).

El jugo clarificado se somete a un proceso de evaporación, en el cual se concentra de 15°-18° Briz hasta 65-67 ° Brix, obteniendo un material denominado meladura. El proceso consiste en evaporar el agua contenida en el jugo, haciéndolo hervir en evaporadores. La meladura se somete a un proceso de clarificación, por un tratamiento fisicoquímico en el que se añade ácido fosfórico para acondicionar las impurezas y separarlas posteriormente; agua sulfatada para remover sustancias colorantes; y finalmente calentamiento y burbujeo de aire (CENGICAÑA, 2014).

La meladura clarificada se somete a dos procesos paralelos: crecimiento del cristal de sacarosa y agotamiento de mieles, esto debido a que mientras las moléculas de sacarosa contenidas en la miel que se encuentran en solución se integran en una estructura o red de cristal, la pureza de la miel disminuye. Para propiciar la cristalización existen varios métodos, el más común es el semillamiento, en el que se agregan semillas o cristales de azúcar para propiciar el desarrollo de estos, mientras se evapora el resto de agua en vacío a baja temperatura (CENGICAÑA, 2014).

Finalmente, la mezcla de cristales de azúcar y miel se separan por centrifugación. El azúcar puede someterse a un proceso de refinamiento. La miel se retorna a los tachos para dos etapas adicionales de cristalización que termina con melaza (CENGICAÑA, 2014). Un resumen del proceso se observa en el siguiente diagrama.

Figura 8. Proceso de producción de azúcar.

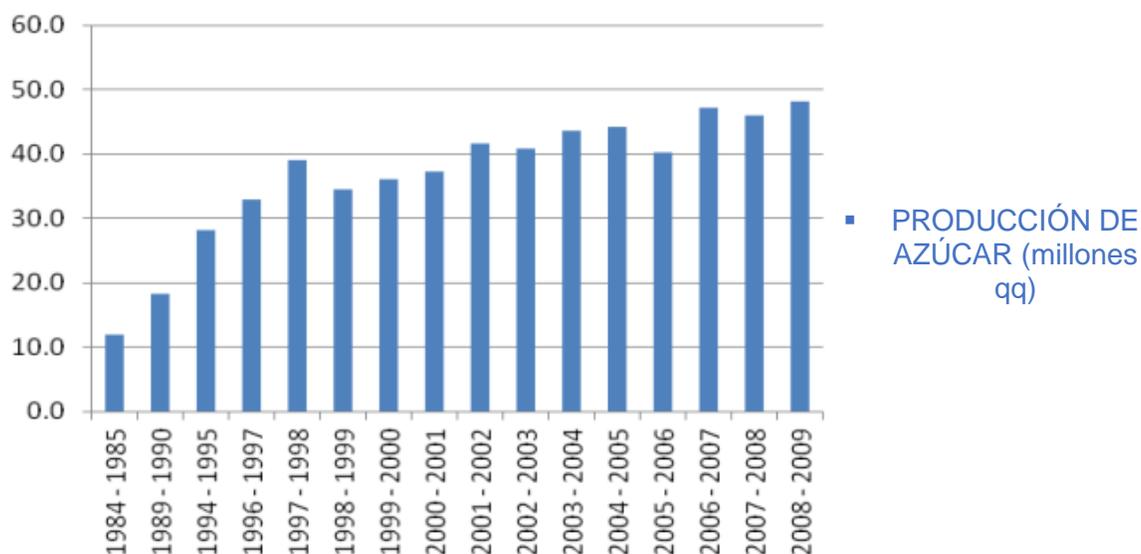


Adaptado de: Singh (2005).

2. Producción de azúcar en Guatemala

El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala ha evolucionado de manera considerable en las últimas décadas. De la zafra 1996-1997 a la zafra 2008-2009 la producción de azúcar aumento en un 45%, de 33 millones de qq (1.5 millones de t) a 48 millones de qq (2.2 millones de t). Esto se observa en la siguiente figura (CENGICAÑA, 2014).

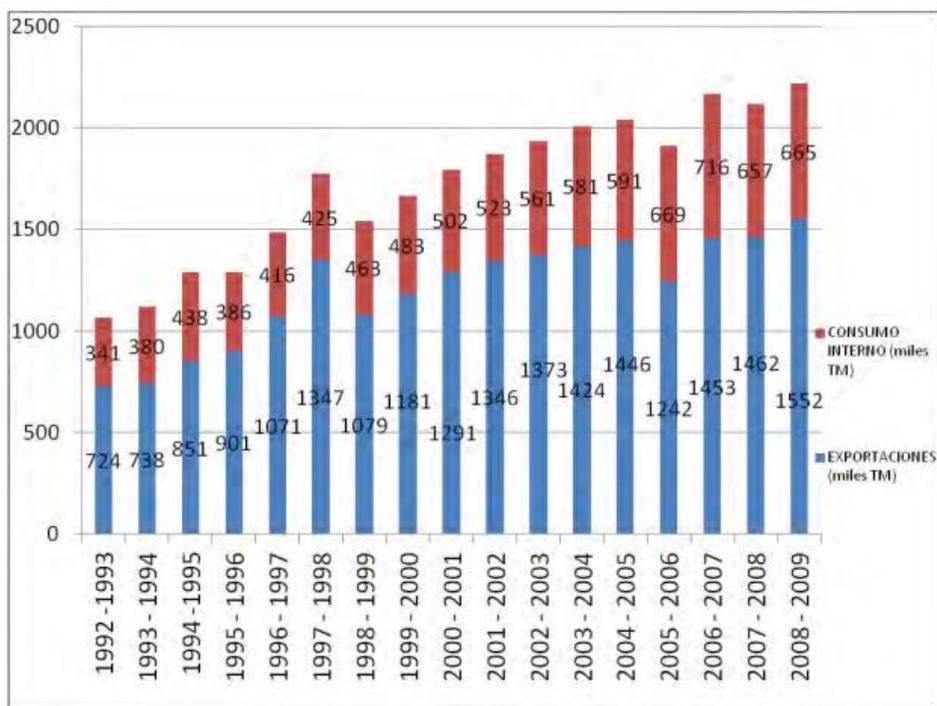
Figura 9. Producción de azúcar por zafra en Guatemala



. Extraído de: CENGICAÑA (2014).

Así mismo, se observa un incremento en las ventas locales y de exportación, desde un millón de toneladas métricas hasta dos millones de toneladas métricas, es decir un incremento del 100% en un período de 15 años, de la zafra 1992-1993 a la zafra 2008-2009, esto se observa en la siguiente figura. Este incremento en la producción y ventas de azúcar es consecuencia del aumento del área cultivada y del aumento de la capacidad en las fábricas (CENGICAÑA, 2014).

Figura 10. Ventas de azúcar en el mercado interno y exportaciones de la Agroindustria en Guatemala



Extraído de: CENGICAÑA (2014).

Actualmente, el azúcar es el cuarto producto de mayor exportación en el país, representando el 6.5% de exportaciones totales. Guatemala es el sexto país exportador de azúcar en el mundo y tercero de Latinoamérica. Las exportaciones de azúcar, alcohol y melaza generan divisas que superan los US1,000 millones. La producción de azúcar genera alrededor de 54 mil empleos directos y 280 mil empleos indirectos (CENGICAÑA, 2020).

3. Melaza de caña de azúcar

La miel final o melaza es un fluido que se obtiene en la última etapa del proceso de cristalización y centrifugación en la producción de azúcar, considerada como un subproducto en esta industria. Esta contiene agua, aproximadamente un 50% de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), compuestos nitrogenados, aminoácidos, metales pesados, entre otros. La caracterización de la melaza de caña de azúcar se observa en el Cuadro 2 (CENGICAÑA, 2020; Kotzamanidis, Roukas y Skaracis, 2002).

Cuadro 2. Composición promedio de miel final de caña de azúcar generada en ingenios guatemaltecos durante la zafra 2019-2020.

Componente	Porcentaje (% m/m)
Agu a	17.77
Sólidos totales	82.23
Azúcares totales	47.85
Sacarosa	34.58
Glucosa	5.89
Fructosa	7.39
No-sacarosas orgánicas	23.3
Cenizas (componentes inorgánicos)	10.53
P2O5	0.07
CaO	0.66
MgO	0.34
K2O	3.74
Fe2O3	0.00
ZnO	0.00
MnO2	0.00
CuO	0.00
Otros desconocidos (SiO2, Al2O3, SO3, Na2O...)	9.21
Nitrógeno total	0.55

Adaptado de CENGICAÑA (2020).

Por su contenido de azúcares fermentables algunos ingenios utilizan la melaza como materia prima para la producción de alcohol etílico mediante fermentación. Esta es un insumo de bajo costo, con un costo promedio de 0.15 US\$/kg (Kotzamanidis, Roukas y Skaracis, 2002; Anaya y López, 2018).

Durante la zafra 2018-19 en Guatemala se molieron 27.5 millones de toneladas de caña en toda la agroindustria azucarera. Se producen 38.3 galones de melaza por tonelada de caña, lo que equivale a 1,051,600 toneladas de melaza en la zafra. Según la fuente, se podría destinar el 9.5% de esta cantidad a la producción de ácido láctico para posteriormente producir PLA (CENGICAÑA, 2020).

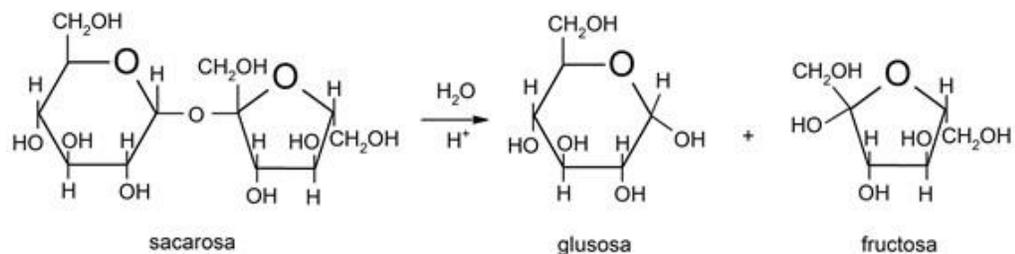
4. Pretratamiento de melaza como sustrato de fermentación

La abundancia de desechos agrícolas ricos en nutrientes ha sido aprovechada como materia prima para la producción de productos químicos por fermentación, sin embargo la mayoría de estos sustratos requiere un pretratamiento antes de que puedan ser fermentados y en ocasiones el costo ahorrado en la materia prima por el sustrato se invierte en este proceso (Abdur *et al.*, 2020).

Específicamente, la melaza puede necesitar pretratamientos adicionales para mejorar la eficiencia de la fermentación, purificando los metales pesados e invirtiendo la sacarosa en azúcares reductores que pueden ser utilizados por los microorganismos (Micheo, 2021).

La inversión de la sacarosa, el azúcar más abundante en la melaza, consiste en términos químicos en el cambio de sentido de la rotación de la luz polarizada por este compuesto para la obtención de glucosa y fructosa. Estos cambios en la actividad óptica pueden lograrse mediante la acción hidrolítica ácida o enzimática. En la siguiente figura se observa la reacción de hidrólisis de sacarosa (Micheo, 2021).

Figura 11. Hidrólisis de sacarosa



Extraído de Abdur *et al.*, 2020.

Los azúcares poseen actividad óptica, puesto que sus soluciones acuosas desvían la luz polarizada monocromática debido a la asimetría en varios de sus átomos de carbono. La sacarosa tiene actividad óptica dextrógira, es decir que rota la luz polarizada a la derecha. Al separar las unidades de fructosa y glucosa por hidrólisis ácida o enzimática, la mezcla resultante es levógira, es decir rota la luz polarizada a la izquierda. Por este hecho, a la separación de la sacarosa en sus monosacáridos se le conoce como inversión de sacarosa y a la glucosa y fructosa como azúcares invertidos, sin embargo desde un sentido estrictamente químico no es lo más apropiado (CENGICANA, 2014).

La hidrólisis ácida puede realizarse con ácidos fuertes, donde la velocidad de la inversión dependerá del pH, la temperatura y la concentración de la melaza. Generalmente se realiza a temperaturas mayores a 90°C y pH inferior a 2, para evitar reacciones secundarias (Micheo, 2021).

En la hidrólisis enzimática se emplea como catalizador la enzima invertasa o β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26), cuya especificidad es absoluta. Las enzimas son catalizadores biológicos selectivos específicos, con una alta eficiencia y capacidad de regulación (Vidra, Tóth y Németh, 2017; Micheo, 2021)

Comparando ambos métodos, la hidrólisis ácida ocurre en un tiempo menor, sin embargo la hidrólisis enzimática presenta mayores ventajas ya que evita la degradación de azúcar, no genera reacciones secundarias y requiere condiciones de reacción más suaves, ya que ocurren en un intervalo entre 40 y 60 °C y en un rango de pH entre 4,0 y 8,0 (Micheo, 2021).

Algunos métodos utilizados Este pretratamiento puede ser realizado con ácido sulfúrico, fosfato tricálcico, ferrocianuro de potasio y EDTA

Además de la inversión de sacarosa de melaza, se pueden realizar otros tratamientos previos a la fermentación como:

- Esterilización: las melazas pueden contener microorganismos nocivos para la fermentación o que compitan por el sustrato y generen productos secundarios no deseados. Por lo que se recomienda la esterilización, en algunos casos se realiza por inyección de vapor (Jeri, 2015).

- Dilución: Es necesario diluir la melaza con agua hasta una concentración de azúcar apta y óptima para el microorganismo. Una alta concentración de azúcares y sales puede inhibir la fermentación, además de aumentar la presión osmótica del medio contraproducente para los microorganismos, así mismo estas son altamente viscosas lo que dificulta su manipulación (Jeri, 2015).

- Adición de nutrientes: la melaza es un medio complejo que contiene microelementos y vitaminas que no deben ser adicionados a la fermentación, con excepción de las fuentes elementales de nitrógeno y fósforo (Jeri, 2015).

D. CINÉTICA QUÍMICA

1. Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano no se caracteriza por un crecimiento de tamaño como en los organismos pluricelulares, sino en un incremento en el número de microorganismos dada por la multiplicación o división que se da por fisión simple o binaria (Tortora, Funke y Case, 2007).

Cuando los microorganismos son inoculados en un medio de cultivo, estos toman selectivamente los nutrientes disueltos y lo transforman en biomasa. En un cultivo por lotes se puede observar una curva típica de crecimiento cuando se monitorea el número de microorganismos o la cantidad de biomasa en un lapso determinado. En esta curva se pueden apreciar las siguientes fases: fase de retraso o latencia, fase de crecimiento logarítmico o exponencial, fase estacionaria y fase de muerte, la cual se puede observar en la siguiente figura (Tortora, Funke y Case, 2007).

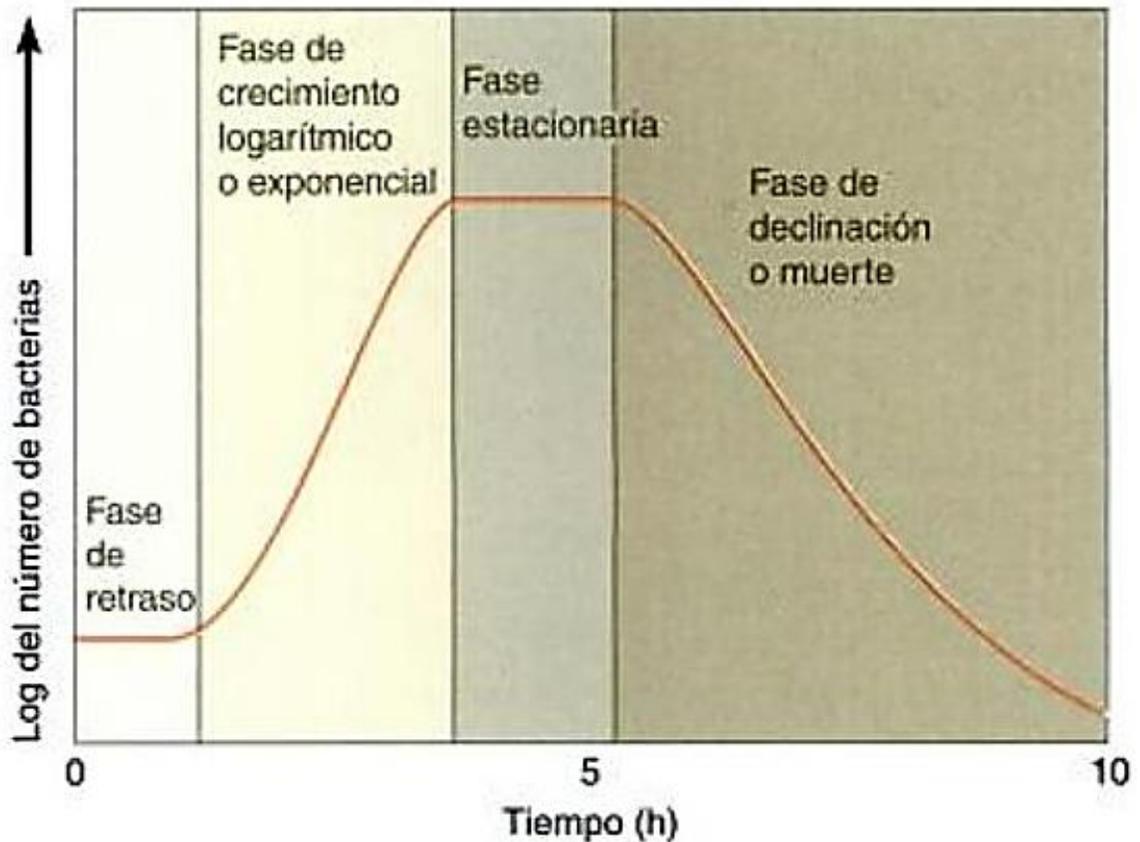
- Fase de retraso o latencia: Durante esta fase, los microorganismos se adaptan al medio en el que se encuentran, produciendo las enzimas necesarias para metabolizar la fuente de carbono disponible y empezar el proceso de división celular (Tortora, Funke y Case, 2007).

- Fase de crecimiento logarítmico o exponencial: Durante este período la actividad metabólica aumenta notablemente y ocurre la división celular dando como resultado una relación lineal entre el número de microorganismos y el tiempo. En esta se espera observar un crecimiento constante en la población en caso de no contar con procesos de inhibición (Tortora, Funke y Case, 2007).

- Fase estacionaria: En esta fase el crecimiento disminuye, no hay aumento de la población y las células nuevas reemplazan a las que han muerto. La actividad metabólica es más lenta. Algunas células se encuentran en animación suspendida. En esta fase se producen los metabolitos secundarios como toxinas y antibióticos, además de polímeros intracelulares (Tortora, Funke y Case, 2007).

- Fase de muerte: Durante esta fase, el número de células decrece y se presenta la lisis celular debido a la acumulación de productos tóxicos y falta de nutrientes. Aún hay células vivas, pero la cantidad de muertas las sobrepasa (Tortora, Funke y Case, 2007).

Figura 12. Curva de crecimiento bacteriano



Extraído de Tortora, Funke y Case (2007).

2. Modelos cinéticos de crecimiento microbiano

Los modelos matemáticos son hipótesis entre relaciones matemáticas de variables medibles y no medibles en un sistema, proceso o experimentación. Estos para el estudio de procesos de fermentación tienen entre sus principales aplicaciones correlacionar datos experimentales y hacer una predicción cuantitativa del proceso, reducir costos en diseño experimental y considerar variables que afecten el desarrollo del proceso, así como utilizar el modelamiento matemático para escalar procesos realizados a nivel laboratorio. Específicamente se utilizan para predecir los efectos de parámetros operativos sobre el crecimiento de biomasa, la utilización de sustrato, las tasas de formación de productos y la optimización de procesos de fermentación (Altiook, Tokatl y Harsa, 2006).

Un modelo matemático de crecimiento está compuesto por principios químicos, físicos y biológicos involucrados, inferencias que se puedan hacer a partir de datos existentes y suposiciones con bases y criterios válidos. En los modelos que describen procesos fermentativos es común que se tengan parámetros que los describan con valores numéricos desconocidos y que no sean medibles, por lo que las suposiciones son necesarias en la complejidad de los procesos microbiológicos (Calderón, 2017).

Se pueden describir dos tipos principales de modelos de crecimiento de una población de microorganismos: estructurados y no estructurados. Los primeros consideran aspectos básicos de la célula y su especie química, despreciando o agrupando los demás componentes en grupos generalizados como lípidos y proteínas. Los segundos consideran que los microorganismos poseen una composición fija y simple, despreciando los cambios en el medio de cultivo producto de la concentración de biomasa, son los más utilizados (Calderón, 2017).

Entre los modelos cinéticos de crecimiento microbiano se encuentran: ecuación logística, modelo de Monod, modelo de Moser, modelo de Teissier, modelo de Haldane, modelo de Contois, modelo de Amrane y Prigent, modelo de Gompertz y modelo de Powell. Cada uno de estos describe el crecimiento de los microorganismos en distintas condiciones y con diferentes consideraciones como composición celular independiente del tiempo, presencia de sustratos inhibitorios en el medio, acoplamiento de la transferencia de masa de sustrato y otros. Para fines de este estudio se describirá la ecuación logística y el modelo de Monod (Calderón, 2017).

La ecuación logística describe el comportamiento de la biomasa en distintos procesos de fermentación, se representa mediante la Ecuación 1 (Calderón, 2017).

Ecuación 1. Ecuación logística para crecimiento microbiano

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$$

Donde X_m hace referencia a la concentración máxima de biomasa en el proceso fermentativo, μ es la tasa de crecimiento específica [h^{-1}] y X la concentración de biomasa [UFC/mL] (Calderón, 2017).

Al integrar la Ecuación 1 en las condiciones de frontera $X=X_0$ y $t=t_0=0$, se obtiene la Ecuación 2, correspondiente al crecimiento de biomasa en función del tiempo (Calderón, 2017).

Ecuación 2. Crecimiento de biomasa en función del tiempo.

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{X_m - X_0 + e^{\mu t}}$$

El modelo de Monod describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento sin ningún tipo de proceso de inhibición durante la fermentación. Este modelo toma solamente en consideración las fases positivas de crecimiento y se asume la población microbiana como homogénea. La ecuación de Monod es semiempírica; se deriva de la premisa de que un solo sistema enzimático con cinética de Michaelis-Menten es responsable de la captación de S, y la cantidad de esa enzima o su actividad catalítica es lo suficientemente baja como para limitar la tasa de crecimiento. Este se describe mediante la Ecuación 3 y 4 (Shuler y Kargi, 2002; Calderón, 2017).

Ecuación 3. Ecuación de Monod para el crecimiento de biomasa.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

Ecuación 4. Ecuación de Monod para el consumo de sustrato.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{X/S}} * \frac{dX}{dt}$$

Este modelo se caracteriza por alcanzar un grado de ajuste cercano a los datos experimentales, aun siendo un modelo sencillo. Mediante tratamiento matemático integral, de las Ecuaciones 3 y 4, puede obtenerse una Ecuación 5 que permite relacionar la producción de biomasa y crecimiento de sustrato simultáneamente (Shuler y Kargi, 2002; Calderón, 2017).

Ecuación 5. Ecuación integrada del modelo de Monod

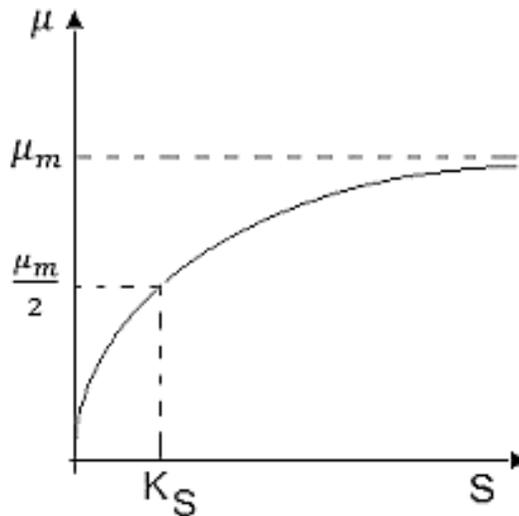
$$\mu_{\max} t = \frac{Y_{X/S} S_0 + Y_{X/S} K_S + X_0}{Y_{X/S} S_0 + X_0} \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) + \frac{Y_{X/S} K_S}{Y_{X/S} S_0 + X_0} \ln\left(\frac{Y_{X/S} S_0}{Y_{X/S} S_0 + X_0 - X}\right)$$

Donde μ_{\max} , $Y_{X/S}$, S_0 , K_S , X y t corresponden a la tasa de crecimiento específica máxima [h^{-1}], rendimiento del sustrato [UFC/g sustrato], sustrato inicial [g/mL], constante de saturación [g/mL], biomasa [UFC/mL] y tiempo [h] (Shuler y Kargi, 2002; Calderón, 2017).

La velocidad específica de crecimiento μ_{\max} , es la máxima velocidad a la que puede crecer un microorganismo en determinadas condiciones de cultivo, que se ve influenciada por factores ambientales y endógenos como la organización morfológica, la regulación y

el control intracelular. La constante de saturación media K_S , es la concentración de sustrato limitante para la cual la velocidad específica de crecimiento es la mitad de μ_{max} . Este parámetro brinda información de la afinidad del microorganismo por un sustrato bajo determinadas condiciones. Entre menor sea el valor de K_S más afín será el microorganismo al sustrato. La representación gráfica de la ecuación de Monod se observa en la siguiente figura (Shuler y Kargi, 2002).

Figura 13. Velocidad de crecimiento específica en función de la concentración de sustrato según modelo de Monod.



Extraído de Altıok, Tokatl y Harsa (2006).

