



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos

Producción de ácido láctico a partir de *Lactobacillus* sp aislado de frutos de la Región Loreto

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos

AUTOR

Stephy SAAVEDRA BOCANEGRA

ASESORES

Amparo Iris ZA VALETA PESANTES

Luis Arturo ALEJANDRO PAREDES (Coasesor)

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Saavedra S. Producción de ácido láctico a partir de *Lactobacillus* sp aislado de frutos de la Región Loreto [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos; 2017.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Stephy Saavedra Bocanegra
DNI	46634215
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4867-7622
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
DNI	17880045
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3844-7185
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Luis Arturo Alejandro Paredes
DNI	42981698
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7099-4296
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.6.2. Biotecnología Industrial
Grupo de investigación	Biotecnología Microbiana y Salud - BIOMIAS
Agencia de financiamiento	<p>Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC). Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). N° 007 - FONDECYT – 2014.</p> <p>Perú. Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú). Contrato N°230.</p> <p>Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. 2016</p>

Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Biología Molecular País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2016 - 2017
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Biotecnología agrícola, Biotecnología Alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01 Tecnologías de bioprocesamiento, Biocatálisis, Fermentación https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Producción de ácido láctico a partir de *Lactobacillus* sp aislado de frutos de la Región Loreto”

Que presenta la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:

STEPHY SAAVEDRA BOCANEGRA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE (18) DIECIOCHO

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Título Profesional de Licenciado (a) en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 19 de diciembre de 2017.

Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Presidente

Dra. Yadira Fernández Jeri
Miembro

Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino
Miembro

Q.F. Robert Dante Almonacid Román
Miembro



“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification



N° BR233265

DEDICATORIA

A mi querida madre, July Bocanegra de la Cruz

por su constante apoyo, sacrificio

y amor incondicional.

A mis hermanos, Erick, Hellen y Etienne por

sus consejos y apoyo en todos mis estudios universitarios.

A S.Y.M.P.V.Z por que han estado en todo momento a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por sus grandes enseñanzas, paciencia y comprensión en todo momento; y por haber confiado en mi persona.

A Arturo Alejandro Paredes, por su amistad, sabios consejos y orientación que fueron valiosos en cada momento del trabajo de investigación.

A Abad Hurtado, Omar Pillaca y Juan Carlos Flores por haber formado parte del equipo de investigación y que sus conocimientos aportaron grandes logros al desarrollo de esta tesis.

A mi compañero y amigo, Diego Gonzales por su apoyo incondicional en todo momento.

A los miembros del laboratorio de Biología Molecular, en especial a la Mg. Johanna Sánchez, Dr. Carlos Vegas, Mg. Carmen Peña, Mg. Elizabeth Chávez, Dra. Karim Jiménez, Q.F Nathaly Flores, Lic. Arturo Intiquilla, Zorys, Sayuri, Angel, Estela, Cindy y Camila, por todo el apoyo brindado y su amistad.

Al Dr. Roberto Vega Paulino por sus conocimientos impartidos los cuales fueron de suma importancia en mi investigación.

A mis compañeros de la promoción ingresante 2011 de la E.A.P Ciencia de los Alimentos, por su amistad incondicional, sus consejos y buenos deseos.

Al Jurado Examinador y Calificador por el apoyo brindado en la revisión de este trabajo de investigación.

Este trabajo de investigación fue financiado parcialmente por el apoyo del Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado 2016, Innovate Perú contrato N°230 y Cienciactiva – Concytec contrato 007-Fondecyt-2014.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE GENERAL	5
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. OBJETIVOS	16
III. MARCO TEÓRICO.....	17
3.1 Antecedentes.....	17
3.2 Ácido Láctico.....	19
3.2.1. Propiedades.....	20
3.2.2. Clases de ácido láctico.....	20
3.2.3. Aplicaciones	21
3.3 Bacterias ácido lácticas	23
3.3.1 Género <i>Lactobacillus</i>	24
3.4 Fermentación.....	28
3.4.1 Condiciones del proceso fermentativo que afectan la obtención de ácido láctico	28
3.4.2 Tipos de fermentación	29
3.5 Metodología de superficie de respuesta (MSR)	32
3.5.1 Definición	33
3.5.2 Aplicación de MSR.....	35
3.5.3 Etapas de la optimización	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	42
4.1 Materiales.....	42
4.2 Métodos Analíticos	42
4.2.1 Determinación de masa celular.....	42
4.2.2 Determinación de azúcares totales	43
4.2.3 Determinación de ácido láctico.....	44
4.3 Metodología experimental.....	44
4.3.1 Medio de cultivo	44