Formas modificadas del modelo de Monod y otras ecuaciones lógicas se han aplicado para indicar los efectos de la inhibición de biomasa, el producto y el sustrato sobre el crecimiento de biomasa en la producción de ácido láctico. Se han sugerido modelos que incluyen términos tanto para la inhibición del sustrato como del producto, así como modelos que consideran solo la inhibición del producto por el pH. Se han propuesto modelos cinéticos de *L. casei* principalmente con glucosa como fuente de carbono en sistemas de fermentación continuos y discontinuos, evaluando inhibiciones por distintos factores (Altıok, Tokatl y Harsa, 2006).

V. ANTECEDENTES

La producción de ácido láctico por fermentación de recursos renovables utilizando bacterias ácido-lácticas ha sido ampliamente estudiada. En el año 2011, la Universidad del Valle en conjunto con el CONCYT, SENACYT y FONACYT realizó el *PROYECTO FODECYT No. 003-2008* en donde se estudió la obtención de ácido láctico a partir de jugo de caña de azúcar, partículas de caña deshidratada y partículas de caña congelada, empleando diferentes cepas de bacterias lácticas y un hongo. En esta investigación destacó la bacteria *L. lactis* DSM 4366 que fue capaz de crecer empleando sacarosa extraída de caña y producir ácido láctico. Así mismo, las bacterias lácticas *B. coagulans* DSM 23080 y *L. paracasei* DSM 20008 utilizaron la glucosa y sacarosa del jugo de caña, sin embargo fue necesario agregar al medio una fuente compleja de nitrógeno orgánico y vitaminas, obtenida de extracto de levadura en una proporción de 5 g/L (Rolz *et al.*, 2011).

La melaza de caña de azúcar es una fuente más económica para la producción de productos de valor agregado por fermentación, ya que contiene una gran cantidad de carbohidratos (45-60%), es un subproducto de la industria cañera y es un recurso renovable. Se han realizado diversos estudios que evalúan su fermentación por bacterias para la producción de AL. En la investigación realizada por Vidra, Tóth y Németh (2017) se estudió la producción de ácido láctico a partir de melaza de azúcar mediante fermentaciones discontinuas con *L. casei* y *Lactobacillus sp.* MKT878. La melaza utilizada como sustrato se sometió a dos pretratamientos, el primero consistió en una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico y el segundo en una inversión enzimática con invertasa. Sus resultados mostraron que ambas especies bacterianas podían crecer en melaza a pesar de los efectos inhibitorios de los metales pesados que esta posee, generando una concentración de ácido láctico después de 150 horas de 68 g/L y 83 g/L con rendimientos de 0.76 g/g y 0.57 g/g para *Lactobacillus sp.* MKT878 y *L. casei*, respectivamente. Así mismo, determinaron que *L. casei* utilizó glucosa y fructosa en paralelo (Vidra *et al.*, 2017).

La producción de ácido láctico a partir de melaza utilizando *L. plantarum* también ha sido evaluada. En el estudio de Coelho *et al.* (2010) se evaluaron siete componentes agregados a la melaza para optimizar la composición del medio, empleando la cepa *L. plantarum* LMISM6. En este determinaron que el licor de maceración de maíz (CSL), K_2HPO_4 y Tween 80 aumentan la producción de AL. Obtuvieron una producción máxima de ácido láctico de 94.8 g/L cuando las concentraciones de melaza, CSL, K_2HPO_4 y Tween 80 fueron de 193.50 g/L, 37.50 mL/L, 2.65 g/L y 0.83 mL/L, respectivamente. Sin embargo, aproximadamente una cuarta parte de la azúcar añadida inicialmente no se utilizó después de 48 horas de fermentación, por lo que concluyeron que se necesitan estudios futuros que consideren una alta conversión de azúcar en el producto final, así como una alta productividad volumétrica, para mejorar el proceso de fermentación y reducir los costos posteriores (Coelho *et al.*, 2010).

Otros sustratos y microorganismos se han utilizado para la producción de ácido láctico. El siguiente cuadro, presenta un resumen de las condiciones optimizadas para la producción de ácido láctico con un amplio rango de sustratos y microorganismos. En esta se observan condiciones como pH, temperatura, tiempo de fermentación, pureza de ácido láctico, rendimientos y otros.

Cuadro 3. Datos de fermentación de ácido láctico usando varios sustratos, cepas microbianas, modos operativos y métodos con sus respectivas condiciones optimizadas (T - temperatura; C - concentración; Y - rendimiento; P - productividad; ND - no descrito).

Sustrato fermentativo	Cepa microbiana	Modo de fermentación	pH	T (°C)	Pureza óptica (%)	Ácido láctico		
						C (g/L)	Y (g/g)	P (g/(L*h))
Glicerol	Escherichia coli	Fed-batch	6-6.5	37	D-(99)	111	0.78	2.8
Glicerol	Escherichia coli	Fed-batch	6-6.5	37	L-(99)	50	0.9	0.6
Alga	Lactobacillus paracasei	Batch (SSF)	6-6.5	37	L-(98)	37	0.46	1.03
Microalga	Lactobacillus coryniformis	Batch (SSF)	6	37	D-(99)	36	0.46	1.02
Microalga	Lactobacillus pentosus	Batch (SSF)	6-6.5	37	ND	24	0.93	0.45
Arroz quebrado	Lactobacillus delbrueckii	Batch (SSF)	6	40	D-(96)	79	0.81	3.58
Maíz	Lactobacillus brevis	Batch (SSF)	5	37	ND	21	0.7	0.58
Glucosa	Lactobacillus paracasei	Batch	6.5	38	L-(96)	192	0.96	3.99
Sacarosa	Escherichia coli	Batch	7	37	D-(98)	8.5	0.85	1
Glucosa	Rhizopus oryzae	Batch	6	37	ND	103	ND	2.09
Melaza de caña de azúcar	Lactobacillus casei	Batch	6	38	ND	120.23	0.91	ND

Adaptado de Rawoof *et al.* (2021)

Por otro lado, se han propuesto diferentes modelos cinéticos para la producción de AL. Dentro de ellos destaca para esta investigación el estudio de Thakur, Panesar y Saini (2018) donde se empleó un diseño experimental para la optimización de los parámetros del proceso para maximizar la producción de ácido láctico por *L. casei* MTCC 1423 a partir de melaza de caña de azúcar. Las condiciones optimizadas obtenidas fueron una concentración de azúcar de 190 g/L, un contenido de CSL de 2.75 % (v/v), un pH de 6.75, una temperatura de incubación de 38 °C y un tiempo de incubación de 59.5 h con una producción máxima de ácido láctico de 119.45 g/L. En el estudio consideraron un modelo de Monod y un modelo cinético propuesto por Luedeking y Piret para obtener los parámetros cinéticos. Se determinaron μ_{max} , K_S y la constante de inhibición del sustrato de 0.7163 (h^{-1}), 0.6203 (g/L) y 362.5 (g/L), respectivamente. Obtuvieron una concentración máxima de biomasa de 14.98 g/L en peso seco celular, un rendimiento de células de crecimiento, $Y_{X/S}$, de 0.3289 (g/g) y un rendimiento de producto, $Y_{P/S}$, de 0.9194 (g/g) (Thakur *et al.*, 2018).

Acercas de modelos cinéticos de producción de ácido láctico de *L. plantarum*, se encuentran empleando diferentes sustratos como jugo de pepino y lactosa. El estudio de Fu y Mathews (1999) presenta un modelo cinético y los efectos del pH, concentración de sustrato y presencia de oxígeno en la producción de AL a partir de lactosa por *L. plantarum*. En este estudio, determinaron que el pH óptimo para el crecimiento celular y la producción de ácido estaba entre 5 y 6. Obtuvieron que la fermentación anaeróbica dio un mayor rendimiento de ácido láctico de aproximadamente 2.3 veces que la fermentación aeróbica. Así mismo, la tasa de crecimiento celular fue aproximadamente dos veces mayor, pero el rendimiento celular fue aproximadamente el 80% de la fermentación aeróbica. Finalmente, modelaron el proceso de fermentación utilizando la ecuación de Monod con efectos de inhibición del producto incorporados en los parámetros del modelo. Utilizaron el método de Gauss para estimar los valores de los parámetros y correlacionaron la variación de cada parámetro cinético en función del pH mediante ecuaciones empíricas para el rango de pH de 4 ± 7 . Las expresiones que obtuvieron son útiles en el modelado y simulación de fermentación discontinua y continua. Los parámetros cinéticos que determinaron se observan en el siguiente cuadro (Fu y Mathews, 1999).

Cuadro 4. Parámetros óptimos estimados para la fermentación de lactosa por *L. plantarum*.

pH	μ_{max} (1 h)	K_S	$Y_{X/S}$ (w/w)	$Y_{P/S}$ (w/w)
4	0.0072	178.0	0.005	0.724 (1.03)
5	0.382	49.0	0.45	0.97
6	0.364	44.4	0.39	1.02
7	0.286	45.0	0.27	0.956

Extraído de Fu y Mathews (1999).

VI. METODOLOGÍA

La experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioprocesos del Centro de Innovación y Tecnología (CIT) de la Universidad del Valle de Guatemala. Las cepas bacterianas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la misma universidad. Se utilizó melaza comercial como sustrato, adquirida en Agroprocesos del Pacífico San Martín S.A, cuya ficha técnica puede observarse en la sección de anexos.

A. ACTIVACIÓN DE CEPAS

Materiales y equipo:

- Cultivo de *L. plantarium* ATCC® 8014^{TM*} en agar
- Cultivo de *Lactobacillus casei* ATCC® 393^{TM*} en agar
- Agar MRS
- Balanza de laboratorio
- Estufa con agitación
- Esterilizador de autoclave
- Incubadora
- Refrigeradora
- Campana de laboratorio
- 1 Erlenmeyer de 250 mL
- 1 Probeta de 100 mL
- Cajas Petri de 20 mL
- 2 mecheros de etanol
- 1 Agitador magnético
- 1 Asa microbiológica
- 1 espátula
- Cinta testigo
- Papel Parafilm
- Agua destilada
- Etanol
- Cloro

Procedimiento:

1. Siguiendo las indicaciones del fabricante para la preparación de agar MRS, se midieron 150 mL de agua destilada con una probeta y se vertieron en un Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se pesaron 9.9 g de agar MRS en un trozo de papel aluminio en una balanza y se vertieron en el Erlenmeyer.
3. El Erlenmeyer se colocó en una estufa, se calentó y se agitó con ayuda de un agitador magnético hasta que alcanzó el punto de ebullición y cambio de color.
4. Se colocó cinta testigo y se esterilizó en una autoclave a 121°C por 15 minutos.
5. Se desinfectó el área de trabajo utilizando etanol al 80% y cloro y se trabajó al lado de dos mecheros de etanol.
6. El agar MRS se vertió en 6 cajas Petri, para trabajar durante tres semanas, dos cajas Petri por semana.
 - i. Nota: Se utilizó 1 caja Petri inoculada de cada bacteria por semana. En la semana 4 se repitió el procedimiento para sembrar 3 sub-cajas hijas de cada bacteria, dado a que el cultivo tiene un mes de vida en refrigeración. Esto se repitió durante el tiempo de investigación.
7. Se colocó la tapa de las cajas a mediación y se esperó hasta que este se solidificara.
8. Con un asa microbiológica se tomó una colonia del cultivo bacteriano y se inoculó en el agar MRS, realizando un estriado. Se inocularon 3 cajas Petri con *L. plantarium* y 3 con *L. casei*.
9. Las cajas Petri inoculadas se sellaron con papel Parafilm y se incubaron a 37 °C en una incubadora durante 72 horas.
10. Los cultivos fueron almacenados en la refrigeradora hasta su uso.

B. PREPARACIÓN DE INÓCULO PARA FERMENTACIÓN

Materiales y equipo

- Cultivo de *L. plantarium* en agar
- Cultivo de *L. casei* en agar
- Caldo MRS
- Balanza
- Estufa con agitación
- Esterilizador de autoclave
- Incubadora de agitación
- Campana de laboratorio
- Erlenmeyer de 250 mL con tapa
- Probeta de 100 mL
- 2 mecheros de etanol
- 1 Agitador magnético
- 1 Asa microbiológica
- 1 espátula

- Cinta testigo
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Agua destilada
- Etanol
- Cloro

Procedimiento

1. Siguiendo las indicaciones del fabricante para la preparación de caldo MRS, se midió el volumen necesario de agua destilada con una probeta y se vertió en un Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se pesaron en un trozo de papel aluminio en una balanza los gramos de caldo MRS necesarios siguiendo la proporción de 55 g de caldo/L indicados por el fabricante y se vertieron en el Erlenmeyer.
3. El Erlenmeyer se colocó en una estufa, se calentó y se agitó con ayuda de un agitador magnético hasta que alcanzó el punto de ebullición y cambio de color.
4. Se colocó cinta testigo y se esterilizó en una autoclave a 121°C por 15 minutos.
5. Se desinfectó el área de trabajo utilizando etanol al 80% y cloro. Se trabajó al lado de dos mecheros de etanol.
6. Con un asa microbiológica se tomó una colonia del cultivo bacteriano en agar y se inoculó en el caldo MRS a temperatura ambiente.
7. Se colocaron las tapas a los erlenmeyers, se sellaron con papel Parafilm y se incubaron a 37 °C en una incubadora de agitación a 150 rpm durante 16 horas.

C. PREPARACIÓN DE MELAZA SIN TRATAMIENTO

Materiales y equipo:

- Melaza
- NaOH 3.00 N
- HCl 6.34 N
- Balanza de laboratorio
- Esterilizador de autoclave
- Potenciómetro
- Estufa con agitación
- Refrigeradora
- 3 Erlenmeyers de 1000 mL
- Probeta de 1000 mL
- Beaker de 500 mL
- 2 Beakers de 150 mL
- 2 pipetas pasteur
- 1 espátula
- Agitador magnético

- Cinta testigo
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Agua destilada

Procedimiento:

1. En erlenmeyers de 1000 mL se prepararon 3 soluciones de melaza al 15, 21 y 28 % (m/v), para posteriormente cuando se mezclen con el inóculo y el extracto de levadura alcancen una concentración de 12, 17 y 22 % (m/v), equivalente a 120, 170 y 220 g/L, respectivamente.
 - a. Nota: las concentraciones de melaza evaluadas fueron seleccionadas en base a los resultados de otras investigaciones, mencionadas en la sección de antecedentes y marco teórico, donde se observó que el rango seleccionado ha generado los mayores rendimientos de producción de ácido láctico. Trabajando tres concentraciones para obtener valores estadísticamente aceptables.
2. En un beaker de 500 mL se vertió melaza utilizando una espátula.
3. Los erlenmeyers se colocaron en una balanza de laboratorio, se tararon y se pesaron 85.5 g, 191.25 g y 156.75 g de melaza para preparar 570 mL al 15 % (m/v), 900 mL al 21 % (m/v) y 570 mL al 28 % (m/v), respectivamente.
4. Utilizando una probeta se agregó el volumen de agua destilada indicado en el numeral anterior para diluir la melaza.
5. Se colocó un agitador magnético a cada Erlenmeyer y se colocaron en una estufa sin calor y con agitación hasta que la melaza se diluyó.
6. Se midió el pH de la melaza con un potenciómetro, previamente calibrado, y con agitación continua se ajustó el pH a 6.5 utilizando HCl 6.34 N y NaOH 3.00 N, agregando gotas con pipetas pasteur.
7. Se colocó cinta testigo a los erlenmeyers y se esterilizaron las soluciones en una autoclave a 121°C por 15 minutos.
8. Las soluciones de melaza se conservaron en refrigeración selladas con papel aluminio y papel Parafilm hasta su uso.

D. HIDRÓLISIS DE MELAZA

Materiales y equipo:

- Melaza
- NaOH 3.00 N
- HCl 6.34 N
- Balanza
- Esterilizador de autoclave
- Potenciómetro
- Termómetro
- Estufa con agitación

- Refrigeradora
- Centrifugadora
- 3 Erlenmeyers de 1000 mL
- Probeta de 1000 mL
- Beaker de 500 mL
- 2 Beakers de 150 mL
- Envases de centrífuga
- 2 pipetas pasteur
- 1 espátula
- Agitador magnético
- Cinta testigo
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Agua destilada

Procedimiento:

1. Se repitieron los pasos 1-5 del procedimiento del inciso C.
2. A cada solución de melaza se midió el pH con un potenciómetro, previamente calibrado, y con agitación continua se disminuyó a pH 1 utilizando HCl 6.34 N y agregando gotas con pipetas pasteur.
3. Los erlenmeyers con la solución se colocaron en una estufa con agitación y calor, se elevó la temperatura a 80°C y se mantuvo durante 1 hora.
4. Las soluciones se retiraron del calor y cuando alcanzaron la temperatura ambiente se colocaron en una estufa sin calor y con agitación. Agregando gotas con pipetas pasteur se ajustó el pH a 6.5 utilizando HCl 6.34 N y NaOH 3.00 N.
5. La melaza hidrolizada se colocó en envases de centrifugadora de 250 mL, pesando cada uno para que tuvieran el mismo peso.
6. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos.
7. El sobrenadante se decantó en erlenmeyers de 1000 mL.
8. Se colocó cinta testigo a los erlenmeyers y se esterilizaron las soluciones en una autoclave a 121°C por 15 minutos.
9. Las soluciones de melaza hidrolizada se conservaron en refrigeración selladas con papel aluminio y papel Parafilm hasta su uso.

E. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE EXTRACTO DE LEVADURA

Materiales y equipo:

- Extracto de levadura
- Balanza de laboratorio
- Esterilizador de autoclave
- 3 Erlenmeyers de 250 mL

- Probeta de 100 mL
- 1 Agitador magnético
- 1 espátula
- Cinta testigo
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Agua destilada

Procedimiento:

1. En erlenmeyers de 250 mL se prepararon 3 soluciones de extracto de levadura al 5, 10 y 15 % (m/v), para posteriormente cuando se mezclen con el inóculo y la melaza alcancen una concentración de 0.5, 1.0 y 1.5 % (m/v) equivalentes a 5, 10 y 15 g/L, respectivamente.
 - a. Nota: las concentraciones de extracto de levadura evaluadas fueron seleccionadas en base a los resultados de otras investigaciones, mencionadas en la sección de antecedentes y marco teórico, donde se observó que el rango seleccionado ha generado los mayores rendimientos de producción de ácido láctico. Trabajando tres concentraciones para obtener valores estadísticamente aceptables.
2. En papel aluminio en una balanza se pesaron 2.5 g, 11 g y 7.5 g de extracto de levadura para preparar 80 mL al 0.5 % (m/v), 100 mL al 1.0 % (m/v) y 80 mL al 1.5 % (m/v), respectivamente.
3. Utilizando una probeta se agregó el volumen de agua destilada indicado en el numeral anterior para diluir el polvo.
4. Se colocó un agitador magnético a cada Erlenmeyer y estos se colocaron en estufas con agitación y sin calor hasta que el polvo se diluyó.
5. Las soluciones se taparon con aluminio, se etiquetaron, se les colocó cinta testigo y se esterilizaron en una autoclave a 121°C por 15 minutos.
6. Las soluciones de extracto de levadura se conservaron en refrigeración selladas con papel aluminio y papel Parafilm hasta su uso.

F. PRUEBA FACTORIAL DE FERMENTACIÓN DE MELAZA VARIANDO TRATAMIENTO DE MELAZA, CONCENTRACIÓN DE MELAZA Y CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA

Materiales y equipo:

- Cultivo de *L. plantarium* en caldo
- Cultivo de *L. casei* en caldo
- Soluciones de melaza al 15, 21 y 28 % (m/v)
- Soluciones de melaza hidrolizada al 15, 21 y 28 % (m/v)
- Soluciones de extracto de levadura al 5, 10 y 15 % (m/v)
- Esterilizador de autoclave
- Incubadora de agitación

- Campana de laboratorio
- Potenciómetro
- 22 Erlenmeyer de 250 mL con tapa
- Probeta de 100 mL
- 3 pipetas graduadas de 10 mL
- 2 mecheros
- Cinta testigo
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Etanol
- Cloro

Procedimiento:

1. Se realizó un experimento de tipo factorial, en el cual se evaluaron los siguientes factores: pretratamiento de melaza, concentración de melaza y concentración de extracto de levadura. Evaluando para cada uno el rendimiento global de producción de ácido láctico y biomasa sobre sustrato.
 - a. Nota: Los factores fueron seleccionados por las razones que se exponen en la sección de justificación. Cada uno de estos representa un parámetro crítico en la fermentación. Otros factores como temperatura, presión y agitación no se evaluaron puesto a que la revisión bibliográfica demostró una amplia investigación de estos temas, los cuales han generado valores establecidos que generan rendimientos adecuados para los microorganismos trabajados.
2. Los niveles de cada factor fueron: no hidrolizada e hidrolizada para pretratamiento de melaza; 12.0%, 17.0% y 22.0% (m/v) para concentración de melaza; y 0.5%, 1.0% y 1.5% (m/v) para extracto de levadura.
3. Por lo tanto: se fabricaron 18 medios, cada uno compuesto con una concentración de extracto de levadura, concentración de melaza y pretratamiento de melaza distinto. Cada uno de estos medios se fermento utilizando *L. plantarum* y *L. casei*, por separado. Se realizó una réplica por cada fermentación, a excepción de la corrida con melaza al 17 % (m/v) y extracto de levadura al 1.0% (m/v) que se realizó en triplicado para obtener valores estadísticos. El error de este se propago a los demás valores.
4. El diseño factorial se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 5. Diseño factorial de fermentación de melaza

Sistema	Concentración de melaza (% m/v)	Concentración de extracto de levadura (% m/v)
MA1	12.0%	0.5%
MA2	12.0%	1.0%
MA3	12.0%	1.5%
MB1	17.0%	0.5%
MB2	17.0%	1.0%
MB3	17.0%	1.5%
MC1	22.0%	0.5%
MC2	22.0%	1.0%
MC3	22.0%	1.5%
MHA1	12.0%	0.5%
MHA2	12.0%	1.0%
MHA3	12.0%	1.5%
MHB1	17.0%	0.5%
MHB2	17.0%	1.0%
MHB3	17.0%	1.5%
MHC1	22.0%	0.5%
MHC2	22.0%	1.0%
MHC3	22.0%	1.5%

Nota: Los sistemas de melaza no hidrolizada se identificaron anteponiendo “M” y de melaza no hidrolizada “MH”. Es decir, un sistema con una concentración de melaza hidrolizada al 17 % (m/v), extracto de levadura al 0.5 % (m/v) se identifica como “MHB1”

5. Se realizó el procedimiento indicado en el inciso B para la preparación de 200 mL de inóculo de cada bacteria.
6. Se realizó el procedimiento indicado en los incisos C, D y E para la preparación de soluciones de melaza, melaza hidrolizada y extracto de levadura respectivamente.
7. Una probeta del 100 mL y 3 pipetas graduadas de 10 mL se envolvieron en aluminio y se esterilizaron en una autoclave a 121°C por 15 minutos.
8. Se desinfecto el área de trabajo utilizando etanol al 80% y cloro.
9. Trabajando al lado de 2 mecheros, se prepararon los 18 sustratos para cada bacteria variando el tratamiento de melaza, la concentración de melaza y extracto de levadura como se indica en el Cuadro 5. Se utilizó un volumen de fermentación de 100 mL.
10. Con la probeta estéril se midieron 80 mL de las soluciones de melaza y se vertieron en cada Erlenmeyer.
11. Con una pipeta graduada estéril se midieron 10 mL de las soluciones de extracto de levadura y se vertieron en cada Erlenmeyer.

- a. Nota: Las soluciones de extracto de levadura y melaza se esterilizaron por separado con el fin de evitar posibles reacciones de Maillard.
12. Con una pipeta graduada estéril se midieron 10 mL de inóculo y se vertieron en cada Erlenmeyer.
13. Los erlenmeyers se taparon y se sellaron con papel Parafilm
14. Se incubaron a 37°C y 150 rpm durante 144 horas.
15. Posterior al tiempo de incubación, se midió el pH de los cultivos utilizando un potenciómetro y se siguió el procedimiento de los numerales H e I para el análisis de muestras.
16. Este procedimiento se realizó el mismo para ambas bacterias.

G. ANÁLISIS FACTORIAL DE FERMENTACIÓN DE MELAZA VARIANDO TRATAMIENTO DE MELAZA, CONCENTRACIÓN DE MELAZA Y CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA

Materiales y equipo:

- Microsoft Excel
- Software Minitab

Procedimiento:

1. Con los valores de concentración de ácido láctico y azúcares se calculó el rendimiento de producto sobre sustrato como se observa en la sección de cálculos en anexos.
2. El rendimiento de producto sobre sustrato se tabuló en Excel.
3. En el software Minitab se creó un diseño factorial completo de 3 factores: tratamiento de melaza, concentración de melaza y concentración de extracto de levadura; con los siguientes niveles: no hidrolizada e hidrolizada; 120, 170 y 220; y 5, 10 y 15, respectivamente.
4. En opciones se especificó no aleatorizar el diseño.
5. Se agregó una columna al lado del diseño factorial creado con el nombre "Respuesta". En esta columna se pegaron los valores de rendimiento de producto sobre sustrato, asegurándose que los valores coincidían con lo especificado en el diseño factorial.
6. Se seleccionó la pestaña "Estadísticas", "DOE", "Factorial" y "Analizar diseño factorial", con lo cual se generó un análisis de varianza,
7. Se seleccionó la pestaña "Estadísticas", "DOE", "Factorial" y "Gráficas factoriales", con lo cual se generaron gráficas de efectos principales y de interacción.
8. Se seleccionó la pestaña "Estadísticas", "ANOVA" y "Prueba de igualdad de varianzas". En la página que se abrió se seleccionó la columna "Respuesta" en la opción "Respuesta" y en "Factores" el factor "Tratamiento de melaza". Este procedimiento se repitió para los factores "Concentración de melaza" y

“Concentración de extracto de levadura”, con lo cual se generaron gráficas de pruebas de igualdad de varianzas para cada factor.

H. FERMENTACIÓN DE MELAZA SUPLEMENTADA CON EXTRACTO DE LEVADURA PARA GENERACIÓN DE MODELO CINÉTICO DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Materiales y equipo:

- Cultivo de *L. plantarium* en caldo
- Cultivo de *L. casei* en caldo
- Soluciones de melaza al 15, 21 y 28 % (m/v)
- Soluciones de extracto de levadura al 5, 10 y 15 % (m/v)
- Esterilizador de autoclave
- Incubadora de agitación
- Potenciómetro
- Campana de laboratorio
- 22 Erlenmeyer de 250 mL con tapa
- Probeta de 100 mL
- 3 pipetas graduadas de 10 mL
- 2 mecheros
- Papel Parafilm
- Papel aluminio
- Etanol
- Cloro

Procedimiento:

1. Se realizó un análisis, expuesto en la sección de Discusión de resultados, para escoger la concentración de extracto de levadura y el tratamiento y concentración de melaza que generen el mayor rendimiento en producción de ácido láctico.
2. Utilizando las concentraciones y tratamientos escogidos para cada bacteria se realizó una curva de crecimiento microbiano estableciendo los cambios de concentración de biomasa, consumo de sustrato y producción de ácido láctico.
3. Se realizó el procedimiento indicado en el inciso B para la preparación de 200 mL de inóculo de cada bacteria.
4. Se realizó el procedimiento de los incisos C y E para la preparación de 1000 mL de melaza al 17 % (m/v) y 150 mL de extracto de levadura al 1.5 % (m/v).
5. Se desinfecto el área de trabajo utilizando etanol al 80% y cloro y se trabajó al lado de 2 mecheros.
6. Con la probeta estéril se midieron 80 mL de melaza y se vertieron en cada Erlenmeyer.
7. Con una pipeta graduada estéril se midieron 10 mL de extracto de levadura y se vertieron en cada Erlenmeyer.

8. Con una pipeta graduada estéril se midieron 10 mL de inóculo y se vertieron en cada Erlenmeyer.
9. Los erlenmeyers se taparon y se sellaron con papel Parafilm
10. Se incubaron a 37°C y 150 rpm.
11. Los cultivos se incubaron durante 144 horas, sacando un Erlenmeyer y poniendo en refrigeración para detener la actividad metabólica de las bacterias a las horas: 4, 11, 24, 35, 48, 59, 72, 83, 100 y 144, representando cada Erlenmeyer un punto en la curva de crecimiento microbiano.
12. En la hora 72 se retiraron de la incubadora 3 erlenmeyers a la vez como triplicado para la propagación de error. Y en la hora 100 en el duplicado.
13. A cada Erlenmeyer se le midió el pH y se siguió el procedimiento del inciso H para el análisis de muestras.
14. El procedimiento se realizó para cada bacteria en duplicado.

I. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

Materiales y equipo:

- Centrífuga
- Balanza analítica de laboratorio
- Horno
- Vortex
- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés)
- 2 Pipetas graduadas de 5 mL
- Tubos de ensayo de 10 mL con tapa
- Tubos cónicos para centrífuga Falcon™ de 50 mL
- Bulbo para pipeta
- Gradilla para tubos de ensayo
- Gradilla para tubos cónicos para centrífuga
- Agua destilada

Procedimiento:

1. Se tomaron 40 mL de las muestras de melaza antes, durante y después de la fermentación y se vertieron en tubos cónicos para centrífuga Falcon™ de 50 mL.
2. Se pesaron y se colocaron en una centrífuga balanceando el peso en cada corrida.
3. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos.
4. El sobrenadante se decantó en tubos de ensayo.
5. El sedimento obtenido se utilizó para la determinación de biomasa por diferencia de peso seco.
 - a. Al sedimento se agregaron 10 mL de agua destilada.
 - b. El tubo para centrífuga se colocó en un vortex a máxima velocidad durante 30 segundos hasta que el sedimento se diluyó nuevamente.

- c. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante obtenido se descartó. Se repitió el procedimiento a-c dos veces.
 - d. Los tubos cónicos para centrífuga con el sedimento se colocaron en un horno a 60 °C durante 48 horas, hasta que el peso se mantuvo constante.
 - e. Se determinó el peso de los tubos con el sedimento y de los tubos sin el sedimento en una balanza analítica.
 - f. Por diferencia de peso se determinó la concentración de biomasa seca, utilizando el volumen de muestra que se centrifugó inicialmente.
6. El sobrenadante obtenido en el inciso 4 se utilizó para determinar la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y ácido láctico con HPLC.
 - a. Las muestras se diluyeron en una proporción 1:1 en agua destilada, para lo cual se mezclaron 5 mL de sobrenadante y 5 mL de agua destilada en un tubo de ensayo.
 - b. Los tubos se agitaron en un vortex a velocidad máxima para homogenizar.
 - c. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado del Centro de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.
 - d. Se realizó el análisis con detector de índice de refracción utilizando columna Hi plex H que se detalla más adelante.

J. ANÁLISIS DE MUESTRAS CON HPLC

Materiales y equipo

- Filtros de 0.22 µm
- Filtros de 0.45 µm
- Viales de cromatografía
- Columna Hi-plex H
- Detector de índice de refracción P-1200
- Agua destilada

Procedimiento

1. Se tomó una alícuota de la muestra preparada utilizando una jeringa y se filtró empleando un filtro de 0.22 µm hacia los viales de cromatografía.
2. De la muestra filtrada, se tomaron 20 µL y se introdujeron al muestreador.
3. Se configuró la bomba para tener un flujo de 0.6 µL/min
4. Se estableció la temperatura de la columna y el detector a 20 °C y del inyector a 30 °C.
5. El agua destilada que ingresa a la columna se filtró utilizando filtros de 0.45 µm.
6. Se realizó la corrida y se configuro el archivo para exportar los datos obtenidos del detector del índice de refracción a 40 °C.

K. DETERMINACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO QUE DESCRIBE EL CRECIMIENTO CELULAR Y CONSUMO DE SUSTRATO, UTILIZANDO EL SOFTWARE BERKELEY MADONNA ®

Materiales y equipo:

- Microsoft Excel
- Software Berkeley Madonna ®

Procedimiento:

1. Las concentraciones de azúcares totales, ácido láctico y biomasa en el tiempo se tabularon en Excel.
2. Los valores de cada concentración en el tiempo se guardaron en diferentes archivos como “Comma Separated Values” (.csv)
3. Se abrió el programa de Berkeley Madonna.
4. Se escribió el código con las ecuaciones que describen el crecimiento microbiano, producción de ácido láctico y consumo de sustrato. Este se observa en la sección de anexos. La ecuación del consumo de sustrato está basada en el modelo de Monod, la de crecimiento microbiano en el modelo de Nandasana y Kumar (2007), el cual modifica el modelo de Monod incluyendo inhibición por sustrato e inhibición por producto, y la producción de ácido láctico en Luedeking–Piret incluyendo crecimiento asociado y no asociado a la producción de ácido láctico.
5. Los datos experimentales se graficaron en el programa.
6. Se realizó un ajuste múltiple iterando los diferentes parámetros empleados.
7. Se ajustaron los parámetros utilizando “sliders” hasta que el modelo cinético coincidió con los datos experimentales.

VII. RESULTADOS

Cuadro 6. Porcentaje de hidrólisis de sacarosa en melaza de caña de azúcar por hidrólisis ácida utilizando ácido clorhídrico

	Concentración de azúcares (± 0.002 g/L)			Porcentaje de hidrólisis (± 0.42 % m/v)
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	
Inicial	59.28	17.56	18.05	91.33
Final	5.140	41.59	48.31	

Valor porcentual representa el valor masico de sacarosa final con respecto al valor inicial del mismo en del sistema.

Cuadro 7. Comparación de producción de ácido láctico por fermentación empleando *L. casei* a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada

Sistema	Azúcares invertidos	Consumo de azúcares (± 0.005 g/L)	Ácido láctico (± 0.003 g/L)	Y P/S _g (g/g)	Incertidumbre (\pm g/g)	Y X/S _g (g/g)	Incertidumbre (\pm g/g)
MA1	No	18.47	13.11	0.7098	0.0002	0.0661	0.008
MA2	No	20.89	15.89	0.7607	0.0002	0.0528	0.007
MA3	No	21.43	17.77	0.8293	0.0002	0.0899	0.009
MB1	No	20.18	12.98	0.6433	0.0002	0.0931	0.021
MB2	No	17.88	15.86	0.8873	0.0003	0.0157	0.020
MB3	No	18.84	16.72	0.8876	0.0003	0.0190	0.019
MC1	No	21.63	14.64	0.6770	0.0003	0.0185	0.020
MC2	No	22.55	17.66	0.7833	0.0003	0.0693	0.019
MC3	No	22.25	18.84	0.8469	0.0002	0.0830	0.011
MHA1	Sí	19.57	14.89	0.7608	0.0002	0.09561	0.007
MHA2	Sí	19.95	15.91	0.7974	0.0003	0.08289	0.007
MHA3	Sí	20.99	15.51	0.7389	0.0002	0.11391	0.008
MHB1	Sí	37.35	19.39	0.5191	0.0001	0.06387	0.005
MHB2	Sí	36.56	20.54	0.5863	0.0001	0.08194	0.006
MHB3	Sí	33.71	23.31	0.6914	0.0001	0.08686	0.006
MHC1	Sí	33.49	18.03	0.5383	0.0002	0.06713	0.008
MHC2	Sí	37.67	17.95	0.4765	0.0001	0.07693	0.006
MHC3	Sí	38.51	20.89	0.5424	0.0001	0.05676	0.005

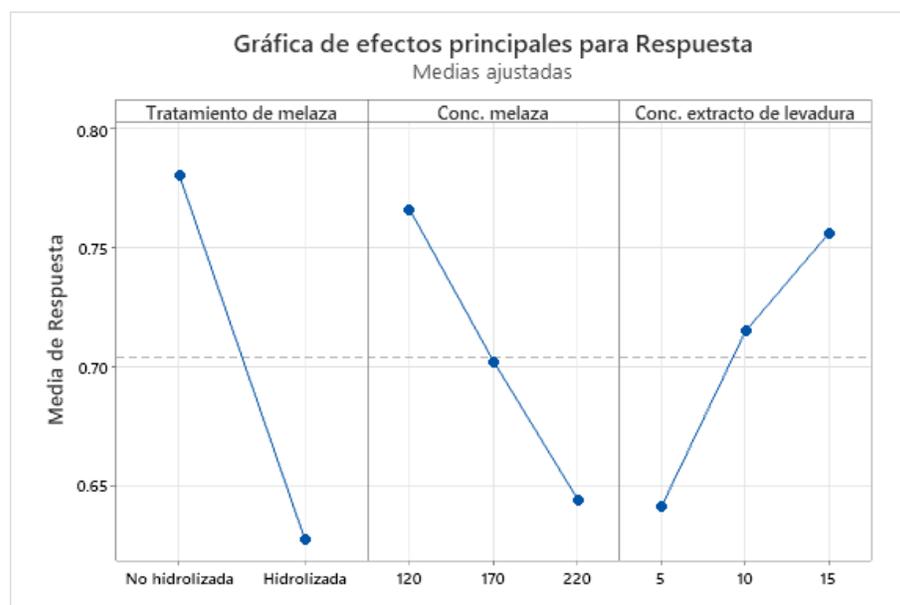
Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Las especificaciones de la composición de cada sistema pueden observarse en el Cuadro 5 de la sección de Metodología. Notación: Tratamiento de melaza: M – no hidrolizada, MH – hidrolizada. Concentración de melaza del sistema: A – 120 g/L, B – 170 g/L, C – 220 g/L. Concentración de extracto de levadura del sistema: 1 – 5 g/L, 2 – 10 g/L, 3 – 15 g/L. Y_{P/Sg} rendimiento global de producción de ácido láctico sobre el consumo de azúcares totales; Y_{X/Sg} rendimiento global de formación de biomasa sobre el consumo de azúcares totales.

Cuadro 8. Comparación de producción de ácido láctico por fermentación empleando *L. plantarum* a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada

Sistema	Azúcares invertidos	Consumo de azúcares (± 0.005 g/L)	Ácido láctico (± 0.003 g/L)	$Y_{P/Sg}$ (g/g)	Incertidumbre (\pm g/g)	$Y_{X/Sg}$ (g/g)	Incertidumbre (\pm g/g)
MA1	No	18.71	15.55	0.8313	0.0003	0.110	0.008
MA2	No	21.31	16.43	0.7712	0.0002	0.091	0.007
MA3	No	20.79	17.27	0.8309	0.0002	0.102	0.008
MB1	No	23.33	18.51	0.7936	0.0001	0.069	0.005
MB2	No	20.07	16.23	0.8089	0.0001	0.076	0.006
MB3	No	27.21	23.33	0.8576	0.0002	0.085	0.007
MC1	No	29.43	19.55	0.6644	0.0002	0.124	0.010
MC2	No	30.03	20.29	0.6758	0.0002	0.142	0.012
MC3	No	20.45	16.73	0.8181	0.0002	0.101	0.009
MHA1	Sí	34.68	18.27	0.5266	0.0001	0.059	0.006
MHA2	Sí	34.46	20.45	0.5933	0.0001	0.064	0.006
MHA3	Sí	35.60	20.77	0.5832	0.0001	0.072	0.006
MHB1	Sí	20.28	13.75	0.6777	0.0002	0.013	0.017
MHB2	Sí	29.70	15.26	0.5182	0.0001	0.025	0.013
MHB3	Sí	38.46	20.33	0.5284	0.0001	0.047	0.011
MHC1	Sí	36.54	19.61	0.5365	0.0001	0.038	0.008
MHC2	Sí	41.78	26.41	0.6320	0.0001	0.053	0.008
MHC3	Sí	41.16	26.11	0.6342	0.0001	0.062	0.008

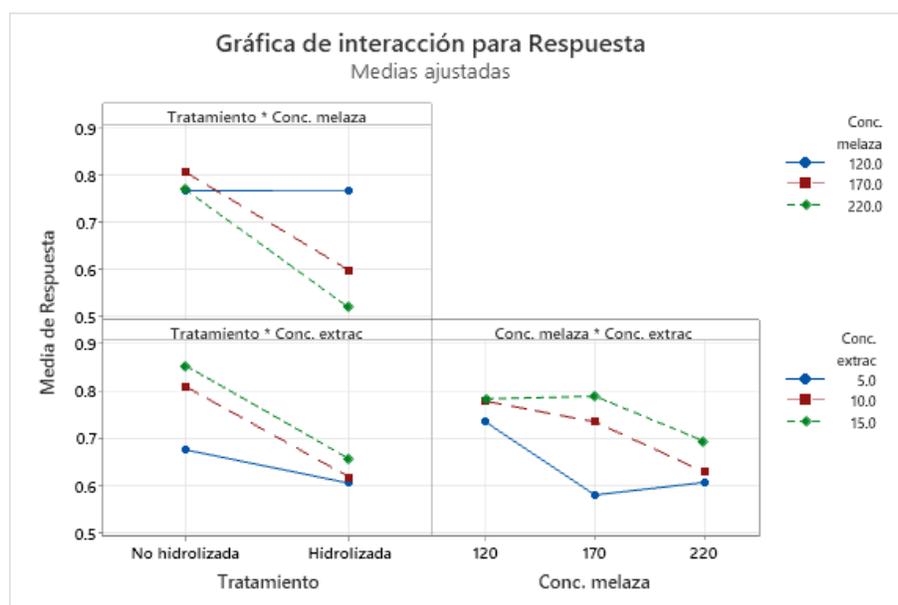
Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Las especificaciones de la composición de cada sistema pueden observarse en el Cuadro 5 de la sección de Metodología. Notación: Tratamiento de melaza: M – no hidrolizada, MH – hidrolizada. Concentración de melaza del sistema: A – 120 g/L, B – 170 g/L, C – 220 g/L. Concentración de extracto de levadura del sistema: 1 – 5 g/L, 2 – 10 g/L, 3 – 15 g/L. $Y_{P/Sg}$ rendimiento global de producción de ácido láctico sobre el consumo de azúcares totales; $Y_{X/Sg}$ rendimiento global de formación de biomasa sobre el consumo de azúcares totales.

Figura 14. Gráfica de efectos principales para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, *L. casei*



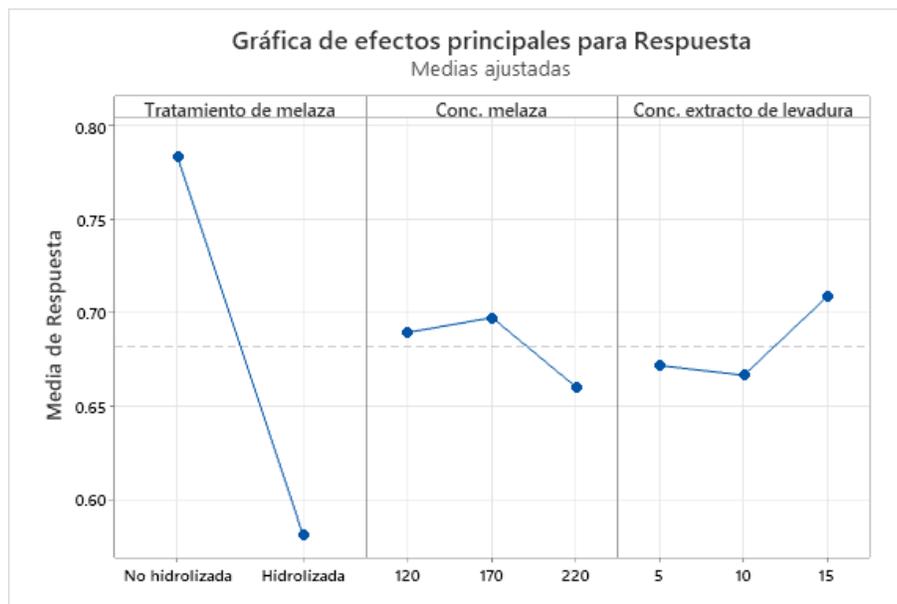
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 15. Gráfica de interacción para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, *L. casei*



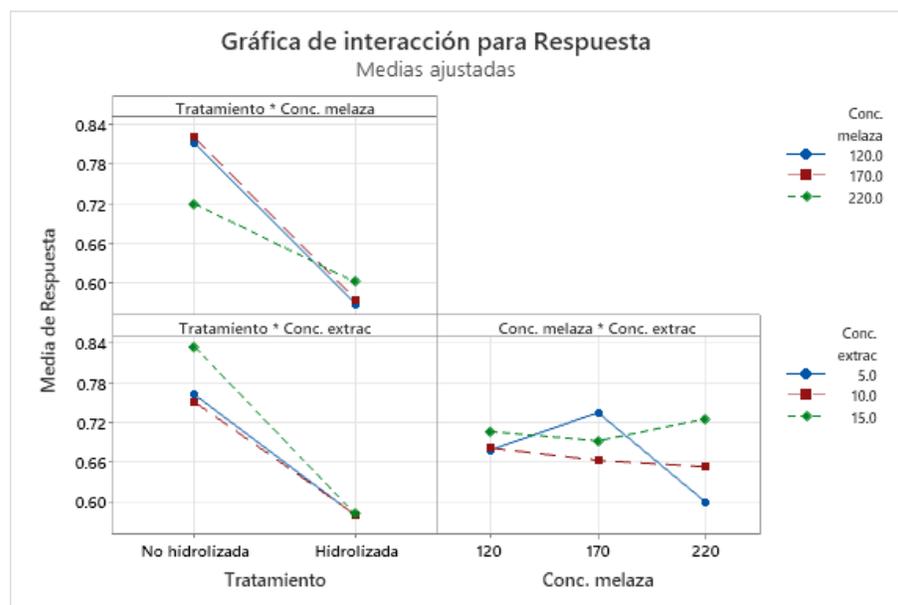
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 16. Gráfica de efectos principales para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, *L. plantarum*



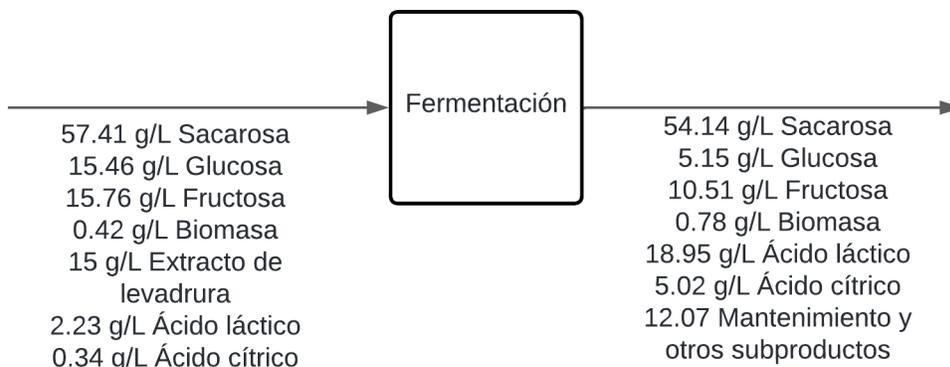
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 17. Gráfica de interacción para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, *L. plantarum*



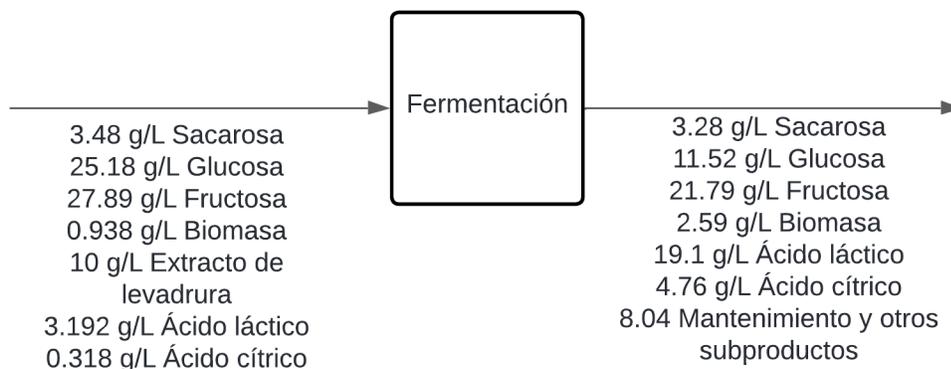
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 18. Balance de masa del sistema MB3 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza no hidrolizada empleando *L. casei*



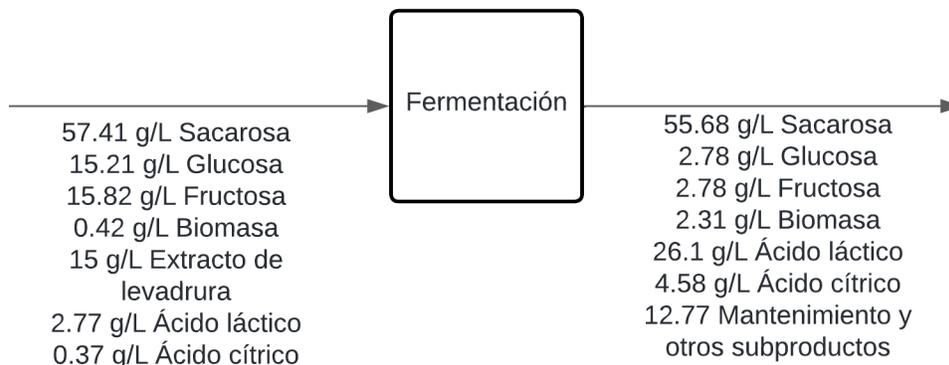
Fermentación realizada a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Las especificaciones de la composición del sistema pueden observarse en el Cuadro 5 de la sección de Metodología.

Figura 19. Balance de masa del sistema MHA2 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza hidrolizada empleando *L. casei*



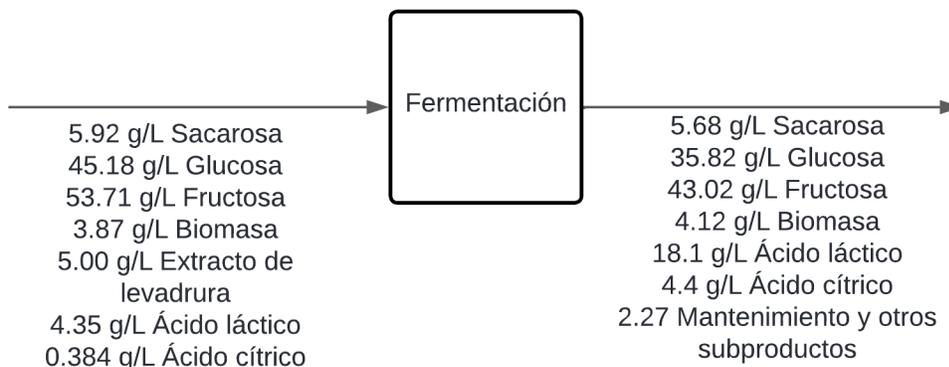
Fermentación realizada a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Las especificaciones de la composición del sistema pueden observarse en el Cuadro 5 de la sección de Metodología.