4.3.2	Microorganismo utilizado	45
4.3.3	Preparación y selección del microorganismo utilizado.....	46
4.3.4	Curva de crecimiento de microorganismo seleccionado.....	47
4.3.5	Etapa de producción de ácido láctico	47
4.3.6	Diseño de un factor a la vez	49
4.3.7	Efecto de la temperatura, tiempo de fermentación y presencia de carbonato de calcio en la producción de ácido láctico	49
4.3.8	Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para obtener un mejor medio de cultivo.....	51
4.3.9	Escalamiento en biorreactor	58
4.4	Análisis estadístico.....	60
V.	RESULTADOS.....	60
VI.	DISCUSIÓN.....	82
VII.	CONCLUSIONES.....	89
VIII.	RECOMENDACIONES	90
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
X.	ANEXOS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: Adenosin trifosfato

BAL: Bacterias ácido lácticas

DCC: Diseño central compuesto

EMP: Ruta Embden – Meyerhoff – Parnas

FCC: Food Chemical Codex

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Generally Recognized as Safe

MRS: Caldo Man Rogose Sharpe

MSR: Metodología de superficie de respuesta

APL: Ácido poliláctico

FDP: Fructosa 1,6 difosfato

G6P: Glucosa-6-fosfato

PTS: Sistema fosfotransferasas

SOD: Enzima superóxido dismutasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico	20
Tabla 2. Especificaciones de calidad del ácido láctico	21
Tabla 3. Contenido y composición de caldo MRS	45
Tabla 4. Cepas bacterianas aisladas de frutos de la región Loreto	46
Tabla 5. Fuentes de carbono, nitrógeno e iones del medio de cultivo de <i>Lactobacillus</i> sp49	
Tabla 6. Parámetros determinados en el proceso fermentativo de <i>Lactobacillus</i> sp.	50
Tabla 7. Determinación de la mejor temperatura de fermentación de <i>Lactobacillus</i> sp. 50	
Tabla 8. Variables determinadas del proceso de fermentación	51
Tabla 9. Variables y niveles usados en el diseño Plackett-Burman para el cultivo de <i>Lactobacillus</i> sp.	52
Tabla 10. Diseño de Plackett-Burman en variable codificada y variable natural con una réplica.	53
Tabla 11. Diseño factorial 2 ² de extracto de carne y peptona de caseína para la producción de ácido láctico	54
Tabla 12. Pasos de la trayectoria de ascenso para obtener la mayor producción de ácido láctico.....	55
Tabla 13. Diseño factorial 2 ² de extracto de carne y peptona de caseína para la producción de ácido láctico	56
Tabla 14. Rangos y niveles utilizados en el diseño central compuesto	57
Tabla 15. Diseño central compuesto en variable codificada y natural para la producción de ácido láctico	57
Tabla 16. Diámetros de halos formados por cepas bacterianas productoras de acidez 60	
Tabla 17. Matriz experimental de Plackett-Burman.....	66
Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño Plackett-Burman para la producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus</i> sp.	67
Tabla 19. Componentes constantes del medio de fermentación para la producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus</i> sp.	69
Tabla 20. Matriz factorial 2 ² de extracto de carne y peptona de caseína para la producción de ácido láctico en <i>Lactobacillus</i> sp.	69
Tabla 21. Análisis de varianza del diseño factorial 2 ² para la producción de ácido láctico70	
Tabla 22. Pasos de la trayectoria de ascenso.....	72
Tabla 23. Matriz factorial 2 ² de extracto de carne y peptona de caseína para la producción de ácido láctico	73
Tabla 24. Análisis de varianza del diseño factorial 2 ²	74

Tabla 25. Concentración de ácido láctico del diseño central compuesto.....	74
Tabla 26. Análisis de varianza del DCC para la producción de ácido láctico.....	75
Tabla 27. Coeficientes de regresión del DCC	76
Tabla 28. Verificación de las condiciones óptimas calculadas	80
Tabla 29. Productividad y rendimiento de ácido láctico producido por <i>Lactobacillus</i> sp	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los isómeros del ácido láctico.....	19
Figura 2. Aplicaciones del ácido láctico.....	23
Figura 3. Micrografías que muestran diferentes morfologías celulares de lactobacilos. (A) <i>Lactobacillus gasseri</i> ; (B) <i>Lactobacillus agilis</i>	24
Figura 4. Ruta metabólica de la glucosa. (a) Ruta homofermentativa. (b) Metabolismo de ácidos mixtos. (c) Ruta heterofermentativa. (d) Ruta de Leloir.....	27
Figura 5. Fermentación en un sistema de cultivo en lote.....	31
Figura 6. Fermentación en un sistema de cultivo continuo.....	32
Figura 7. Metodología de superficie de respuesta (MSR).....	33
Figura 8. Superficie de respuesta tridimensional.....	34
Figura 9. Gráfica de contorno.....	35
Figura 10. Matriz de experimentos para los diseños factoriales completos 2^2 , 2^3 y 2^4 ..	37
Figura 11. Diseño Plackett - Burman de 8 experimentos y 7 factores.....	38
Figura 12. Carácter secuencial de la metodología de superficie de respuesta.....	39
Figura 13. Diseño Box-Behnken para $k=3$	40
Figura 14. DCC para $K=2$ y $\alpha = 2$	40
Figura 15. Metodología de turbidimetría.....	42
Figura 16. Metodología de biomasa seca.....	43
Figura 17. Diseño esquemático del desarrollo de la optimización de la producción de ácido láctico.....	48
Figura 18. Partes de un biorreactor tipo tanque agitado.....	58
Figura 19. Diámetros de halos formados por aislados bacterianos productores de acidez en placas con agar y carbonato de calcio.....	61
Figura 20. Halos formados por cepas bacterianas productoras de ácido láctico sobre agar carbonato de calcio.....	62
Figura 21. Curva de crecimiento microbiana.....	62
Figura 22. Efecto de las fuentes de carbono en la producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus sp.</i>	63
Figura 23. Efecto de las fuentes de nitrógeno e iones en la producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus sp.</i>	64
Figura 24. Efecto de la temperatura en la producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus sp.</i>	64
Figura 25. Efecto del tiempo de fermentación y de carbonato de calcio en la producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus sp.</i>	65