Figura 20. Balance de masa del sistema MB3 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza no hidrolizada empleando *L. plantarum*



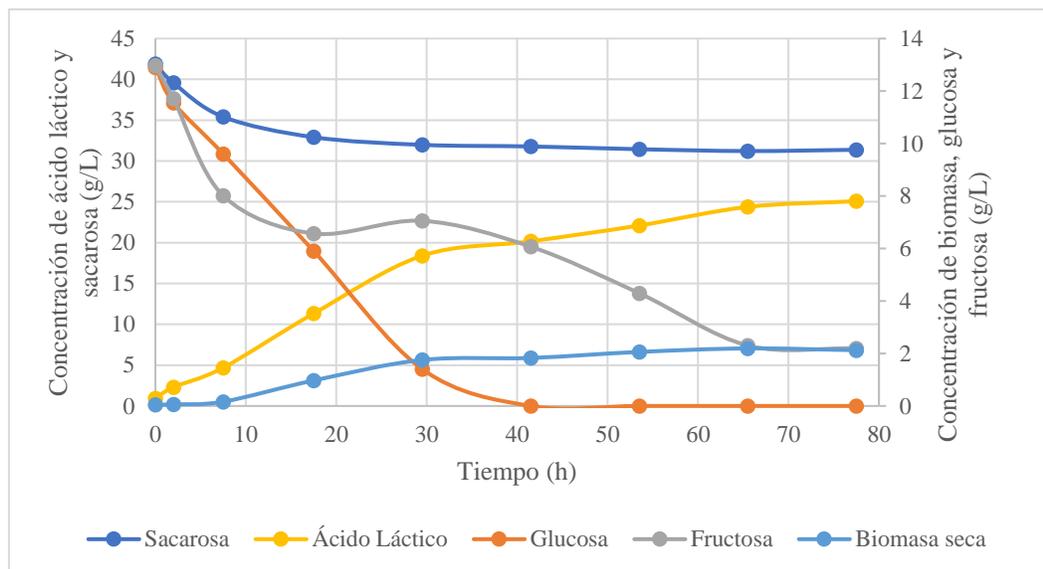
Fermentación realizada a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Las especificaciones de la composición del sistema pueden observarse en el Cuadro 5 de la sección de Metodología.

Figura 21. Balance de masa del sistema MHB1 del Cuadro 5 para la producción de ácido láctico a partir de melaza hidrolizada empleando *L. plantarum*



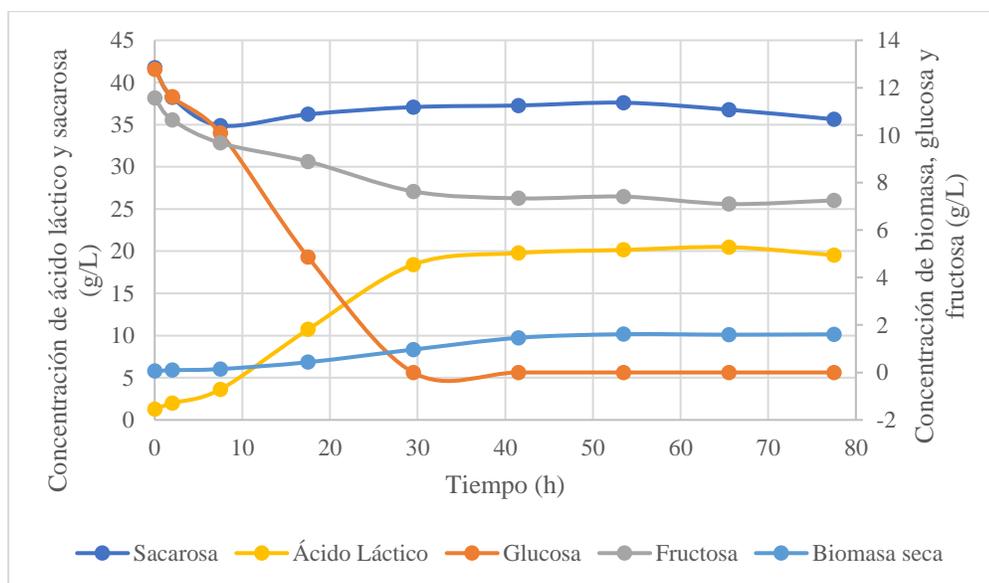
Fermentación realizada a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Las especificaciones de la composición del sistema pueden observarse en el Cuadro 5 de la sección de Metodología.

Figura 22. Consumo de azúcares y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de *L. casei*



Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Composición del medio 170 g/L de melaza y 15 g/L de extracto de levadura.

Figura 23. Consumo de azúcares y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de *L. plantarum*



Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Composición del medio 170 g/L de melaza y 15 g/L de extracto de levadura.

Ecuación 6. Ecuación de Monod empleando *L. casei* y *L. plantarum* para la producción de ácido láctico

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{C_s}{k_s + C_s} \right) \left(\frac{k_i}{k_i + C_s} \right) \exp \left(- \frac{C_p}{k_p} \right)$$

Donde:

μ = Velocidad de crecimiento

μ_{max} = Velocidad máxima de crecimiento

C_s = Concentración de azúcares totales

k_s = Constante de afinidad

k_i = Constante de inhibición por sustrato

C_p = Concentración de ácido láctico

k_p = Constante de inhibición por producto

Ecuación 7. Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo empleando *L. casei* y *L. plantarum* para la producción de ácido láctico

$$\frac{dC_n}{dt} = \mu \cdot C_n \left(1 - \frac{C_n}{C_e} \right)$$

Donde:

C_n = Concentración de biomasa

μ = Velocidad de crecimiento

C_e = Concentración de biomasa en fase estacionaria

t = tiempo

Ecuación 8. Ecuación cinética de producción de ácido láctico en función del tiempo empleando *L. casei* y *L. plantarum*

$$\frac{dC_p}{dt} = \alpha \cdot \frac{dX}{dt} + \beta \cdot C_n \cdot \left(\frac{C_s}{k_s + C_s} \right) \left(\frac{k_i}{k_i + C_s} \right) \exp \left(- \frac{C_p}{k_p} \right)$$

Donde:

C_p = Concentración de ácido láctico

t = tiempo

α = Coeficiente de producción asociada al crecimiento

β = Coeficiente de producción no asociada al crecimiento

C_n = Concentración de biomasa

C_s = Concentración de azúcares totales

k_s = Constante de afinidad

k_i = Constante de inhibición por sustrato

k_p = Constante de inhibición por producto

Ecuación 9. Ecuación cinética de consumo de azúcares en función del tiempo empleando *L. casei* y *L. plantarum* para la producción de ácido láctico

$$\frac{dC_s}{dt} = - \frac{dC_n}{dt} \frac{1}{Y_{XS}} - \frac{dC_p}{dt} \frac{1}{Y_{PS}} - m_s C_n + a \cdot \exp(k * t)$$

Donde:

C_s = Concentración de azúcares totales

C_n = Concentración de biomasa

Y_{XS} = Coeficiente de rendimiento instantáneo de biomasa sobre consumo de sustrato

C_p = Concentración de ácido láctico

Y_{PS} = Coeficiente de rendimiento instantáneo de ácido láctico sobre consumo de sustrato

m_s = Coeficiente de mantenimiento celular

a = Constante asociada a consumo de azúcares

k = Constante asociada a consumo de azúcares

t = tiempo

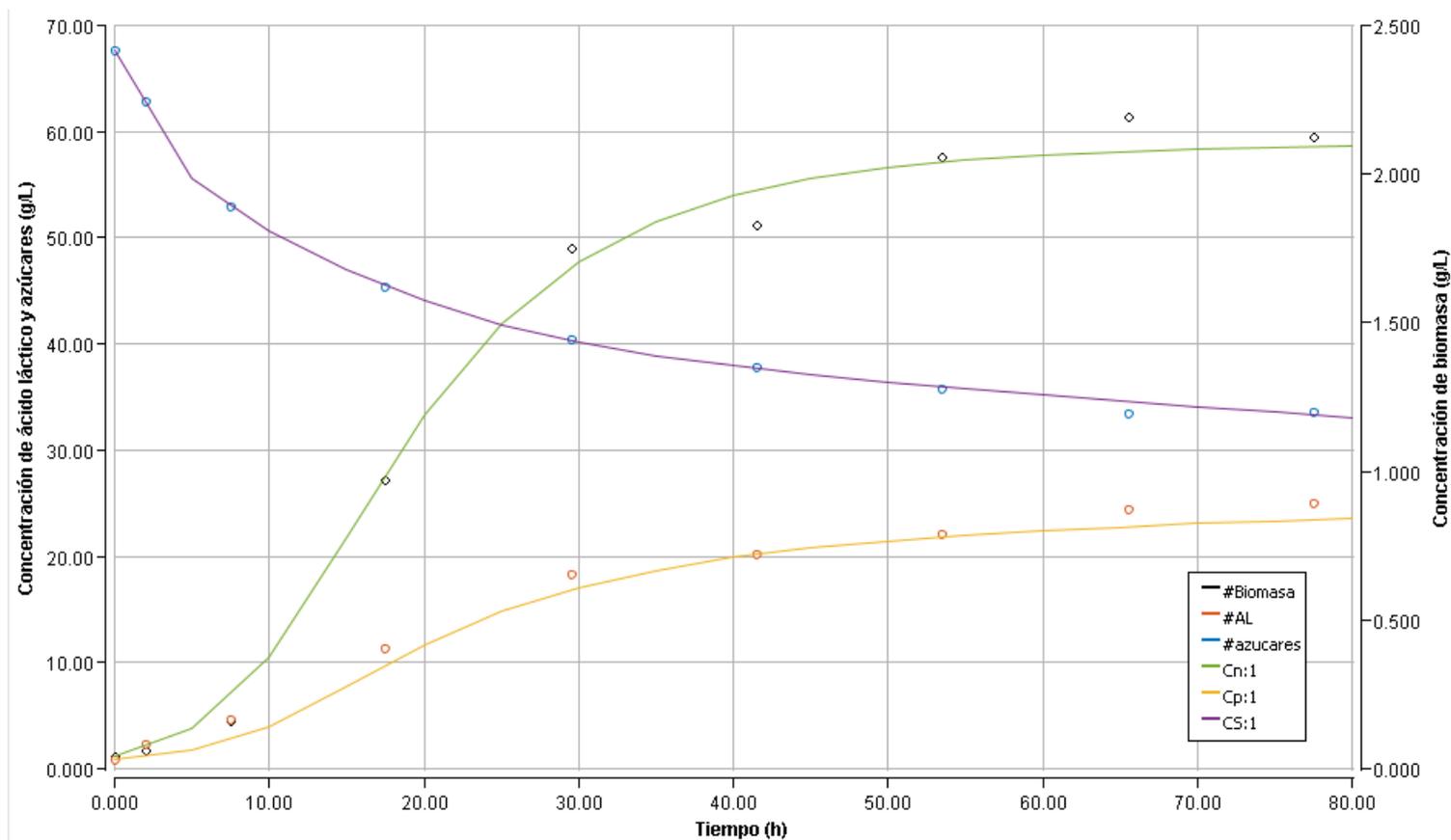
Cuadro 9. Constantes cinéticas de la producción de ácido láctico empleando *L. casei* y *L. plantarum* a partir de melaza de caña de azúcar obtenidas de Berkeley Madonna

Coeficiente	Valor		Dimensional
	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	
μ_{max}	2.37861	0.61946	h^{-1}
k_s	3.44872	46.03027	g/L
k_i	8.24917	59.79032	g/L
k_p	14.0444	36.49023	g/L
β	7.68892	11.42563	g ácido láctico / (g biomasa * h)
α	5.55242	4.02151	g ácido láctico / g biomasa
Y_{XS}	0.27724	0.97499	g biomasa / g azúcar
Y_{PS}	4.23556	2.02117	g ácido láctico / g azúcar
m_s	0.04124	0.01031	g azúcar / g biomasa * h
a	-4.00056	-4.70857	g/(L*h)
k	-0.31101	-0.45475	h^{-1}

Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Composición del medio 170 g/L de melaza y 15 g/L de extracto de levadura. Notación:

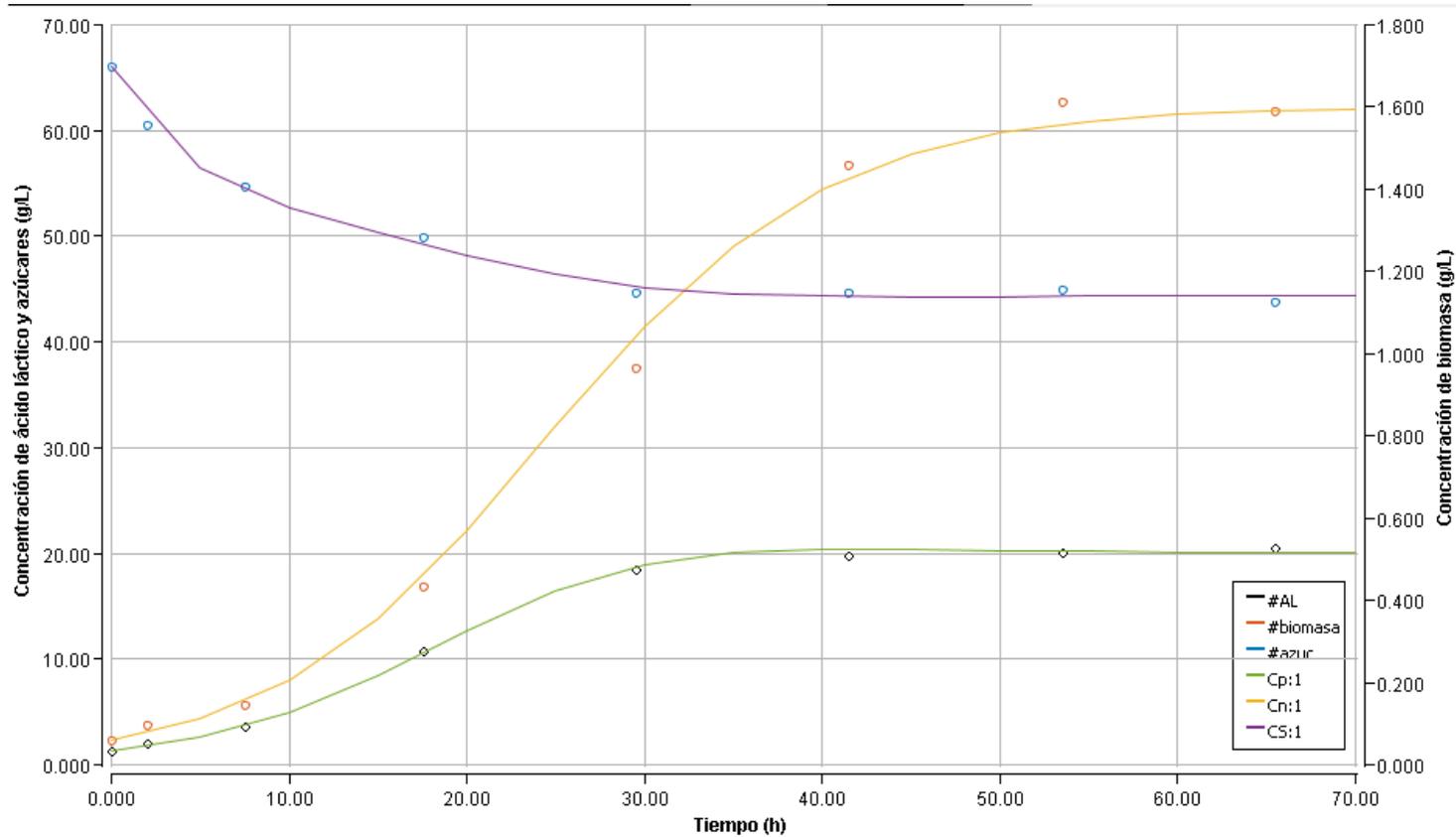
μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento; k_s : Constante de afinidad; k_i : Constante de inhibición por sustrato; k_p : Constante de inhibición por producto; α : Coeficiente de producción asociada al crecimiento; β : Coeficiente de producción no asociada al crecimiento; Y_{XS} : Coeficiente de rendimiento instantáneo de biomasa sobre consumo de sustrato; Y_{PS} : Coeficiente de rendimiento instantáneo de ácido láctico sobre consumo de sustrato; m_s : Coeficiente de mantenimiento celular; a : Constante asociada a consumo de azúcares; k : Constante asociada a consumo de azúcares

Figura 24. Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los datos experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de azúcares y producción de ácido láctico de *L. casei*



Notación: ○ : datos experimentales; — : modelo cinético; #Biomasa=datos experimentales de biomasa en el tiempo; #AL=datos experimentales de ácido láctico en el tiempo; #azúcares = datos experimentales de azúcares en el tiempo; Cn:1= ajuste de modelo de crecimiento de biomasa; Cp:1= ajuste de modelo de producción de ácido láctico; CS:1= ajuste de modelo de consumo de azúcares

Figura 25. Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los datos experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de azúcares y producción de ácido láctico de *L. plantarum*



Notación: ○ : datos experimentales; — : modelo cinético; #Biomasa=datos experimentales de biomasa en el tiempo; #AL=datos experimentales de ácido láctico en el tiempo; #azucars = datos experimentales de azúcares en el tiempo; Cn:1= ajuste de modelo de crecimiento de biomasa; Cp:1= ajuste de modelo de producción de ácido láctico; CS:1= ajuste de modelo de consumo de azúcares

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se planteó como objetivo principal para este trabajo de graduación evaluar la fermentación de melaza de caña de azúcar empleando *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* para la producción de ácido láctico. Con el mismo fin se evaluó el efecto de la hidrólisis ácida de melaza como método de pretratamiento en el rendimiento global de producción de ácido láctico. A la vez, se determinaron las concentraciones de melaza y extracto de levadura como fuentes de azúcares y nitrógeno en el medio que generaron el mayor rendimiento global de producción. Y finalmente, se planteó la cinética de reacción de producción de ácido láctico por fermentación a partir de melaza de caña de azúcar, empleando el pretratamiento, concentración de melaza y concentración de extracto de levadura con el mayor rendimiento para ambas bacterias.

Lactobacillus casei y *Lactobacillus plantarum* son bacterias ácido-lácticas heterofermentativas facultativas que producen ácido láctico a partir de hexosas mediante la vía Embden-Meyerhof-Parnas. Ambas cepas se han reportado como productoras de ácido láctico eficientes a partir de glucosa y fructosa. *L. casei* produce ácido L (+) láctico, mientras que *L. plantarum* ácido D (-) láctico. Siendo ambos isómeros puros potenciales para la producción de PLA. Aunque históricamente se ha brindado mayor interés y el mercado ha sido dominado por el ácido L (+) láctico, se ha estudiado que las propiedades físicas y mecánicas del PLA dependen de la proporción de ácido poli-D-láctico (PDLA) y ácido poli-L-láctico (PLLA) en el copolímero. La co-cristalización ocurre cuando se mezcla PLLA con PDLA, lo que da como resultado un nuevo PLA estereocomplejo con un punto de fusión más alto. Este hallazgo ha llevado a un mayor interés en la producción de ácido D (-) láctico ópticamente puro (García, Arrazola y Durango, 2010; Zhang *et al.*, 2015).

La melaza de caña de azúcar es una fuente rica en sacarosa (59.28 g/L) y pobre en glucosa (17.56 g/L) y fructosa (18.05 g/L). Puesto a que las bacterias empleadas para la producción de ácido láctico en esta experimentación prefieren a la glucosa como sustrato ante la sacarosa, se planteó la evaluación de hidrólisis ácida de melaza como método de pretratamiento. Este se llevó a un pH 1 y 80 °C durante 60 minutos, evitando pH menores a 1 y temperaturas mayores a 106 °C para no degradar la glucosa y la fructosa. Posteriormente se neutralizó y esterilizó en autoclave. El paso de la neutralización previo a la esterilización es crucial, dado a que a un pH bajo se generan compuestos inhibidores. Como se observa en el Cuadro 6, se alcanzó un porcentaje de hidrólisis de 91.33 % (m/v), degradando casi en su totalidad la sacarosa.

Al comparar las fermentaciones realizadas con azúcares invertidos y no invertidos, se observa que en general, ambas bacterias consumieron una mayor cantidad de azúcar en

los sistemas de melaza con tratamiento, sin embargo produjeron una cantidad similar de ácido láctico, que por ende generó mayores rendimientos globales de producto y biomasa sobre sustrato en los sistemas de melaza sin pretratamiento. Estos fenómenos pueden deberse a que al realizar la hidrólisis ácida se degradaron algunas sustancias deseables, las cuales tuvieron un efecto significativo en la producción de ácido láctico. Así mismo, es posible que durante la esterilización de la melaza en la autoclave realizada a 121 °C se haya producido 5-hidroximetil-furfural, el cual es una sustancia inhibidora, que se genera por isomerización y reacciones de deshidratación a temperaturas elevadas en presencia de ácidos (Gomes, Rampon y Ramos, 2017).

Las bacterias ácido-lácticas generalmente son microorganismos fastidiosos desde el punto de vista de requerimientos nutricionales, ya que requieren una fuente compleja de nutrientes como aminoácidos y vitaminas para su crecimiento. El extracto de levadura es la fuente de nitrógeno comúnmente utilizada que provee el complejo de nutrientes necesarios. Para evaluar la influencia de la melaza de caña de azúcar y el extracto de levadura en la formación de ácido láctico, se realizó un diseño experimental de tipo factorial, en el cual se evaluaron concentraciones de melaza de 120 a 220 g/L y concentraciones de extracto de levadura de 5 a 15 g/L, realizando fermentaciones tipo batch a 37 °C con pH inicial de 6.5 durante 144 horas.

El mayor rendimiento de producción de ácido láctico alcanzado por *L. casei* fue de 0.8876 g/g, el cual se dio empleando una concentración de melaza no hidrolizada de 170 g/L y una concentración de extracto de levadura de 15 g/L, con el que se alcanzó una concentración de ácido láctico de 16.72 g/L. Mientras que el mayor rendimiento alcanzado utilizando melaza hidrolizada para esta bacteria fue de 0.7974 g/g con una concentración de melaza invertida de 120 g/L y una concentración de extracto de levadura de 10 g/L, con la que se alcanzó una concentración de ácido láctico de 15.91 g/L. Por otro lado, el mayor rendimiento de producción de ácido láctico alcanzado por *L. plantarum* fue de 0.8576 g/g, el cual se dio empleando una concentración de melaza no hidrolizada de 170 g/L y una concentración de extracto de levadura de 15 g/L, con el que se alcanzó una concentración de ácido láctico de 23.33 g/L. Mientras que el mayor rendimiento alcanzado utilizando melaza hidrolizada para esta bacteria fue de 0.6777 g/g con una concentración de melaza invertida de 170 g/L y una concentración de extracto de levadura de 5 g/L, con la que se alcanzó una concentración de ácido láctico de 13.75 g/L. En ambas bacterias, se observó que en general, al aumentar la concentración de extracto de levadura, la concentración de biomasa producida y el rendimiento de biomasa sobre sustrato aumentaron. Obteniendo la máxima cantidad de biomasa seca de 2.93 g/L al suplementar el medio con 15 g/L de extracto de levadura. Otros estudios también han demostrado esta tendencia empleando melaza de caña de azúcar y melaza de remolacha, donde se pueden mencionar a Wee *et al.* (2004) y Kotzamanidis *et al.* (2002).

En las figuras 14, 15, 16 y 17 se observan gráficas de medias ajustadas del rendimiento global de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares en función de los distintos niveles de cada factor. En la Figura 14, gráfica de efectos principales para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de

azúcares de *L. casei*, se observa la media del rendimiento para cada factor, por separado y sin relacionarse con los otros factores, la cual fue mayor para los sistemas compuestos por melaza no hidrolizada, concentración de 120 g/L de melaza y concentración de 15 g/L de extracto de levadura. Sin embargo, en la siguiente gráfica, Figura 15, gráfica de interacción para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares de *L. casei*, donde se observa la interacción entre los factores, se observa que, al relacionar el tratamiento de melaza con su concentración, los mayores rendimientos se obtienen con melaza no hidrolizada y una concentración de 170 g/L. Al relacionar tratamiento con concentración de levadura, los mayores rendimientos se obtienen con melaza no hidrolizada y 15 g/L de extracto de levadura. Y finalmente, al relacionar concentración de melaza y concentración de extracto de levadura, con 170 g/L de melaza y 15 g/L de extracto de levadura. Los resultados obtenidos indican que la concentración de extracto de levadura tiene un efecto significativo en las fermentaciones de ácido láctico.

En cuanto al análisis factorial para los sistemas fermentados por *L. plantarum*, en la Figura 16, gráfica de efectos principales para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, se observa que, por separado para cada factor, se obtienen mayores rendimientos de producción de ácido láctico sobre sustrato para los sistemas con melaza no hidrolizada, melaza a una concentración de 170 g/L y extracto de levadura a una concentración de 15 g/L. Lo cual coincide con los rendimientos obtenidos relacionando dos factores, que se observan en la Figura 17, gráfica de interacción para rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares, dado a que al combinar tratamiento de melaza con concentración de melaza y tratamiento con concentración de extracto de levadura, se obtienen mayores rendimientos con melaza no hidrolizada y, 170 g/L y 15 g/L como concentración de melaza y extracto de levadura respectivamente.

Lactobacillus casei y *Lactobacillus plantarum* son bacterias ácido-lácticas heterofermentativas facultativas que producen principalmente ácido láctico a partir de glucosa y fructosa, sin embargo pueden producir subproductos en cantidades menores. Fenómeno que se observó durante las fermentaciones, puesto a que los análisis de cromatografía determinaron la presencia de ácido cítrico principalmente, con una concentración entre 4.4 g/L y 5.0 g/L. El etanol es otro subproducto que se observa en la mayoría de las fermentaciones empleando bacterias ácido-lácticas, aunque la presencia de este no se detectó al realizar los análisis de cromatografía. Otros subproductos que podrían haberse generado durante las fermentaciones son ácido acético, formiato, diacetilo, acetoína y dióxido de carbono, los cuales podrían atribuirse a la salida de los balances de masa nombrada como “otros subproductos y mantenimiento”. La formación de esos subproductos implica que el procesamiento posterior a la fermentación requiere separación y purificación del producto final, lo cual debe tomarse en cuenta para futuras investigaciones basadas en este trabajo de graduación. Algunos de los métodos para disminuir la formación de subproductos son el uso de nuevas cepas y la modificación genética de las cepas existentes para seguir el camino deseado (Abedi y Hashemi, 2020; Abdur *et al.*, 2021)

En cuando al mantenimiento, este se atribuye al consumo de sustrato que la célula utiliza para ejecutar la suma de mecanismos moleculares, bioquímicos y genéticos que se dan en su interior para mantenerse en condiciones autosuficientes. En los diferentes balances se observó que los valores correspondientes a mantenimiento fueron mayores en los sistemas que emplearon melaza no hidrolizada a comparación de los que emplearon

melaza hidrolizada, esto se debe a que los primeros están compuestos mayormente por sacarosa, la cual requiere un paso más en la ruta metabólica para poder ser utilizada, aumentando el gasto de energía en estos sistemas (Villagomez *et al.*, 2020).

Los experimentos realizados para la generación de datos para los modelos cinéticos fueron llevados a cabo a una concentración de melaza de 170 g/L, equivalente a una concentración total de azúcar de 66-68 g/L, una temperatura de 37 °C y un pH inicial de 6.5. Así mismo se agregaron 15 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y vitaminas. En general, se observó una disminución rápida del total de azúcares y un incremento en la concentración de ácido láctico y biomasa en las primeras 40 horas en las fermentaciones por *L. casei* y por *L. plantarum*. Así mismo se observó después de este tiempo el inicio de la fase estacionaria, en donde las concentraciones de azúcares, ácido láctico y biomasa se mantienen constantes. Consecuentemente ambas fueron fermentaciones satisfactorias de melaza de caña de azúcar.

Los modelos cinéticos que se plantearon para describir el crecimiento microbiano, producción de ácido láctico y consumo de sustrato son de tipo no estructurado, ya que estos no toman en cuenta algunos aspectos básicos de la estructura celular como su función y composición, y ninguna caracterización fisiológica de las células, considerando únicamente concentración celular total. Estos modelos han sido empleados previamente para describir el comportamiento de las fermentaciones de ácido láctico con un rango amplio de medios y condiciones.

El modelo cinético que se planteó para describir el crecimiento bacteriano de *L. casei* y *L. plantarum* en la fermentación de melaza, está basado en el modelo de Nandasana y Kumar (2007), el cual modifica el modelo de Monod, tomando en cuenta la limitación de la fuente de carbono, e incluyendo fenómenos de inhibición por el sustrato y un decaimiento exponencial para la inhibición del producto. Así mismo, se agregó el término de la ecuación logística para describir tanto la fase exponencial como la fase estacionaria. Se determinó que la tasa específica de crecimiento máxima tiene un valor de 2.38 h⁻¹ y 0.620 h⁻¹ para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente. A la vez se determinó que la constante de afinidad es de 3.44 g/L y 46.0 g/L para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente. La constante de afinidad indica que entre más cercano el valor a cero, mayor es la afinidad por el sustrato. Lo cual indica que *L. casei* posee una mayor afinidad por los azúcares de la melaza, que *L. plantarum*.

Durante las primeras horas de fermentación se observa una fase de latencia o lag prolongada, esto puede atribuirse a que el sustrato estaba compuesto mayormente por sacarosa, la cual es más difícil de metabolizar puesto a que requiere un paso más para ser incorporado a glucólisis. A su vez, ese fenómeno podría indicar una posible inhibición por sustrato en la fase exponencial. Se determinó que constante de inhibición del sustrato (k_i) encontrada para el crecimiento de la biomasa es de 8.24 g/l y 59.79 g/L para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente, lo que sugiere que la inhibición significativa ocurriría para la concentración de azúcar superior a estos valores. Esto implica que el efecto de la inhibición del sustrato sobre

el crecimiento de la biomasa tiene un efecto significativo en las fermentaciones llevadas a cabo.

El incremento en la concentración de ácido láctico presente en el medio de cultivo provoca la disipación del gradiente de protones que se mantiene a través de la membrana celular. Las bacterias requieren energía de mantenimiento para regular este gradiente de pH. Si la energía se vuelve insuficiente, el crecimiento de bacterias se detiene debido a la inhibición del producto. Se observó que el crecimiento de biomasa y la producción de ácido láctico se vio afectada por esta inhibición. Ya que, a pesar de que en el medio aún se encontraba una cantidad significativa de sustrato (34.3 g/L y 43.9 g/L, para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente), tanto la concentración de biomasa como de ácido láctico, llegaron a un punto estable. La inhibición del producto es causada tanto por el ácido láctico no disociado como por el disociado. El mecanismo de inhibición del crecimiento por ácido láctico se describe por el mecanismo de inhibición de los ácidos orgánicos débiles, el cual está relacionado con la solubilidad de la forma no disociada dentro del citoplasma y la insolubilidad de la forma disociada. Esto provoca la acidificación del citoplasma y el colapso de la fuerza motriz del protón, lo que da como resultado la inhibición del transporte de nutrientes. La energía ganada por la producción de lactato ya no está disponible para el crecimiento celular, sino que se utiliza por completo para mantener la homeostasis del pH y se produce autólisis de la célula por la alta concentración de ácido láctico. El ácido láctico se disocia casi por completo a pH 6 o superior. La toma de datos experimentales no fue a pH controlado, cuando se observa la inhibición el pH se encontraba en 3.9-4.0, por lo que se infiere que la inhibición del producto se debe al ácido láctico no disociado. Los valores determinados para la constante de inhibición por producto (k_p) son de 14.04 g/L y 36.49 g/L para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente. La inhibición es evidente a partir de valores significativos, teniendo un efecto mucho mayor en *L. plantarum*. Aunque se han reportado valores de inhibición por la concentración de ácido láctico para *L. plantarum* de 66.53 g/L.

Para la producción de ácido láctico se utilizó nuevamente el modelo Nandasana y Kumar (2007), el cual modifica el modelo de Luedeking-Piret para la producción de ácido láctico asociada y no asociada al crecimiento, con términos de limitación de la fuente de carbono, fenómenos de inhibición por el sustrato y un decaimiento exponencial para la inhibición del producto. Tanto la ecuación de producción de ácido láctico como la ecuación de Monod poseen los mismos términos de limitación de sustrato e inhibición por producto y sustrato. Esto se debe a que el modelo utilizado asume, con fines de simplificación, que cuando la absorción de azúcar se ve afectada por una baja concentración de azúcar, la tasa de producción de ácido láctico se ve afectada de la misma manera; cuando la absorción de azúcar es inhibida por el azúcar en altas concentraciones, la producción de ácido láctico se inhibe de la misma manera; y la concentración de ácido láctico inhibe el consumo de azúcar y la producción de ácido láctico de la misma manera.

Los valores determinados para los coeficientes de producción asociada al crecimiento y no asociada son de 5.55 g/L y 7.69 g/(L*h) para *L. casei* y 4.02 g/L y 11.4 g/(L*h) para *L. plantarum*, respectivamente. Estos coeficientes indican que la tasa de producción de ácido láctico es alta durante la fase asociada con el crecimiento, pero la cantidad de producción que tiene lugar durante la fase estacionaria es mayor. La relación A/B en este trabajo es de 0.72 y 0.36 para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente, mientras que se han reportado relaciones de 4.0 y 2.7 empleando melaza, indicando que la

producción de ácido láctico es mayor en la fase exponencial. El pequeño valor de la relación A/B obtenido en esta investigación indica la independencia casi total de la tasa de producción de ácido láctico de la tasa de crecimiento. Las bacterias producen ácido láctico proporcionalmente a la concentración, sin depender de su fase de crecimiento (Monteagudo *et al.*, 1997).

La ecuación que describe la tasa de utilización de sustrato se obtuvo de Dutta *et al.* (1996), esta considera tanto la conversión de sustrato en producto y biomasa como el consumo de sustrato para mantener el crecimiento de la biomasa. Así mismo se agregó un factor matemático como ajuste de aceleración del consumo de azúcar. Este factor matemático posee dos constantes “a” y “k” que se determinaron con valores de -4.0 y -0.31 para *L. casei* y -4.7 y -0.45 para *L. plantarum*, respectivamente. La corrección con este factor matemático permite la aceleración de consumo de sustrato al inicio de la fermentación, puesto a que hay una mayor cantidad de sustrato, hay un mayor consumo de este.

Los valores experimentales utilizados para ajustar el modelo al consumo de sustrato corresponden a la sumatoria de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa en el tiempo, esto debido a que en ambas bacterias se observó un consumo significativo de los tres azúcares durante todo el tiempo de fermentación, sin observar un comportamiento triaúxico. *L. casei* consumió glucosa y fructosa a un ritmo similar, debido a la isomerización espontánea entre sí, mientras que *L. plantarum* utilizó la glucosa a un ritmo mayor que la fructosa; y en ambos casos la sacarosa se consumió a un ritmo menor. Aunque como era de esperarse, la glucosa fue el azúcar que se consumió en mayor cantidad, en su totalidad en la fermentación por *L. casei* y a un 90% por *L. plantarum*.

El coeficiente de mantenimiento celular se determinó con un valor de 0.04 g/(g*h) y 0.01 g/(g*h) para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente. Al iterar distintos valores para este coeficiente y modificar el modelo cinético, no se observaron cambios, por lo que se infiere que este no tiene un efecto significativo en el modelo. Finalmente, se determinaron los rendimientos instantáneos de biomasa y producto sobre el consumo de sustrato. Los valores obtenidos para Y_{XS} corresponden a 0.278 y 0.975 g/g y para Y_{PS} de 4.23 y 2.02 g/g para *L. casei* y *L. plantarum* respectivamente. Como se observa el rendimiento de producto es mucho mayor que el rendimiento de biomasa sobre sustrato, indicando que la fermentación favoreció la producción de ácido láctico. Los valores elevados de Y_{PS} pueden deberse a invertasas intracelulares capaces de hidrolizar la sacarosa para su posterior consumo. Debe considerarse que los valores mencionados corresponden a un rendimiento instantáneo, que toma en cuenta la cantidad de producto, biomasa y sustrato en diferentes momentos de la fermentación, a diferencia de los rendimientos globales mencionados anteriormente en referencia a los experimentos relacionados a la hidrólisis de melaza y concentración de melaza y extracto de levadura, que solamente toma en cuenta el inicio y final de la fermentación; generando esto las diferencias entre los rendimientos expuestos.

Como fuentes de error pueden mencionarse el método de cuantificación de microorganismos que se realizó mediante biomasa seca, dado a que esta no representa únicamente a las células vivas, sino también considera las células

muertas y otros componentes del medio, a pesar de que este fue lavado con agua destilada. Mas se dificulta la cuantificación de microorganismos por otros métodos como densidad óptica o equipos de alta sensibilidad para conteo microbiano dada la coloración oscura de la melaza. Por otro lado, la alta viscosidad de la melaza también puede representar una fuente de error, ya que esta obstaculiza la transferencia de masa entre los sistemas sustrato-microorganismo y producto-microorganismo.

IX. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron mayores rendimientos globales de producción de ácido láctico y biomasa sobre sustrato empleando melaza no invertida, teniendo la hidrólisis de melaza como método de pretratamiento un efecto negativo en estos. Empleando una concentración de melaza no invertida de 170 g/L se obtuvo un rendimiento global de producción de ácido láctico de 0.8876 g/g, mientras que el mayor rendimiento global alcanzado utilizando una concentración de melaza invertida de 120 g/L fue de 0.7974 g/g para *L. casei*. En el caso de *L. plantarum* empleando una concentración de melaza no invertida de 170 g/L se obtuvo un rendimiento global de producción de ácido láctico de 0.8576 g/g, mientras que el mayor rendimiento global alcanzado utilizando una concentración de melaza invertida de 170 g/L fue de 0.6777 g/g.
2. La concentración de melaza de caña de azúcar y extracto de levadura en el medio de cultivo de fermentación ácido-láctica por *L. casei* y *L. plantarum* demostraron tener un efecto significativo en el rendimiento de producto y biomasa sobre sustrato, puesto a que estos variaban al cambiar la composición del medio. La máxima concentración de ácido láctico alcanzada después de 144 horas por *L. casei* fue de 23.31 g/L con un rendimiento global de 0.6914 g/g empleando un medio compuesto por 170 g/L de melaza no invertida y 15 g/L de extracto de levadura. Mientras que para *L. plantarum* fue de 23.33 g/L con un rendimiento global de 0.8576 g/g empleando la misma composición de medio.
3. Se planteó para cada bacteria un modelo cinético de fermentación de melaza de caña de azúcar que describe el crecimiento microbiano, la producción de ácido láctico y el consumo de azúcares totales en el tiempo (ver ecuaciones 6, 7, 8 y 9 de la sección de resultados); basado en el modelo de Monod y el modelo de Luedeking-Piret incluyendo términos de limitación de la fuente de carbono, fenómenos de inhibición por el sustrato y un decaimiento exponencial para la inhibición del producto. Determinando los valores de las constantes cinéticas como tasa máxima de crecimiento específica (μ_{max}), 2.37 h⁻¹ y 0.619 h⁻¹; constante de afinidad al sustrato (k_s), 3.44 g/L y 46.0 g/L; constante de inhibición por sustrato (k_s), 8.24 y 59.8 g/L; constante de inhibición por producto (k_p), 14.0 y 36.5 g/L; constante asociada al crecimiento para la producción de ácido láctico (α), 5.55 y 4.02 g/g; y constante no asociada al crecimiento para la producción de ácido láctico (β) 7.69 y 11.4 g/(g*h) para *L. casei* y *L. plantarum*, respectivamente.

X. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere evaluar la hidrólisis de la sacarosa de melaza de caña de azúcar empleando invertasa o β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26). Ya que la hidrólisis ácida y térmica puede generar la formación de hidroximetil-furfural y otros compuestos inhibidores. Así mismo, la hidrólisis de sacarosa aumenta la disponibilidad de glucosa en el medio, el cual es el sustrato preferido para la mayoría de los *Lactobacillus*.
2. Realizar un estudio comparativo a nivel laboratorio de fermentación de melaza para la producción de ácido láctico empleando otras fuentes de nitrógeno de bajo costo como proteína de suero de queso y licor de maíz fermentado, mediante la suplementación del medio de melaza con una concentración de proteína equivalente a 1.5 % (m/v) de extracto de levadura. Puesto a que las bacterias ácido-lácticas son microorganismos fastidiosos que requieren una fuente de proteína y vitaminas para su crecimiento y el extracto de levadura, comúnmente empleado, posee un elevado costo y se ha reportado que puede representar hasta el 38% de los costos de producción de ácido láctico.
3. Evaluar la suplementación de melaza de caña de azúcar con sales como acetato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, citrato de amonio, fosfato de potasio y Tween 80, que podrían incrementar la producción de ácido láctico y crecimiento celular ya que actúan como cofactores en la ruta metabólica de las bacterias ácido-lácticas.
4. Realizar un estudio de fermentación de melaza de caña de azúcar empleando un diseño experimental de tipo factorial para evaluar concentraciones de CaCO_3 de 1, 3, 5, 7 y 9 % (m/v) para evitar la caída de pH mientras se produce ácido láctico en la fermentación. Los *Lactobacillus* poseen un crecimiento óptimo a un pH entre 6.0 y 7.0, mantener el pH adicionando CaCO_3 podría incrementar la producción de ácido láctico y crecimiento celular al disminuir la inhibición por producto.
5. Evaluar la fermentación de melaza de caña de azúcar en modo lote alimentado, añadiendo el sustrato de forma parcial y progresiva durante el tiempo de fermentación. La fermentación por lote es el método más utilizado industrialmente, sin embargo una de sus principales limitantes es la alta concentración de azúcares al inicio de la fermentación, ya que esta puede provocar la inhibición de microorganismo por sustrato.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abdur, S., Kumar, P., Vo, D., Devaraj, K., Mani, Y., Devaraj, T., y Subramanian, S. (2021). Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 539-556.

Abedi, E., y Hashemi, S. (2020). Lactic acid production—producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), e04974.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2010). *Biología molecular de la célula*. 5a ed. España: Ediciones Omega, S. A.

Altioik, D., Tokatli, F., y Harsa, Ş. (2006). Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology y Biotechnology: International Research in Process, Environmental y Clean Technology*, 81(7), 1190-1197.

Anaya, O., y López, T. (2018). Diseño de una biorrefinería sostenible para la producción de ácido láctico a partir de melaza de caña de azúcar. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 243-259.

Berkeley Madonna. (2022). Extraído de: <https://berkeley-madonna.myshopify.com/pages/features>

Calderón, J. (2017). *Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de Lactobacillus Acidophilus en la fermentación de sustrato complejo*. [Tesis de grado]. Fundación Universidad de América.

CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar). (2020). *Informe Anual 2018-2019*. Guatemala. 174 p.

CENGICAÑA. (2014). *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. Guatemala: Librerías Artemis Edinter, S.A.

CENGICAÑA. (2020). *Memoria. Presentación de resultados de investigación. Zafra 2019-2020*. Guatemala. 529 p.

Coelho, L., De Lima, C., Rodovalho, C., Bernardo, M., y Contiero, J. (2011). Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 27-36.

Dutta, S., Mukherjee, A., y Chakraborty, P. (1996). Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: simulation and modelling. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(4), 410–413.

Fu, W., y Mathews, A. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3(3), 163–170.

Gaenzle, M. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.

García, C., Arrázola, G., y Durango, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios*, 15(2): 9-26

Gil, R., Domínguez, R., y Pacho, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnología, ciencia, educación*, 23(2), 79-90.

Gomes, G. R., Rampon, D. S., y Ramos, L. P. (2017). Production of 5-(hydroxymethyl)-furfural from water-soluble carbohydrates and sugarcane molasses. *Applied Catalysis A: General*, 545, 127–133.

Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., y Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. *Frontiers in microbiology*, 2107.

Jeri, L. (2015). Estudio comparativo de la eficiencia de fermentación en melaza clarificada y melaza sin clarificar en la producción del alcohol etílico. [Tesis de grado]. Universidad Nacional “Pedro Ruíz Gallo”.

Kotzamanidis, C., Roukas, T., y Skaracis, G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 441-448.

Liu, M., Bayjanov, J., Renckens, B., Nauta, A., y Siezen, R. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC genomics*, 11(1), 1-15.

Méndez, T. (2020). *Diseño conceptual y análisis de factibilidad tecno-económica de una biorrefinería a partir de melaza de caña de azúcar*. [Tesis doctoral, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. Repositorio UMSNH.

Micheo, M. (2021). *Determinación de las condiciones óptimas experimentales de un proceso de hidrólisis catalizada por la enzima invertasa en la producción de mieles invertidas de caña de azúcar a fin de obtener una miel de alta pureza a nivel laboratorio*. [Tesis doctoral]. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Munilla, M., y Carracedo, G. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39(1), 49-59.

Rolz, E. et al. (2011). Informe Final: *Obtención de ácido láctico a partir de la caña de azúcar*. PROYECTO FODECYT No. 003-2008. Guatemala.

- Serna, L., y Albán, F. (2003). Ácido poliláctico (PLA): Propiedades y aplicaciones. *Ingeniería y competitividad*, 5(1), 16-26.
- Serna-Cock, L., y Stouvenel, A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte biotechnological production of lactic acid: state of the art produccion biotecnologica de acido lactico: estado do arte. *CYTA-Journal of Food*, 5(1), 54-65.
- Shuler, M., y Kargi., F. (2002). *Biprocess engineering. Basic concepts*. 2a ed. USA: Prentice Hall PTR
- Siezen, R., y van Hylckama Vlieg, J. E. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial cell factories*, 10(1), 1-13.
- Singh, R. (2005). Hybrid membrane systems—applications and case studies. *Hybrid Membrane Systems for Water Purification*, 3, 131-196.
- Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. (2014). *Fundamentos de química analítica*. 9ª ed. México: Cengage Learning.
- Thakur, A., Panesar, P., y Saini, M. (2019). Optimization of process parameters and estimation of kinetic parameters for lactic acid production by *Lactobacillus casei* MTCC 1423. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 9(2), 253-266.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Vidra, A., Tóth, A., y Németh, Á. (2017). Lactic acid production from cane molasses. *Waste Treatment and Recovery*, 2(1), 13-16.
- Villagómez, M. P. M., Lalaleo, Y. A. M., Luis, J., Páez, V., González, F. E. J., Moscoso, S. X. A., y Montero, C. G. V. (2020). El ciclo celular, sus mecanismos de regulación y reparación, indispensables para el mantenimiento de la vida. *Revista científica digital INSPILIP Código ISSN, 2588, 0551*.
- Waldir, E., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., y Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista peruana de biología*, 14(2), 271-276.
- Wee, Y., Kim, J., Yun, J., y Ryu, H. (2004). Utilization of sugar molasses for economical l(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6-7), 568–573.
- Zhang, Y., Vadlani, P. V., Kumar, A., Hardwidge, P. R., Govind, R., Tanaka, T., y Kondo, A. (2016). Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(1), 279-288.

XII. ANEXOS

A. DATOS ORIGINALES

Cuadro 10. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y *L. casei*

Sistema	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. casei</i>	0.027	0.064	0.034	1.053
Melaza 120 g/L	2.057	0.446	0.517	0.022
Melaza 170 g/L	2.868	0.754	0.788	0.033
Melaza 220 g/L	3.01	0.852	0.817	0.036
MA1	1.886	0.104	0.074	0.845
MA2	1.864	0.102	0.079	0.896
MA3	1.816	0.088	0.089	0.876
MB1	2.023	0.427	0.115	1.081
MB2-1	2.086	0.314	0.102	1.154
MB2-2	2.008	0.275	0.106	1.009
MB2-3	2.045	0.275	0.109	1.253
MB3	2.107	0.498	0.142	1.277
MC1	2.399	0.462	0.166	1.016
MC2	2.212	0.485	0.121	1.012
MC3	2.223	0.438	0.115	1.159

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 11. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y *L. plantarum*

Sistema	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0.029	0.197	0	0.785
MA1	1.807	0.194	0.096	0.955
MA2	1.69	0.19	0.087	0.949
MA3	1.717	0.189	0.087	0.991
MB1	2.426	0.18	0.345	1.116
MB2-1	2.416	0.185	0.32	1.153
MB2-2	2.321	0.327	0.213	1.276
MB2-3	2.581	0.25	0.123	1.352
MB3	2.784	0.139	0.139	1.305
MC1	2.591	0.412	0.522	1.067
MC2	2.811	0.387	0.49	0.953
MC3	2.773	0.421	0.475	1.023

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 12. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y *L. casei*

Sistema	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. casei</i>	0	0.029	0.016	0.692
Melaza invertida 120 g/L	0.174	1.57	1.741	0.113
Melaza invertida 170 g/L	0.236	2.258	2.684	0.137
Melaza invertida 220 g/L	0.291	2.36	2.971	0.121
MHA1	0.106	0.665	1.133	0.815
MHA2	0.164	0.576	1.043	0.954
MHA3	0.168	0.568	1.02	1.048
MHB1	0.181	1.336	1.668	0.828
MHB2-1	0.17	1.435	1.718	0.941
MHB2-2	0.157	1.406	1.701	0.973
MHB2-3	0.162	1.437	1.714	1.001
MHB3	0.231	1.36	1.661	1.01
MHC1	0.241	1.434	1.804	0.898
MHC2	0.234	1.402	1.797	1.049
MHC3	0.242	1.424	1.782	1.108

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 13. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y *L. plantarum*

Sistema	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0	0.008	0.014	0.807
Melaza invertida 120 g/L	0.254	1.57	1.741	0.113
Melaza invertida 170 g/L	0.296	2.258	2.684	0.137
Melaza invertida 220 g/L	0.391	2.36	2.971	0.121
MHA1	0.135	0.526	1.172	1.107
MHA2	0.172	0.509	1.163	1.216
MHA3	0.189	0.478	1.12	1.232
MHB1	0.284	1.791	2.151	0.905
MHB2-1	0.279	1.565	2.017	0.951
MHB2-2	0.294	1.489	2.01	1.101
MHB2-3	0.262	1.44	1.909	0.89
MHB3	0.107	1.307	1.903	1.234
MHC1	0.262	1.479	2.156	1.182
MHC2	0.282	1.272	2.081	1.522
MHC3	0.302	1.285	2.079	1.507

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 14. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y *L. casei*

Muestra	Masa (± 0.00001 g)	
	Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. casei</i>	11.445	11.4185
Melaza 120 g/L	11.4681	11.4526
Melaza 170 g/L	10.1081	10.0902
Melaza 220 g/L	9.6658	9.6289
MA1	10.0652	9.9753
MA2	9.2271	9.1459
MA3	9.7407	9.63
MB1	10.1338	10.0214
MB2-1	10.3092	10.1536
MB2-2	10.1498	10.0038
MB2-3	9.9845	9.8439
MB3	10.1996	10.0655
MC1	10.4558	10.3337
MC2	11.6004	11.4523
MC3	10.5273	10.4077

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra.

Cuadro 15. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza no hidrolizada y *L. plantarum*

Muestra	Masa (± 0.00001 g)	
	Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. plantarum</i>	9.3746	9.3151
MA1	9.203	9.1022
MA2	10.2522	10.1567
MA3	10.3184	10.2155
MB1	10.2735	10.1717
MB2-1	11.6601	11.5484
MB2-2	10.3151	10.2025
MB2-3	11.518	11.417
MB3	9.8139	9.6854
MC1	10.2202	10.0688
MC2	10.3013	10.1521
MC3	10.2408	10.123

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra.

Cuadro 16. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y *L. casei*

Muestra	Masa (± 0.00001 g)	
	Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. casei</i>	9.9753	9.9186
Melaza invertida 120 g/L	10.1921	10.1523
Melaza invertida 170 g/L	10.0477	9.8614
Melaza invertida 220 g/L	10.0014	9.8834
MHA1	10.065	9.9787
MHA2	9.2334	9.1518
MHA3	9.7474	9.6328
MHB1	10.1559	9.926
MHB2-1	10.3227	10.1592
MHB2-2	10.1738	10.0072
MHB2-3	10.0138	9.846
MHB3	10.237	10.068
MHC1	10.4536	10.3375
MHC2	11.6186	11.456
MHC3	10.4845	10.3106

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra.

Cuadro 17. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca del diseño factorial empleando melaza hidrolizada y *L. plantarum*

Muestra	Masa (± 0.00001 g)	
	Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. plantarum</i>	10.1878	10.1362
Melaza invertida 120 g/L	10.1921	10.1523
Melaza invertida 170 g/L	10.0477	9.8614
Melaza invertida 220 g/L	10.0014	9.8834
MHA1	10.0235	9.9041
MHA2	10.2611	10.1354
MHA3	10.1125	9.9732
MHB1	9.484	9.3192
MHB2-1	10.3237	10.1441
MHB2-2	10.165	9.9804
MHB2-3	10.282	10.0919
MHB3	10.2718	10.0456
MHC1	10.068	9.9124
MHC2	10.1738	9.9845
MHC3	10.3329	10.1307

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra.

Cuadro 18. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de *L. casei*

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. casei</i>	0	0.009	0.410	0.061	0.316
Melaza 170 g/L	0	2.062	0.650	0.606	0.034
1	4	1.923	0.529	0.487	0.333
2	11	1.703	0.508	0.483	0.299
3	24	1.666	0.281	0.378	0.822
4	35	1.633	0	0.33	1.021
5	48	1.624	0	0.209	1.128
6	59	1.648	0	0.137	1.238
7.1	72	1.59	0	0.08	1.267
7.2	72	1.661	0	0.1	1.34
7.3	72	1.669	0	0.082	1.323
8	83	1.632	0	0.083	1.322
9	100	1.615	0	0.082	1.379
10	144	1.648	0	0.183	1.385

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 19. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de *L. casei* – duplicado

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. casei</i>	0	0.016	0.340	0.076	0.017
Melaza 170 g/L	0	2.123	0.565	0.677	0.033
1	4	1.804	0.492	0.559	0.034
2	11	1.651	0.392	0.074	0.27
3	24	1.563	0	0.379	0.873
4	35	1.534	0	0.324	0.964
5	48	1.566	0	0.351	0.92
6	59	1.451	0	0.162	1.134
7	72	1.37	0	0.061	1.079
8	83	1.498	0	0.195	1.189
9.1	100	1.512	0	0.259	1.061
9.2	100	1.507	0	0.068	1.241
9.3	100	1.474	0	0.072	1.234
10	144	1.471	0.201	0.208	1.326

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 20. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de *L. plantarum*

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0	0.026	0.423	0.061	0.357
Melaza 170 g/L	0	2.034	0.628	0.597	0.033
1	4	1.643	0.411	0.171	0.1
2	11	1.762	0.458	0.201	0.172
3	24	1.538	0.256	0.22	0.181
4	35	0.215	0.118	0.383	0.509
5	48	0.256	0.267	0.342	0.925
6	59	0.193	0.221	0.174	1.197
7.1	72	0.491	0.254	0.295	1.164
7.2	72	0.268	0.209	0.276	1.220
7.3	72	0.278	0.212	0.228	1.193
8	83	0.262	0.108	0.273	1.242
9	100	0.353	0.186	0.137	1.372
10	144	0.264	0.115	0.146	1.317

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 21. Concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido láctico de las muestras para modelo cinético de *L. plantarum* – duplicado

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.0001 %m/v)			
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0	0.029	0.396	0.069	0.353
Melaza 170 g/L	0	2.135	0.567	0.547	0.03
1	4	1.736	0.523	0.486	0.135
2	11	1.753	0.486	0.481	0.227
3	24	1.869	0	0.408	0.845
4	35	1.839	0	0.355	0.996
5	48	1.888	0	0.379	0.982
6	59	1.872	0	0.362	1.033
7	72	1.805	0	0.348	1.015
8	83	1.758	0	0.377	0.938
9.1	100	1.82	0	0.359	1.047
9.2	100	1.801	0	0.385	0.968
9.3	100	1.858	0	0.379	1.036
10	144	1.897	0	0.441	1.035

Valores obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cuadro 22. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de *L. casei*

Muestra	Tiempo	Masa (± 0.00001 g)	
		Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. casei</i>	0	9.7597	9.7361
Melaza 170 g/L	0	10.4701	10.4475
1	4	9.1643	9.1419
2	11	10.2267	10.2011
3	24	10.2072	10.1261
4	35	10.2402	10.1516
5	48	10.1605	10.0698
6	59	10.1843	10.0798
7.1	72	10.3533	10.2478
7.2	72	10.2013	10.101
7.3	72	10.307	10.2052
8	83	9.3152	9.2095
9	100	10.2275	10.1298
10	144	10.1426	10.0382

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra.

Cuadro 23. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de *L. casei* – duplicado

Muestra	Tiempo	Masa (± 0.00001 g)	
		Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. casei</i>	0	10.1328	10.1212
Melaza 170 g/L	0	10.1763	10.1561
1	4	10.1547	10.1367
2	11	10.1756	10.1472
3	24	10.1381	10.0495
4	35	10.2375	10.1468
5	48	10.0746	9.9834
6	59	10.0115	9.9
7	72	9.9626	9.8613
8	83	10.0773	9.978
9.1	100	10.0009	9.9111
9.2	100	9.988	9.8849
9.3	100	10.1929	10.0944
10	144	9.4128	9.3192

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra.

Cuadro 24. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de *L. plantarum*

Muestra	Tiempo	Masa (± 0.00001 g)	
		Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0	9.7412	9.7177
Melaza 170 g/L	0	9.7433	9.7231
1	4	10.188	10.1649
2	11	10.1712	10.1475
3	24	11.4438	11.4198
4	35	11.6063	11.5506
5	48	9.7913	9.6862
6	59	10.4805	10.3874
7.1	72	10.3921	10.3164
7.2	72	10.2776	10.1798
7.3	72	9.4715	9.3735
8	83	10.2037	10.0995
9	100	10.3202	10.2233
10	144	11.5583	11.456

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra

Cuadro 25. Masa de tubo y tubo con muestra para determinación de biomasa seca para modelo cinético de *L. plantarum* – duplicado

Muestra	Tiempo	Masa (± 0.00001 g)	
		Tubo con muestra	Tubo
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0	9.1704	9.1474
Melaza 170 g/L	0	9.3985	9.3726
1	4	10.0945	10.0701
2	11	11.5743	11.5486
3	24	9.7823	9.7127
4	35	11.4956	11.4169
5	48	10.1966	10.129
6	59	9.909	9.8432
7	72	10.0845	10.0215
8	83	10.1243	10.0669
9.1	100	10.0421	9.9742
9.2	100	10.2124	10.1536
9.3	100	10.0712	10.005
10	144	10.0405	9.9784

Valores obtenidos mediante peso seco de 40 mL de muestra

Cuadro 26. pH de muestras para modelo cinético de *L. casei*

Muestra	Tiempo	pH (± 0.005)
1	4	4.64
2	11	4.62
3	24	4.61
4	35	4.61
5	48	4.46
6	59	3.82
7.1	72	3.78
7.2	72	3.76
7.3	72	3.77
8	83	3.76
9	100	3.73
10	144	3.73

Los datos fueron medidos con un potenciómetro de mano.

Cuadro 27. pH de muestras para modelo cinético de *L. casei* – duplicado

Muestra	Tiempo	pH (± 0.005)
1	4	5.99
2	11	5.28
3	24	3.99
4	35	3.92
5	48	3.9
6	59	3.75
7	72	3.73
8	83	3.73
9.1	100	3.75
9.2	100	3.71
9.3	100	3.7
10	144	3.67

Los datos fueron medidos con un potenciómetro de mano.

Cuadro 28. pH de muestras para modelo cinético de *L. plantarum*

Muestra	Tiempo	pH (± 0.005)
1	4	4.87
2	11	4.8
3	24	4.73
4	35	4.72
5	48	4.71
6	59	3.89
7.1	72	3.78
7.2	72	3.78
7.3	72	3.78
8	83	3.76
9	100	3.76
10	144	3.72

Los datos fueron medidos con un potenciómetro de mano.

Cuadro 29. pH de muestras para modelo cinético de *L. plantarum* – duplicado

Muestra	Tiempo	pH (± 0.005)
1	4	6.32
2	11	5.75
3	24	4.2
4	35	4.01
5	48	4.01
6	59	3.95
7	72	3.93
8	83	3.96
9.1	100	3.89
9.2	100	3.93
9.3	100	3.93
10	144	3.94

Los datos fueron medidos con un potenciómetro de mano.

B. DATOS CALCULADOS

Cuadro 30. Concentración de azúcares y ácido láctico de inóculos y melaza para fermentación por *L. casei* y *L. plantarum* de melaza no hidrolizada

Muestra	Concentración (± 0.002 g/L)			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inoculo <i>L. casei</i>	0.058	0.394	0.000	1.570
Inoculo <i>L. plantarum</i>	0.054	0.128	0.068	2.106
Melaza 120 g/L	41.140	8.920	10.340	0.440
Melaza 170 g/L	57.360	15.080	15.760	0.660
Melaza 220 g/L	60.200	17.040	16.340	0.720

Cuadro 31. Concentración de azúcares y ácido láctico de inóculos y melaza para fermentación por *L. casei* de melaza hidrolizada

Muestra	Concentración (± 0.002 g/L)			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inoculo <i>L. casei</i>	0.000	0.058	0.032	1.384
Melaza hidrolizada 120 g/L	3.480	25.120	27.856	1.808
Melaza hidrolizada 170 g/L	4.720	36.128	42.944	2.192
Melaza hidrolizada 220 g/L	5.820	37.760	47.536	1.936

Las concentraciones de azúcares, ácido láctico y biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 respectivamente

Cuadro 32. Concentración de azúcares y ácido láctico de inóculos y melaza para fermentación por *L. plantarum* de melaza hidrolizada

Muestra	Concentración (± 0.002 g/L)			
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico
Inoculo <i>L. plantarum</i>	0.000	0.016	0.028	1.614
Melaza hidrolizada 120 g/L	5.080	31.400	34.820	2.260
Melaza hidrolizada 170 g/L	5.920	45.160	53.680	2.740
Melaza hidrolizada 220 g/L	7.820	47.200	59.420	2.420

Las concentraciones de azúcares, ácido láctico y biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 respectivamente

Cuadro 33. Biomasa seca de inóculos y melaza para fermentación por *L. casei* y *L. plantarum* de melaza no hidrolizada

Muestra	Biomasa seca ($\pm 1 * 10^{-5}$ g)	Biomasa seca (g/L)	Incertidumbre (\pm g/L)
Inoculo <i>L. casei</i>	0.027	0.066	0.004
Inoculo <i>L. plantarum</i>	0.059	0.149	0.009
Melaza 120 g/L	0.015	0.310	0.019
Melaza 170 g/L	0.018	0.358	0.022
Melaza 220 g/L	0.037	0.738	0.046

La concentración de biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 para el inóculo y la melaza, respectivamente.

Cuadro 34. Biomasa seca de inóculo y melaza para fermentación por *L. casei* de melaza hidrolizada

Muestra	Biomasa seca ($\pm 1 * 10^{-5}$ g)	Biomasa seca (g/L)	Incertidumbre (\pm g/L)
Inoculo <i>L. casei</i>	0.057	0.142	0.009
Melaza hidrolizada 120 g/L	0.040	0.796	0.050
Melaza hidrolizada 170 g/L	0.186	3.726	0.233
Melaza hidrolizada 220 g/L	0.118	2.360	0.148

La concentración de biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 para el inóculo y la melaza, respectivamente.

Cuadro 35. Biomasa seca de inóculo y melaza para fermentación por *L. plantarum* de melaza hidrolizada

Muestra	Biomasa seca ($\pm 1 * 10^{-5}$ g)	Biomasa seca (g/L)	Incertidumbre (\pm g/L)
Inoculo <i>L. plantarum</i>	0.052	0.139	0.009
Melaza hidrolizada 120 g/L	0.040	0.796	0.050
Melaza hidrolizada 170 g/L	0.186	3.726	0.233
Melaza hidrolizada 220 g/L	0.118	2.360	0.148

La concentración de biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 para el inóculo y la melaza, respectivamente.

Cuadro 36. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza no hidrolizada empleando *L. casei*

Sistema	Cambio de concentración (± 0.003 g/L)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
MA1	3.478	7.234	8.860
MA2	1.918	7.274	8.760
MA3	4.878	7.554	8.560
MB1	16.958	6.934	13.460
MB2	15.698	9.194	13.720
MB3	15.278	7.514	13.320
MC1	10.278	5.034	9.020
MC2	16.018	7.734	13.920
MC3	15.798	8.674	14.040
MAB2-2	17.258	9.974	13.640
MAB2-3	16.518	9.974	13.580

El cambio de concentración de azúcares corresponde a la diferencia entre la concentración de azúcares al final de la fermentación y la suma de concentración de azúcares de la melaza empleada y el inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 37. Biomasa seca en fermentación de melaza no hidrolizada empleando *L. casei*

Muestra	Biomasa seca ($\pm 1 * 10^{-5}$ g)	Concentración de biomasa seca	Incertidumbre (\pm g/L)	Cambio de concentración de biomasa seca (g/L)	Incertidumbre (\pm g/L)
MA1	0.090	2.248	0.140	1.871	0.142
MA2	0.081	2.030	0.127	1.654	0.128
MA3	0.111	2.767	0.173	2.391	0.174
MB1	0.112	2.810	0.176	2.386	0.177
MB2	0.156	3.890	0.243	3.466	0.244
MB3	0.134	3.353	0.210	2.928	0.211
MC1	0.122	3.052	0.191	2.248	0.196
MC2	0.148	3.703	0.231	2.898	0.236
MC3	0.120	2.990	0.187	2.186	0.193
MAB2-2	0.146	3.650	0.228	3.226	0.229
MAB2-3	0.141	3.515	0.220	3.091	0.221

El cambio de concentración de biomasa seca corresponde a la diferencia entre la concentración de biomasa al final de la fermentación y la concentración de biomasa del inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 38. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza no hidrolizada empleando *L. plantarum*

Sistema	Cambio de concentración (± 0.003 g/L)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
MA1	5.054	5.168	8.488
MA2	7.394	5.248	8.668
MA3	6.854	5.268	8.668
MB1	8.894	11.608	8.928
MB2	9.094	11.508	9.428
MB3	1.734	12.428	13.048
MC1	8.434	8.928	5.968
MC2	4.034	9.428	6.608
MC3	4.794	8.748	6.908
MAB2-2	10.994	8.668	11.568
MAB2-3	5.794	10.208	13.368

El cambio de concentración de azúcares corresponde a la diferencia entre la concentración de azúcares al final de la fermentación y la suma de concentración de azúcares de la melaza empleada y el inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 39. Biomasa seca en fermentación de melaza no hidrolizada empleando *L. plantarum*

Muestra	Biomasa seca ($\pm 1 \cdot 10^{-5}$ g)	Concentración de biomasa seca	Incertidumbre (\pm g/L)	Cambio de concentración de biomasa seca (g/L)	Incertidumbre (\pm g/L)
MA1	0.101	2.520	0.158	2.061	0.159
MA2	0.095	2.387	0.149	1.929	0.151
MA3	0.103	2.573	0.161	2.114	0.162
MB1	0.102	2.545	0.159	2.038	0.161
MB2	0.112	2.792	0.175	2.286	0.176
MB3	0.113	2.815	0.176	2.308	0.178
MC1	0.151	3.785	0.237	2.898	0.241
MC2	0.149	3.730	0.233	2.843	0.238
MC3	0.118	2.945	0.184	2.058	0.190
MAB2-2	0.101	2.525	0.158	2.018	0.160
MAB2-3	0.129	3.213	0.201	2.706	0.202

El cambio de concentración de biomasa seca corresponde a la diferencia entre la concentración de biomasa al final de la fermentación y la concentración de biomasa del inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 40. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza hidrolizada empleando *L. casei*

Sistema	Cambio de concentración (± 0.003 g/L)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
MHA1	1.360	11.878	5.228
MHA2	0.200	13.658	7.028
MHA3	0.120	13.818	7.488
MHB1	1.100	9.466	9.616
MHB2-1	1.320	7.486	8.616
MHB2-2	1.580	8.066	8.956
MHB2-3	1.480	7.446	8.696
MHB3	0.100	8.986	9.756
MHC1	1.000	9.138	11.488
MHC2	1.140	9.778	11.628
MHC3	0.980	9.338	11.928

El cambio de concentración de azúcares corresponde a la diferencia entre la concentración de azúcares al final de la fermentación y la suma de concentración de azúcares de la melaza empleada y el inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 41. Biomasa seca en fermentación de melaza hidrolizada empleando *L. casei*

Muestra	Biomasa seca ($\pm 1 \cdot 10^{-5}$ g)	Concentración de biomasa seca	Incertidumbre (\pm g/L)	Cambio de concentración de biomasa seca (g/L)	Incertidumbre (\pm g/L)
MHA1	0.086	2.157	0.135	1.220	0.144
MHA2	0.082	2.040	0.128	1.102	0.137
MHA3	0.115	2.865	0.179	1.927	0.186
MHB1	0.230	5.748	0.359	1.880	0.428
MHB2-1	0.163	4.087	0.255	0.220	0.346
MHB2-2	0.167	4.165	0.260	0.297	0.349
MHB2-3	0.168	4.195	0.262	0.327	0.351
MHB3	0.169	4.225	0.264	0.357	0.352
MHC1	0.116	2.902	0.181	0.401	0.234
MHC2	0.163	4.065	0.254	1.563	0.294
MHC3	0.174	4.347	0.272	1.846	0.309

El cambio de concentración de biomasa seca corresponde a la diferencia entre la concentración de biomasa al final de la fermentación y la concentración de biomasa del inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 42. Cambio de concentración de azúcares en fermentación de melaza hidrolizada empleando *L. plantarum*

Sistema	Cambio de concentración (± 0.003 g/L)		
	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
MHA1	2.380	20.896	11.408
MHA2	1.640	21.236	11.588
MHA3	1.300	21.856	12.448
MHB1	0.240	9.356	10.688
MHB2-1	0.340	13.876	13.368
MHB2-2	0.040	15.396	13.508
MHB2-3	0.680	16.376	15.528
MHB3	3.780	19.036	15.648
MHC1	2.580	17.636	16.328
MHC2	2.180	21.776	17.828
MHC3	1.780	21.516	17.868

El cambio de concentración de azúcares corresponde a la diferencia entre la concentración de azúcares al final de la fermentación y la suma de concentración de azúcares de la melaza empleada y el inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 43. Biomasa seca en fermentación de melaza hidrolizada empleando *L. plantarum*

Muestra	Biomasa seca ($\pm 1 \cdot 10^{-5}$ g)	Concentración de biomasa seca	Incertidumbre (\pm g/L)	Cambio de concentración de biomasa seca (g/L)	Incertidumbre (\pm g/L)
MHA1	0.119	2.985	0.187	2.050	0.193
MHA2	0.126	3.143	0.196	2.207	0.203
MHA3	0.139	3.483	0.218	2.547	0.223
MHB1	0.165	4.120	0.258	0.255	0.347
MHB2-1	0.180	4.490	0.281	0.625	0.365
MHB2-2	0.185	4.615	0.288	0.750	0.371
MHB2-3	0.190	4.752	0.297	0.887	0.378
MHB3	0.226	5.655	0.353	1.790	0.423
MHC1	0.156	3.890	0.243	1.391	0.285
MHC2	0.189	4.732	0.296	2.233	0.331
MHC3	0.202	5.055	0.316	2.556	0.349

La concentración de biomasa seca corresponde a la diferencia entre la concentración de biomasa al final de la fermentación y la concentración de biomasa del inóculo, correspondiente al inicio de la fermentación.

Cuadro 44. Consumo de sustrato por fermentación empleando *L. casei* a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada

Sistema	Consumo de sustrato en fermentación (% m/m)							
	Sacaro sa	Incertidumbre (±)	Gluco sa	Incertidumbre (±)	Fructo sa	Incertidumbre (±)	Totale s	Incertidumbre (±)
MA1	8.44%	0.01%	77.67 %	0.04%	85.69 %	0.03%	32.16 %	0.01%
MA2	9.51%	0.01%	78.10 %	0.04%	84.72 %	0.03%	32.79 %	0.01%
MA3	11.84 %	0.01%	81.10 %	0.04%	82.79 %	0.03%	34.50 %	0.01%
MB1	29.53 %	0.01%	44.81 %	0.02%	85.41 %	0.02%	42.133 %	0.004%
MB2	27.83 %	0.01%	46.62 %	0.02%	84.81 %	0.02%	41.238 %	0.004%
MB3	26.61 %	0.01%	35.63 %	0.02%	81.98 %	0.02%	38.027 %	0.003%
MC1	20.38 %	0.01%	47.00 %	0.02%	79.68 %	0.02%	35.618 %	0.003%
MC2	26.58 %	0.01%	44.36 %	0.02%	85.19 %	0.02%	40.063 %	0.003%
MC3	26.22 %	0.01%	49.75 %	0.02%	85.92 %	0.02%	40.956 %	0.003%
MHA 1	39.08 %	0.09%	47.18 %	0.01%	18.75 %	0.01%	32.657 %	0.005%
MHA 2	5.75%	0.09%	54.25 %	0.01%	25.20 %	0.01%	36.936 %	0.005%
MHA 3	3.45%	0.09%	54.88 %	0.01%	26.85 %	0.01%	37.891 %	0.005%
MHB 1	23.31 %	0.06%	26.16 %	0.01%	22.38 %	0.01%	24.060 %	0.004%
MHB 2	30.93 %	0.06%	21.18 %	0.01%	20.37 %	0.01%	21.318 %	0.004%
MHB 3	2.12%	0.06%	24.83 %	0.01%	22.70 %	0.01%	22.463 %	0.004%
MHC 1	17.18 %	0.05%	24.16 %	0.01%	24.15 %	0.01%	23.711 %	0.003%
MHC 2	19.59 %	0.05%	25.86 %	0.01%	24.45 %	0.01%	24.720 %	0.003%
MHC 3	16.84 %	0.05%	24.69 %	0.01%	25.08 %	0.01%	24.391 %	0.003%

Cuadro 45. Consumo de sustrato por fermentación empleando *L. plantarum* a partir de melaza hidrolizada y melaza no hidrolizada

Sistema	Consumo de sustrato en fermentación (% m/m)							
	Sacarosa	Incertidumbre (±)	Glucosa	Incertidumbre (±)	Fructosa	Incertidumbre (±)	Totales	Incertidumbre (±)
MA1	12.27%	0.01%	55.49%	0.03%	82.09%	0.03%	30.75%	0.01%
MA2	17.95%	0.01%	56.35%	0.03%	83.83%	0.03%	35.02%	0.01%
MA3	16.64%	0.01%	56.56%	0.03%	83.83%	0.03%	34.16%	0.01%
MB1	15.49%	0.01%	75.02%	0.02%	56.65%	0.02%	33.197%	0.003%
MB2	15.84%	0.01%	74.37%	0.02%	59.82%	0.02%	33.874%	0.003%
MB3	3.02%	0.01%	80.32%	0.02%	82.79%	0.02%	30.693%	0.003%
MC1	14.00%	0.01%	51.21%	0.02%	36.52%	0.02%	24.811%	0.003%
MC2	6.69%	0.00%	54.08%	0.02%	40.44%	0.02%	21.344%	0.003%
MC3	7.96%	0.00%	50.18%	0.02%	42.28%	0.02%	21.748%	0.003%
MH A1	46.85%	0.06%	66.51%	0.01%	32.74%	0.01%	48.615%	0.004%
MH A2	32.28%	0.06%	67.60%	0.01%	33.25%	0.01%	48.307%	0.004%
MH A3	25.59%	0.06%	69.57%	0.01%	35.72%	0.01%	49.905%	0.004%
MH B1	63.85%	0.80%	42.14%	0.01%	29.14%	0.01%	36.701%	0.005%
MH B2	43.58%	0.37%	39.04%	0.01%	30.40%	0.01%	34.869%	0.004%
MH B3	36.82%	0.03%	48.20%	0.01%	33.19%	0.01%	39.869%	0.003%
MH C1	32.99%	0.04%	37.35%	0.01%	27.47%	0.01%	31.921%	0.003%
MH C2	27.88%	0.04%	46.12%	0.01%	29.99%	0.01%	36.498%	0.003%
MH C3	22.76%	0.04%	45.57%	0.01%	30.06%	0.01%	35.956%	0.003%

Cuadro 46. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por *L. casei* para modelo cinético

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.002 g/L)				Biomasa seca g/L	Incertidumbre biomasa seca (\pm g/L)
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico		
Inóculo <i>L. casei</i>	0	0.002	0.082	0.012	0.063	0.006	0.004
Melaza 170 g/L	0	41.240	13.000	12.120	0.680	0.362	0.028
1	4	38.460	10.580	9.740	6.660	0.108	0.040
2	11	34.060	10.160	9.660	5.980	0.188	0.045
3	24	33.320	5.620	7.560	16.440	1.576	0.128
4	35	32.660	0.000	6.600	20.420	1.763	0.140
5	48	32.480	0.000	4.180	22.560	1.815	0.143
6	59	32.960	0.000	2.740	24.760	2.160	0.165
7.1	72	31.800	0.000	1.600	25.340	2.186	0.166
7.2	72	33.220	0.000	2.000	26.800	2.055	0.158
7.3	72	33.380	0.000	1.640	26.460	2.093	0.160
8	83	32.640	0.000	1.660	26.440	2.191	0.166
9	100	32.300	0.000	1.640	27.580	1.990	0.154
10	144	32.960	0.000	3.660	27.700	2.158	0.164

Las concentraciones de azúcares, ácido láctico y biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 respectivamente.

Cuadro 47. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por *L. casei* para modelo cinético - duplicado

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.002 g/L)				Biomasa seca g/L	Incertidumbre biomasa seca (\pm g/L)
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico		
Inóculo <i>L. casei</i>	0	0.003	0.068	0.015	0.003	0.003	0.002
Melaza 170 g/L	0	42.460	11.300	13.540	0.422	0.323	0.025
1	4	36.080	9.840	11.180	0.680	0.046	0.035
2	11	33.020	7.840	1.480	5.400	0.306	0.049
3	24	31.260	0.000	7.580	17.460	1.811	0.140
4	35	30.680	0.000	6.480	19.280	1.864	0.143
5	48	31.320	0.000	7.020	18.400	1.876	0.144
6	59	29.020	0.000	3.240	22.680	2.384	0.175
7	72	27.400	0.000	1.220	21.580	2.129	0.160
8	83	29.960	0.000	3.900	23.780	2.079	0.156
9.1	100	30.240	0.000	5.180	21.220	1.841	0.142
9.2	100	30.140	0.000	1.360	24.820	2.174	0.162
9.3	100	29.480	0.000	1.440	24.680	2.059	0.155
10	144	29.420	4.020	4.160	26.520	1.936	0.148

Las concentraciones de azúcares, ácido láctico y biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 respectivamente.

Cuadro 48. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por *L. plantarum* para modelo cinético

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.002 g/L)				Biomasa seca g/L	Incertidumbre biomasa seca (\pm g/L)
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico		
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0	0.052	0.846	0.122	0.714	0.059	0.004
Melaza 170 g/L	0	40.680	12.560	11.940	0.660	0.404	0.025
1	4	32.860	8.220	3.420	2.000	0.174	0.041
2	11	35.240	9.160	4.020	3.440	0.189	0.042
3	24	30.760	5.120	4.400	3.620	0.196	0.043
4	35	4.300	2.360	7.660	10.180	0.989	0.089
5	48	5.120	5.340	6.840	18.500	2.224	0.165
6	59	3.860	4.420	3.480	23.940	1.924	0.147
7.1	72	9.820	5.080	5.900	23.280	1.489	0.120
7.2	72	5.360	4.180	5.520	24.400	2.041	0.154
7.3	72	5.560	4.240	4.560	23.860	2.046	0.154
8	83	5.240	2.160	5.460	24.840	2.201	0.164
9	100	7.060	3.720	2.740	27.440	2.019	0.153
10	144	5.280	2.300	2.920	26.340	2.154	0.161

Las concentraciones de azúcares, ácido láctico y biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 respectivamente.

Cuadro 49. Concentración de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por *L. plantarum* para modelo cinético - duplicado

Muestra	Tiempo	Concentración (± 0.002 g/L)				Biomasa seca g/L	Incertidumbre biomasa seca (\pm g/L)
		Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Ácido Láctico		
Inóculo <i>L. plantarum</i>	0	0.006	0.079	0.014	0.071	0.006	0.004
Melaza 170 g/L	0	42.700	11.340	10.940	0.384	0.414	0.032
1	4	34.720	10.460	9.720	2.700	0.092	0.043
2	11	35.060	9.720	9.620	4.540	0.124	0.045
3	24	37.380	0.000	8.160	16.900	1.222	0.111
4	35	36.780	0.000	7.100	19.920	1.449	0.125
5	48	37.760	0.000	7.580	19.640	1.172	0.108
6	59	37.440	0.000	7.240	20.660	1.127	0.105
7	72	36.100	0.000	6.960	20.300	1.057	0.100
8	83	35.160	0.000	7.540	18.760	0.917	0.092
9.1	100	36.400	0.000	7.180	20.940	1.180	0.108
9.2	100	36.020	0.000	7.700	19.360	0.952	0.094
9.3	100	37.160	0.000	7.580	20.720	1.137	0.105
10	144	37.940	0.000	8.820	20.700	1.034	0.099

Las concentraciones de azúcares, ácido láctico y biomasa del inóculo y de melaza se corrigieron con el factor de dilución 0.1 y 0.8 respectivamente.

Cuadro 50. Concentración promedio de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por *L. casei* para modelo cinético

Muestra	Tiempo	Azúcares totales (g/L)	Desviación estándar	Ácido láctico (g/L)	Desviación estándar	Biomasa seca (g/L)	Desviación estándar
Inóculo <i>L. casei</i>	0	0.912	0.270	0.333	0.077	0.044	0.020
Melaza 170 g/L	0	66.830	0.962	0.604	0.087	0.428	0.065
1	4	57.940	1.674	3.670	0.107	0.077	0.002
2	11	48.110	1.390	5.690	0.166	0.247	0.008
3	24	42.670	1.233	16.950	0.494	1.693	0.054
4	35	38.210	1.104	19.850	0.579	1.813	0.057
5	48	37.500	1.084	20.480	0.597	1.846	0.059
6	59	33.980	0.982	23.720	0.692	2.272	0.072
7	72	33.065	0.956	25.045	0.730	2.116	0.067
8	83	34.080	0.985	25.110	0.732	2.135	0.068
9	100	33.215	0.960	24.295	0.709	2.042	0.065
10	144	35.100	1.014	27.110	0.791	2.047	0.065

Cuadro 51. Concentración promedio de azúcares, ácido láctico y biomasa seca de fermentación de melaza por *L. plantarum* para modelo cinético

Muestra	Tiempo	Azúcares totales (g/L)	Desviación estándar	Ácido láctico (g/L)	Desviación estándar	Biomasa seca (g/L)	Desviación estándar
Inóculo <i>L.</i> <i>plantarum</i>	0	1.004	0.436	0.710	0.081	0.058	0.052
Melaza 170 g/L	0	65.080	0.936	0.570	0.092	0.461	0.065
1	4	49.700	0.715	2.350	0.055	0.133	0.015
2	11	51.410	0.740	3.990	0.094	0.156	0.017
3	24	42.910	0.617	10.260	0.241	0.709	0.079
4	35	29.100	0.419	15.050	0.354	1.219	0.136
5	48	31.320	0.451	19.070	0.448	1.698	0.189
6	59	28.220	0.406	22.300	0.524	1.525	0.170
7	72	23.320	0.336	22.960	0.539	1.658	0.185
8	100	27.780	0.400	21.800	0.512	1.559	0.174
9	100	36.600	0.527	21.220	0.499	1.329	0.148
10	144	28.630	0.412	23.520	0.553	1.594	0.178

C. MUESTRA DE CÁLCULOS

Cálculo 1. Corrección de concentración de azúcares y ácido láctico

$$\frac{1.886 \pm 0.0001 \text{ g}}{100 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} * 2 = 37.72 \pm 0.002 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Se utilizaron los datos de los cuadros 10, 11, 12, 13, 18, 19, 20 y 21 para corregir la concentración de azúcares y ácido láctico a la dimensional deseada. Se multiplica por 2 debido al factor de dilución empleado.

Cálculo 2. Porcentaje de hidrólisis

$$\frac{80.2 \pm 0.002 \frac{\text{g}}{\text{L}} - 6.82 \pm 0.002 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{80.2 \pm 0.002 \frac{\text{g}}{\text{L}}} * 100 = 91.50 \pm 0.42\%$$

Se utilizó la concentración promedio de sacarosa en una solución de melaza al 220 g/L antes y después de la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico.

Cálculo 3. Concentración de sólidos seco de melaza

$$\frac{11.4681 \pm 0.0001 \text{ g} - 11.4526 \pm 0.0001 \text{ g}}{40 \pm 2.5 \text{ mL} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}} * 0.8 = 0.3100 \pm 0.02 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Se utilizaron los datos correspondientes a melaza de los cuadros 14, 16, 17, 22, 23, 24 y 25. Se multiplica por 0.8 debido al factor de dilución de los sistemas de fermentación, se agregaron 80 mL de melaza para un volumen total de 100 mL de cultivo.

Cálculo 4. Concentración de biomasa seca de inóculo

$$\frac{11.4450 \pm 0.0001 \text{ g} - 11.4185 \pm 0.0001 \text{ g}}{40 \pm 2.5 \text{ mL} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}} * 0.1 = 0.06625 \pm 0.004 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Se utilizaron los datos correspondientes a inóculos de los cuadros 14, 16, 17, 22, 23, 24 y 25. Se multiplica por 0.1 debido al factor de dilución de los sistemas de fermentación, se agregaron 10 mL de inóculo para un volumen total de 100 mL de cultivo.

Cálculo 5. Concentración de biomasa seca de sistemas de fermentación

$$\frac{10.1547 \pm 0.0001 \text{ g biomasa seca en tubo} - 10.1367 \pm 0.0001 \text{ g tubo}}{40 \pm 2.5 \text{ mL} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}} - 0.404 \frac{\text{g melaza seca}}{\text{L}} = 0.046 \pm 0.03 \frac{\text{g biomasa seca}}{\text{L}}$$

Se utilizaron los datos de los cuadros 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24 y 25. Al valor de la biomasa seca del sistema de fermentación se resta el valor de sólidos secos de melaza para obtener la concentración real de biomasa seca real.

Cálculo 6. Cambio de concentración de biomasa seca en sistemas de fermentación

$$2.2475 \pm 0.14 \frac{g \text{ biomasa seca}}{L} - 0.06625 \pm 0.004 \frac{g \text{ biomasa seca}}{L} \\ = 1.871 \pm 0.14 \frac{g \text{ biomasa seca}}{L}$$

Se utilizaron los datos de los cuadros 37, 39, 41, 43, 33, 34, 35. A la concentración de biomasa seca se resta la concentración de biomasa seca del inóculo para obtener el cambio de esta durante la fermentación.

Cálculo 7. Consumo de azúcares en fermentación

$$45.16 \pm 0.002 \frac{g}{L} * 0.8 + 0.58 \pm 0.002 \frac{g}{L} * 0.1 - 13.3 \pm 0.002 \frac{g}{L} \\ = 11.878 \pm 0.003 \frac{g}{L}$$

A la suma de la concentración de azúcares de melaza y del inóculo cada uno multiplicado por el factor de dilución se resta la concentración de azúcares del sistema de fermentación.

Cálculo 8. Producción de ácido láctico en fermentación

$$16.3 \pm 0.002 \frac{g AL}{L} - \frac{2.26g}{L} \pm 0.002 * 0.8 - 13.84 \pm 0.002 \frac{g AL}{L} * 0.1 \\ = 13.108 \pm 0.003 \frac{g AL}{L}$$

A la concentración de ácido láctico del sistema de fermentación se resta la concentración de ácido láctico en la melaza y en el inóculo cada uno multiplicado por el factor de dilución

Cálculo 9. Coeficiente de rendimiento de ácido láctico sobre azúcares totales

$$Y_{P/S} = \frac{13.11 \pm 0.003 \frac{g}{L}}{18.466 \pm 0.005 \frac{g}{L}} = 0.7098 \pm 0.0002$$

Se utilizaron los datos de los cuadros 7, 8, 36, 38, 40, 42. Se dividió la producción de ácido láctico entre la sumatoria del consumo de sacarosa, glucosa y fructosa.

Cálculo 10. Coeficiente de rendimiento de crecimiento microbiano sobre azúcares totales

$$Y_{X/S} = \frac{1.21975 \pm 0.14 \frac{g}{L}}{18.466 \pm 0.005 \frac{g}{L}} = 0.06605 \pm 0.008$$

Se utilizaron los datos de los cuadros 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43. Se dividió el cambio de concentración de biomasa seca entre la sumatoria del consumo de sacarosa, glucosa y fructosa.

D. ANÁLISIS DE ERROR

Ecuación 10. Propagación de error de sumas y restas

$$S_y = \sqrt{S_a^2 + S_b^2 + \dots + S_i^2}$$

Donde:

S_y = Incertidumbre de resultado

S_y = Incertidumbre de cada medida (a, b, i...)

Ecuación 11. Propagación de error de multiplicaciones y divisiones

$$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\frac{S_a^2}{a} + \frac{S_b^2}{b} + \dots + \frac{S_i^2}{i}}$$

Donde:

S_y = Incertidumbre del resultado

y = Valor del resultado del cálculo

$a, b, i \dots$ = Valor de cada medida

S_i = Incertidumbre de cada medida (a, b, i...)

Ecuación 12. Desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_i^N (x_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Donde:

σ = Desviación estándar

N = Número de observaciones

x_i = Observación número i de la variable X

\bar{X} = Media de la variable

Cálculo 11. Incertidumbre de cambio de concentración de biomasa seca

$$S_y = \sqrt{(0.14 \text{ g})^2 + (0.004 \text{ g})^2} = \pm 0.14 \text{ g}$$

Se realizó este cálculo para determinar la incertidumbre del cambio de concentración de biomasa seca. Se realizaron cálculos similares para determinar la incertidumbre de resultados que implicaban sumas o restas.

Cálculo 12. Incertidumbre de rendimiento de ácido láctico sobre azúcares totales

$$S_{Y_{P/S}} = 0.7098 * \sqrt{\left(\frac{0.003 \frac{g}{L}}{13.11 \frac{g}{L}}\right)^2 + \left(\frac{0.005 \frac{g}{L}}{19.572 \frac{g}{L}}\right)^2} = \pm 0.0002$$

Se realizó este cálculo para determinar la incertidumbre del rendimiento de ácido láctico sobre azúcares totales. Se realizaron cálculos similares para determinar la incertidumbre de resultados que implicaban multiplicaciones y divisiones.

Cálculo 13. Desviación estándar de concentración de ácido láctico

$$\sigma = \sqrt{\frac{(25.3 - 26.2)^2 + (26.8 - 26.2)^2 + (26.4 - 26.2)^2}{3 - 1}} = 0.73$$

Se realizó un cálculo similar para determinar la desviación estándar de concentración total de azúcares, ácido láctico y biomasa.

E. DATOS DE REACTIVOS Y EQUIPO

1. Datos de reactivos

Cuadro 52. Melaza

Brix	85.20%
Densidad	12.065
Humedad (max)	17.0 a 20.0 %
Ceniza (max)	11.00%
Viscosidad	Uniforme, 3000 cps a 24 °C Uniforme, 3500 cps a 25 °C

Cuadro 53. Caldo MRS para lactobacilos

Reactivo	Caldo MRS para lactobacilos
Marca	CRITERION™
Condiciones de preparación (g de sólido/ L agua)	55
Temperatura de almacenamiento (°C)	2 - 8

Cuadro 54. Agar MRS

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

Cuadro 55. Extracto de levadura granulado

Reactivo	Extracto de levadura granulado
Marca	Merck
Solubilidad (g/L)	410
pH final (20 °C, 10 g/L en H ₂ O)	7
Temperatura de almacenamiento (°C)	25

Cuadro 56. Hidróxido de sodio

Reactivo	Hidróxido de sodio
Marca	Merck
Solubilidad (g/L)	1090
Pureza	97%
CAS	1310-73-2

Cuadro 57. Ácido clorhídrico fumante

Reactivo	Ácido clorhídrico fumante
Marca	EMSURE®
Pureza	37 - 38%
CAS	7647-01-0

2. Datos de equipo

Cuadro 58. Balanza de laboratorio

Equipo	Balanza de laboratorio
Marca	OHAUS
Modelo	CS 5000
Capacidad máxima (g)	5000
Incertidumbre (g)	± 0.1

Cuadro 59. Balanza analítica

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

Cuadro 60. Centrifugadora para tubos Falcon de 50 mL

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 61. Centrifugadora de capacidad de un 1L

Equipo	Centrifugadora
Marca	Sorvall
Modelo	RT7
Clasificación	115V - 60Hz - 12A
Velocidad máxima (rpm)	7000

Cuadro 62. Incubadora

Equipo	Incubadora
Marca	Imperial III
Modelo	310
Clasificación	120V - 50/60Hz - 5 A
Temperatura (°C)	Ambiente + 5 a 65
Control de temperatura (°C)	± 0.1

Cuadro 63. Incubadora con agitación

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

Cuadro 64. Horno de convección

Equipo	Horno de convección
Marca	VWR
Modelo	Symphony™
Clasificación	115V
Temperatura (° C)	Ambiente + 8 a 65
Control de temperatura (°C)	± 0.7

Cuadro 65. Potenciómetro

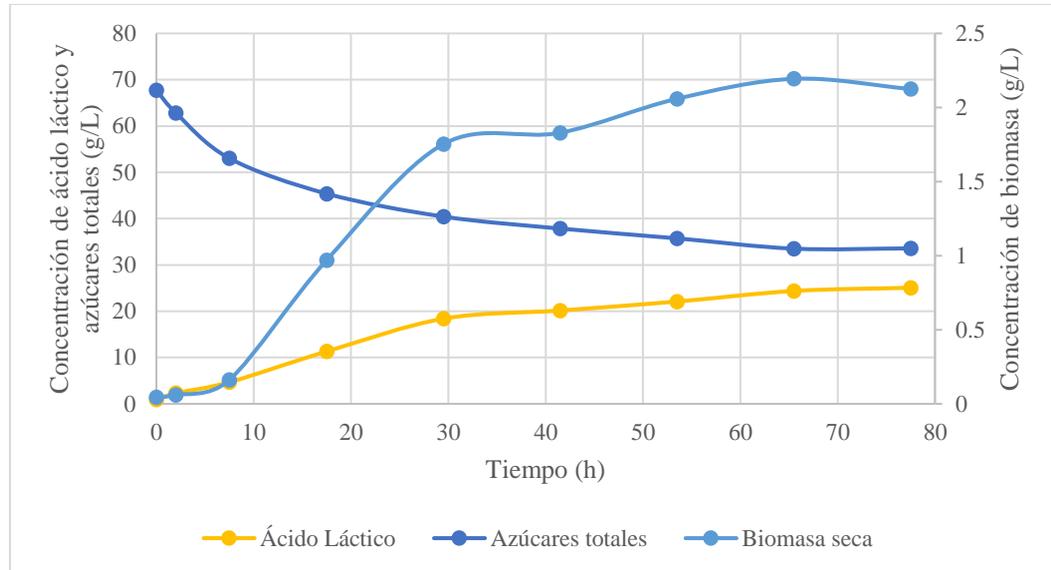
Equipo	Potenciómetro
Marca	OAKTON
Modelo	PCSTestr 35 multi-parameter
Rango	0.00 a 14.00 pH
Resolución	0.01 pH
Exactitud	± 0.01 pH

Cuadro 66. Información de equipo HPLC para análisis de concentración de azúcar

Equipo	Detector de índice de refracción P-1200
Marca	Agilent
Modelo	P-1200
Clasificación	100-120/220-240 V - 50/60 Hz

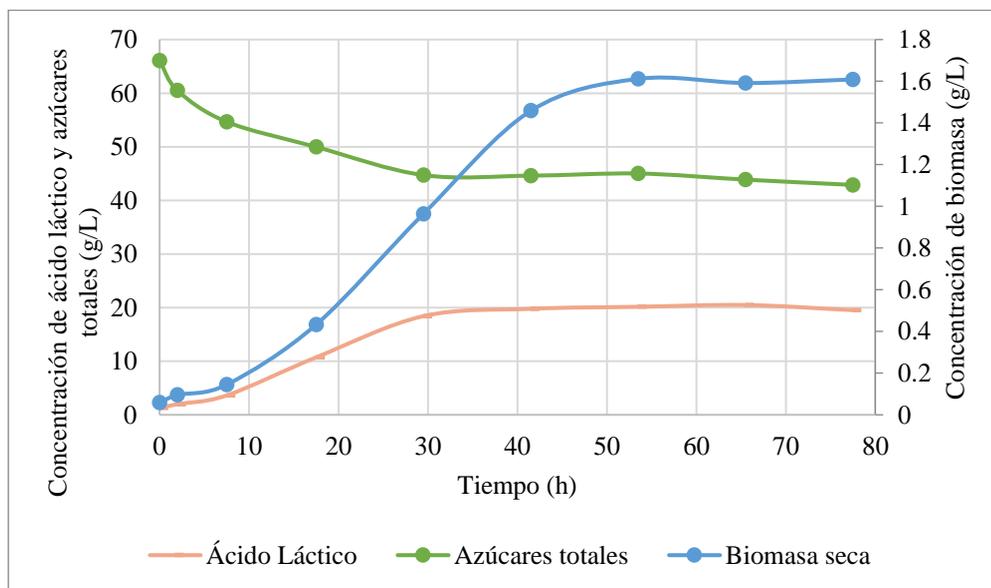
F. ILUSTRACIONES

Figura 26. Consumo de azúcares totales y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de *L. casei*



Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Composición del medio 170 g/L de melaza y 15 g/L de extracto de levadura.

Figura 27. Consumo de azúcares totales y producción de biomasa y ácido láctico en el tiempo para modelo cinético de *L. plantarum*



Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. Composición del medio 170 g/L de melaza y 15 g/L de extracto de levadura.

G. CURVAS DE CALIBRACIÓN HPLC

Figura 28. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de sacarosa

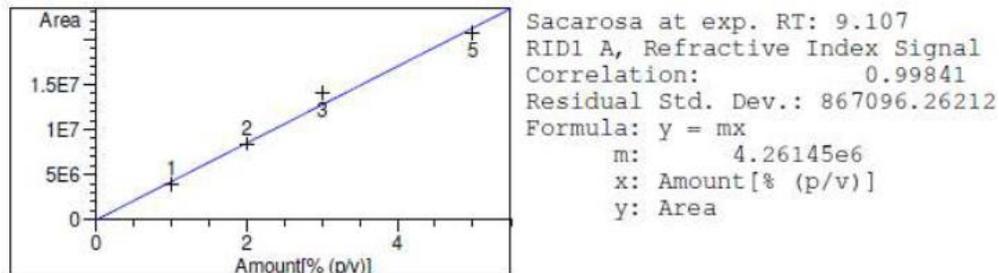


Figura 29. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de glucosa

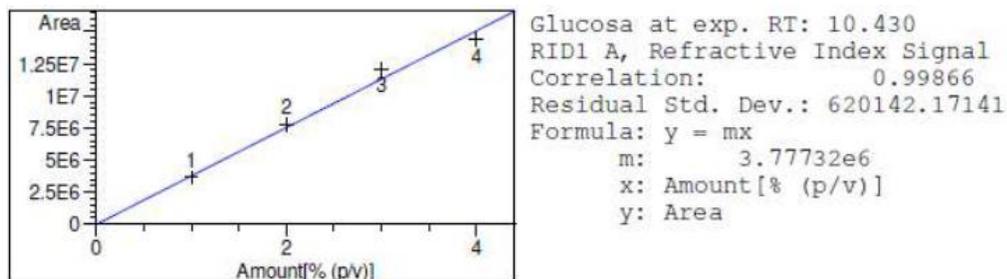


Figura 30. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de fructosa

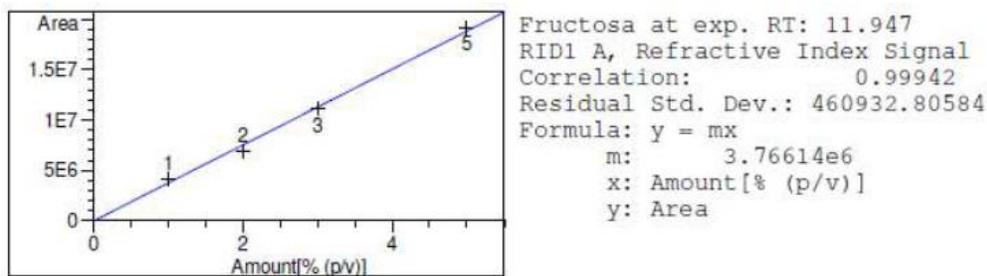
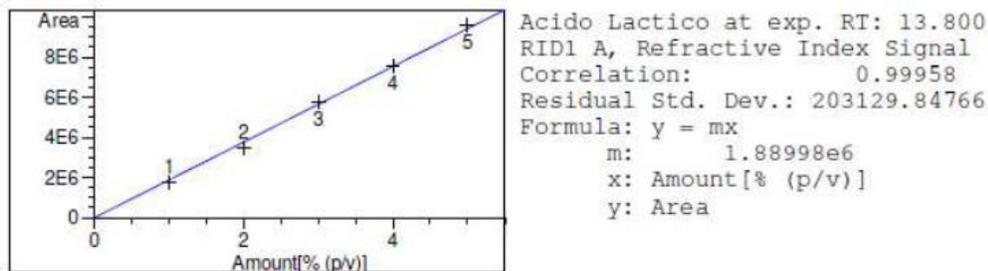
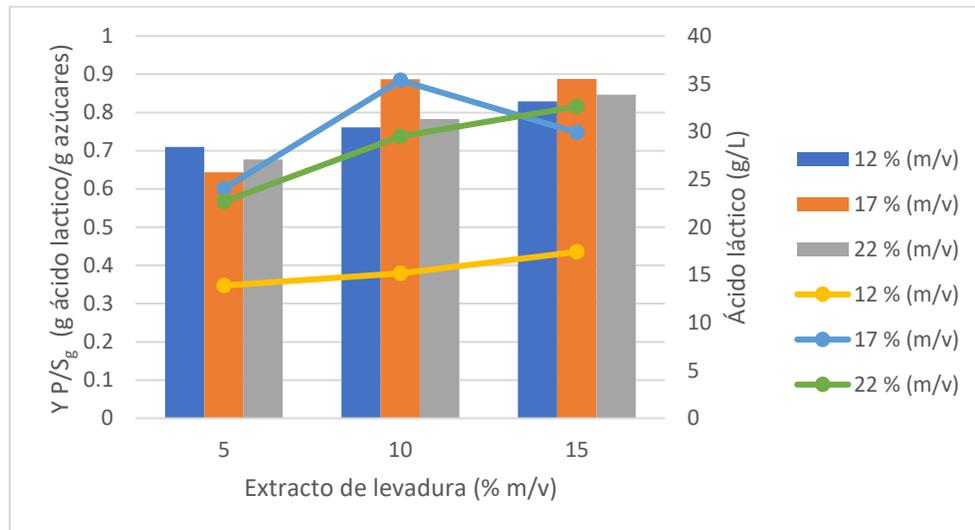


Figura 31. Curva de calibración de HPLC para la cuantificación de ácido láctico



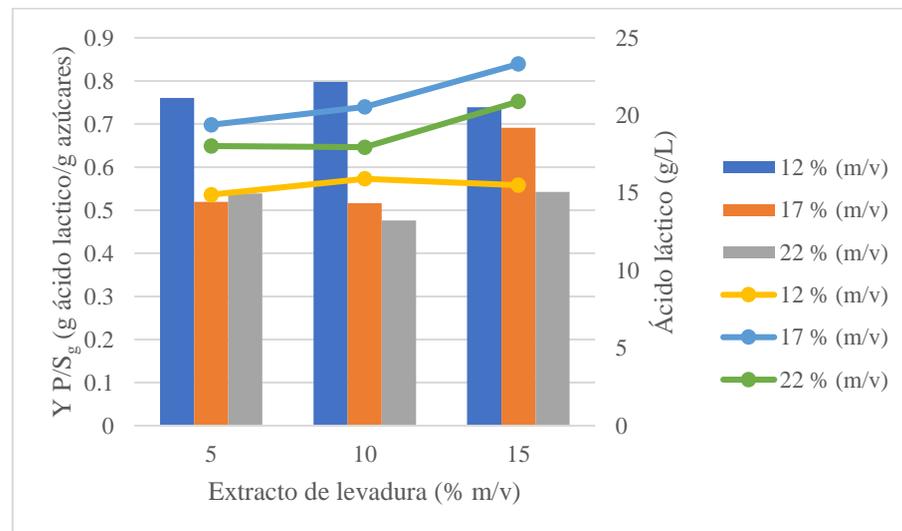
H. ANÁLISIS FACTORIAL

Figura 32. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando *L. casei* a partir melaza no hidrolizada.



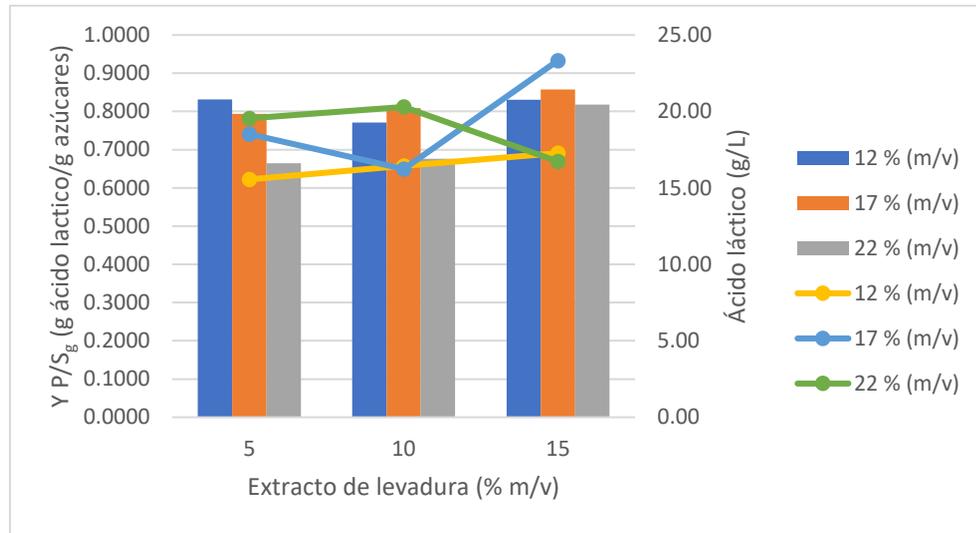
Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. La composición detallada del medio de cultivo puede observarse en el cuadro 5. Notación: $Y_{P/Sg}$ rendimiento global de producción de ácido láctico sobre el consumo de azúcares totales. Gráfica de barras enlazadas a eje izquierdo, líneas a eje derecho.

Figura 33. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando *L. casei* a partir melaza hidrolizada.



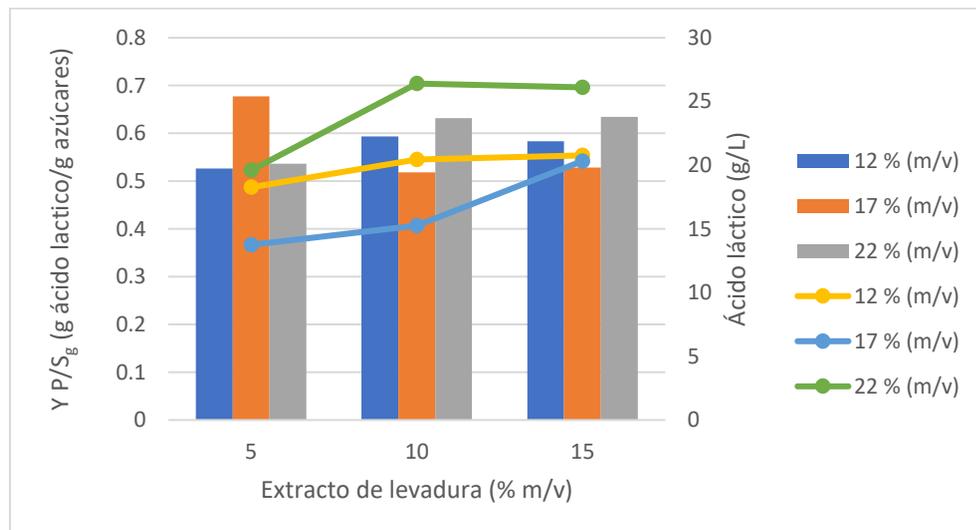
Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. La composición detallada del medio de cultivo puede observarse en el cuadro 5. Notación: $Y_{P/Sg}$ rendimiento global de producción de ácido láctico sobre el consumo de azúcares totales. Gráfica de barras enlazadas a eje izquierdo, líneas a eje derecho.

Figura 34. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando *L. plantarum* a partir melaza no hidrolizada.



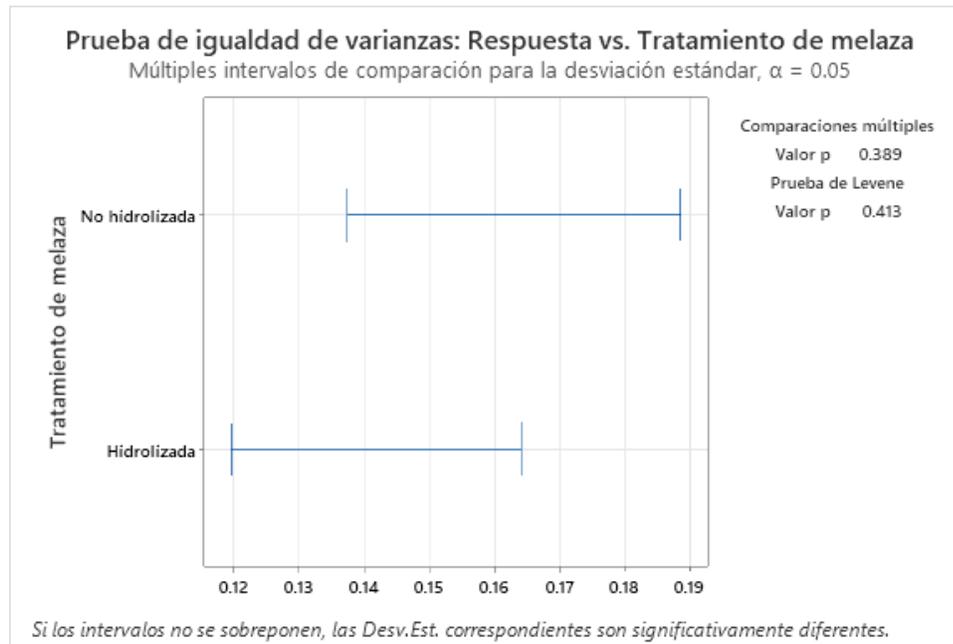
Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. La composición detallada del medio de cultivo puede observarse en el cuadro 5. Notación: Y_{p/S_g} rendimiento global de producción de ácido láctico sobre el consumo de azúcares totales. Gráfica de barras enlazadas a eje izquierdo, líneas a eje derecho.

Figura 35. Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura y de melaza en la producción de ácido láctico por fermentación empleando *L. plantarum* a partir melaza hidrolizada.



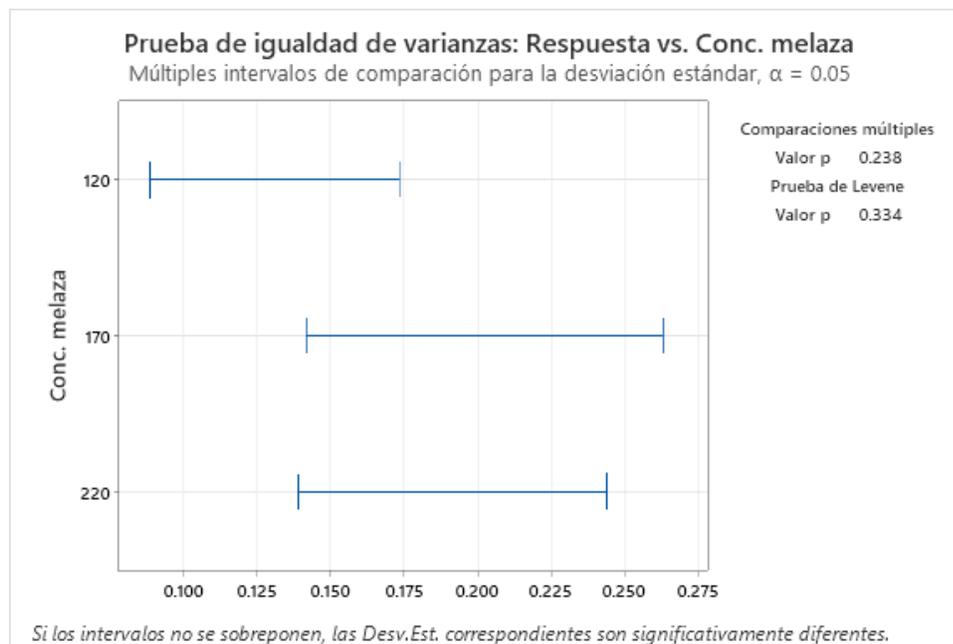
Fermentaciones realizadas a 37 °C y 150 rpm durante 144 horas. La composición detallada del medio de cultivo puede observarse en el cuadro 5. Notación: Y_{p/S_g} rendimiento global de producción de ácido láctico sobre el consumo de azúcares totales. Gráfica de barras enlazadas a eje izquierdo, líneas a eje derecho.

Figura 36. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Tratamiento de melaza, *L. casei*



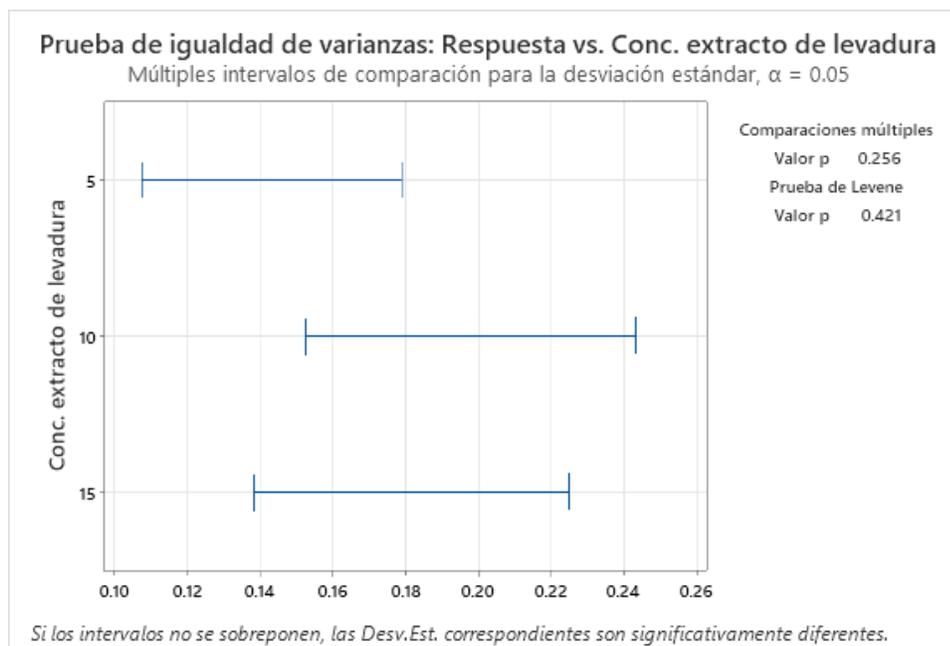
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 37. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de melaza, *L. casei*



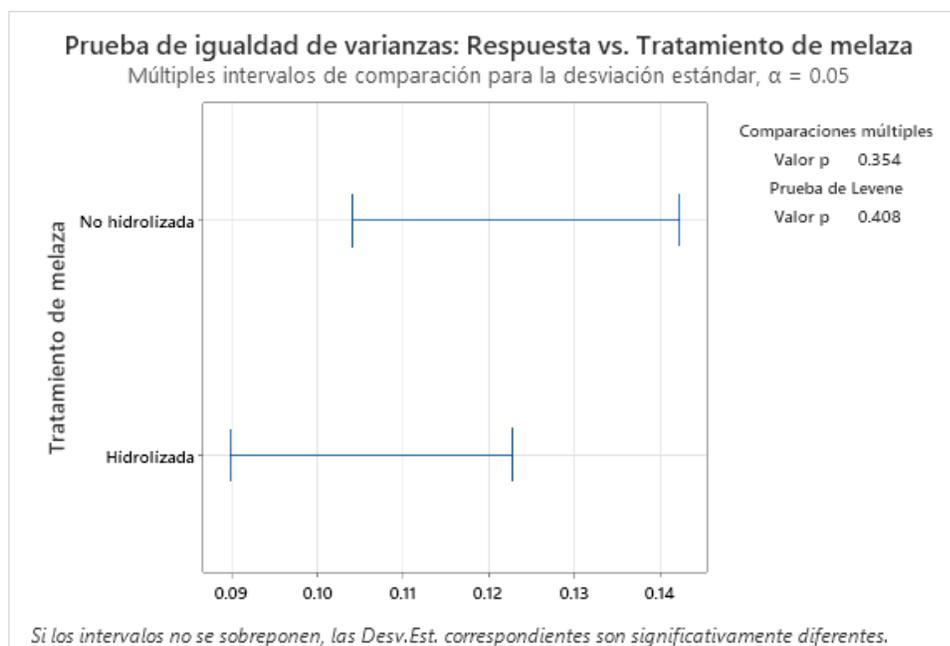
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 38. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de extracto de levadura, *L. casei*



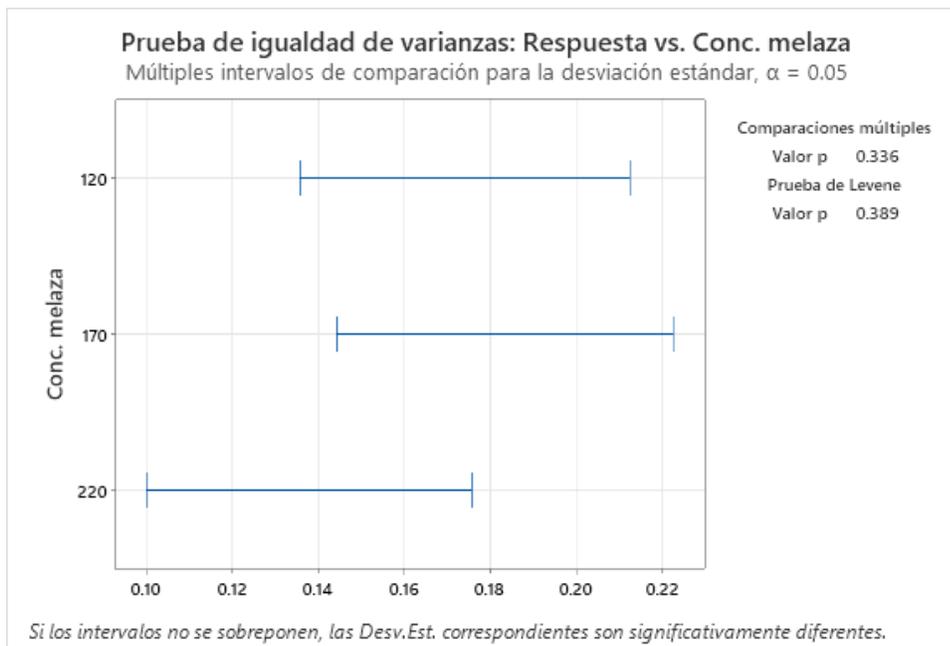
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 39. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Tratamiento de melaza, *L. plantarum*



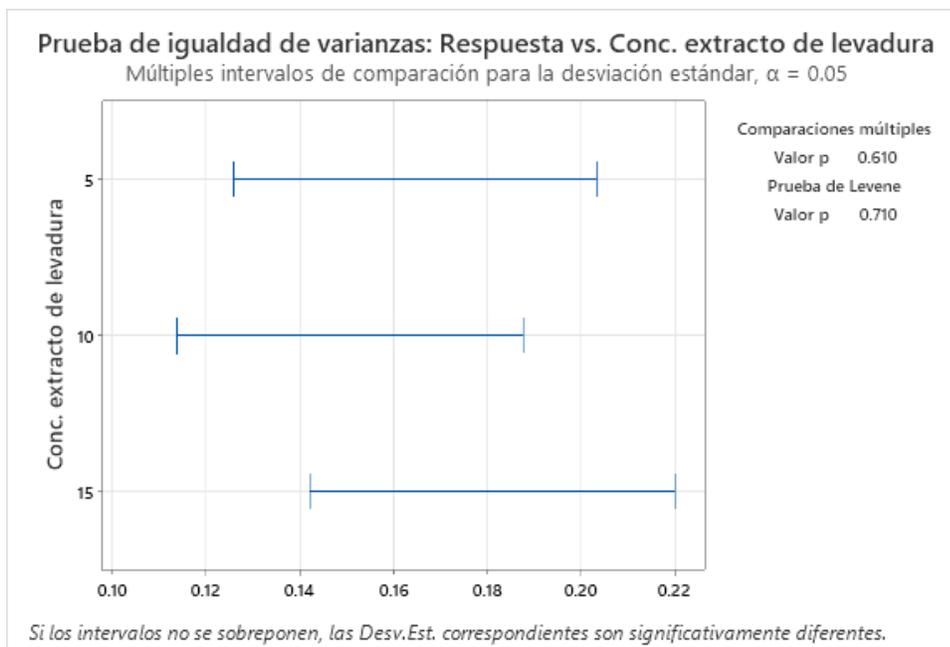
Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 40. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de melaza, *L. plantarum*



Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

Figura 41. Prueba de igualdad de varianzas: rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares vs. Concentración de extracto de levadura, *L. plantarum*



Nota: Respuesta corresponde rendimiento de producción de ácido láctico sobre consumo de azúcares (g/g). Dimensionales de concentración de melaza y extracto de levadura: (g/L).

I. CÓDIGOS DE BERKELEY MADONNA

Código utilizado para modelar el comportamiento de *L. casei*

```
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME = 80
DT = 5
{Type Equations Here.}
V=Vmax*(CS)/(KS+CS)*Ki/(Ki+CS)*EXP(-Cp/Kp)
Rn=V*Cn*(1-Cn/Ce)
Rp=(A*Rn+qpmax*(CS)/(KS+CS)*Ki/(Ki+CS)*EXP(-Cp/Kp)*Cn*(1-Cp/Cpmax))
Rs=-Rn/Yxs-Rp/Yps-ms*Cn+w*EXP(k*TIME)

Vmax=2.22678
Ks=3.44872
Ki=8.24917
Kp=14.04439
A=6.32657
qpmax=6.23153
Cpmax=26
Yxs=0.27724
Yps=4.23556
Ce=2.1
k = -0.23435
w =-3.92703
ms=0.04124

INIT CS = 67.7
INIT Cn = 0.044
INIT Cp = 0.937

d/dt(Cn)=Rn
d/dt(CS)=Rs
d/dt(CP)=Rp
```

Código utilizado para modelar el comportamiento de *L. plantarum*

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME = 70

DT = 5

{Type Equations Here.}

$V = V_{max} * (CS) / (KS + CS) * Ki / (Ki + CS) * EXP(-Cp / Kp)$

$Rn = V * Cn * (1 - Cn / Ce)$

$Rp = (A * Rn + qp_{max} * (CS) / (KS + CS) * Ki / (Ki + CS) * EXP(-Cp / Kp) * Cn * (1 - Cp / Cp_{max}))$

$Rs = -Rn / Y_{xs} - Rp / Y_{ps} - ms * Cn + w * EXP(k * TIME)$

$V_{max} = 0.61946$

$Ks = 46.03027$

$Ki = 59.79032$

$Kp = 36.49023$

$A = 4.02151$

$qp_{max} = 11.42563$

$Cp_{max} = 20.05$

$Y_{xs} = 0.97499$

$Y_{ps} = 2.02117$

$Ce = 1.6$

$k = -0.45475$

$w = -4.70857$

$ms = 0.01031$

INIT CS = 66.084

INIT Cn = 0.058125

INIT Cp = 1.28

$d/dt(Cn) = Rn$

$d/dt(CS) = Rs$

$d/dt(CP) = Rp$

XIII. GLOSARIO

AERÓBICO. Que ocurre o requiere la presencia de oxígeno molecular (O_2) (Alberts *et al.*, 2010).

ANAERÓBICO. Que necesita, o que se produce, en ausencia de oxígeno molecular (O_2) (Alberts *et al.*, 2010).

AZÚCAR. Carbohidratos formados por unidades de monómeros de fórmula general $(CH_2O)_n$. Como ejemplos pueden citarse los monosacáridos glucosa y fructosa; y el disacárido sacarosa (formado por una molécula de glucosa y una de fructosa unidas entre sí) (Alberts *et al.*, 2010).

BERKELEY MADONNA. es un software de modelado matemático que permite solucionar ecuaciones diferenciales de propósito general. Posee una interfaz gráfica para construir modelos matemáticos complejos con facilidad utilizando símbolos. Este proporciona un conjunto de herramientas gráficas para trazar los resultados. Resuelve: Ecuaciones diferenciales ordinarias, ecuaciones de diferencias, raíces de ecuaciones algebraicas trascendentales multidimensionales y simulaciones discretas. Se pueden escribir ecuaciones químicas utilizando la notación química convencional, para aplicar automáticamente la ley de velocidad adecuada y generar ecuaciones cinéticas. Los algoritmos que posee de integración son: Euler (1° orden), Runge-Kutta (2° y 4° orden), tamaño de paso adaptativo (4° orden Runge-Kutta) y otros (Berkeley Madonna; 2022)

BIOMASA. Masa integrada por componentes biodiversos con características de combustibilidad (CENGICAÑA, 2014).

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN. (HPLC por sus siglas en inglés) es un método instrumental utilizado para separar los componentes de una mezcla. Este método presenta una fase móvil constituida por un líquido que fluye a través de una columna y se introduce a alta presión para forzar el paso del disolvente a través de una fase fija que es un sólido o líquido fijado en un sólido. El procedimiento consiste en inyectar pequeños volúmenes de analito a la corriente de fase móvil, que es polar, la cual es bombeada hasta una columna de fase estacionaria, que es apolar. El analito introducido se retarda por las diferentes interacciones químicas, este retardo se denomina tiempo de retención el cual es distinto para cada analito de la muestra. Dependiendo de la afinidad, por cada una de las fases se tendrán velocidades y tiempos de retención diferentes provocando una separación. Los componentes en la fase estacionaria pasan por un detector de señal que identifica su momento de aparición. El principio de la técnica se fundamenta en las interacciones hidrofóbicas que resultan de la repulsión entre el disolvente polar y el componente apolar, teniendo como única condición que la muestra que se inyecta sea soluble en la fase móvil (Skoog *et al.*, 2014).

FERMENTACIÓN. proceso metabólico llevado a cabo por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, que permiten obtener productos simples como ácidos orgánicos (etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido propiónico) a partir de compuestos químicos orgánicos, como los azúcares. Estos son procesos anabólicos, es decir tiene requerimiento energético (Calderón, 2017).