Figura 26. Diagrama de Pareto mostrando los factores que influyen sobre la producción de ácido láctico (g/L).....	68
Figura 27. Diagrama de Pareto mostrando el efecto de las fuentes de nitrógeno en la producción de ácido láctico (g/L).....	71
Figura 28. Diagrama de Pareto del DCC	76
Figura 29. Gráfica de valores calculados vs valores observados de la producción de ácido láctico por <i>Lactobacillus</i> sp.	77
Figura 30. Superficie de respuesta de la producción de ácido láctico (g/L) por <i>Lactobacillus</i> sp.	78
Figura 31. Gráfica de contornos de la producción de ácido láctico (g/L) por <i>Lactobacillus</i> sp.....	79
Figura 32. Curvas de la producción de ácido láctico y consumo de sustrato en un proceso de fermentación tipo lote por <i>Lactobacillus</i> sp.....	81

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	100
ANEXO 2	101
ANEXO 3	102
ANEXO 4	103
ANEXO 5	104
ANEXO 6	105
ANEXO 7	106
ANEXO 8	107
ANEXO 9	108

RESUMEN

El ácido láctico sirve como insumo en distintas industrias como la farmacéutica, alimentaria, cosmética, biomédica, peletera, química, entre otros. Por esta razón, el desarrollo del estudio de la producción de ácido láctico a partir de una cepa de *Lactobacillus* sp. Hui1 aislado de frutos de la Región Loreto. Para ello, se utilizó la metodología de superficie de respuesta con dos factores a dos niveles, esto permitió optimizar la producción de ácido láctico. Inicialmente, a escala de matraces, fueron evaluados los componentes del medio de cultivo para la obtención de ácido láctico (fuente de carbono, fuente de nitrógeno y iones metálicos) en un diseño de un factor a la vez y se estableció el uso de melaza de caña, extracto de carne, peptona de caseína, sulfato de manganeso, fosfato di potásico, citrato de amonio, y acetato de sodio en el medio de cultivo. Además, se evaluó la presencia o ausencia del carbonato de calcio (1,5 % m/v) en el medio de cultivo, la temperatura (30 y 37 °C) y, el tiempo de cultivo (22, 46, 72 y 118 h). De esta forma, la mejor concentración de ácido láctico fue obtenida a 37°C y 72 h en presencia de carbonato de calcio. Además, según el diseño Plackett - Burman se identificó que el extracto de carne y la peptona de caseína influyen significativamente en la producción de ácido láctico. Según estos dos factores se desarrolló la metodología de superficie de respuesta, utilizando la estrategia del ascenso más pronunciado y el diseño central compuesto. Así, se determinó que 18,69 g/L de extracto de carne y 7,88 g/L de peptona de caseína permitió obtener 84,2 g/L de ácido láctico. Finalmente, el escalamiento en un biorreactor de 3 L en un proceso en lotes, permitió obtener 71,4 g/L de ácido láctico.

Palabras clave: Ácido láctico, *Lactobacillus*, Superficie de respuesta, Diseño Central Compuesto

ABSTRACT

Lactic acid is used as an input in the pharmaceutical, food, cosmetic, biomedical, fur, chemical, and other industries. For this reason, the development of the study of the production of lactic acid from *Lactobacillus* sp. Hui1 isolated from fruits of the Loreto Region. For this, the response surface methodology was used with two factors at two levels, this allowed optimizing the production of lactic acid. Initially, at the flask scale, the components of the culture medium were evaluated to obtain lactic acid (carbon source, nitrogen source and metal ions) in a one-factor-at-a-time design and the use of molasses was established. sugarcane, meat extract, casein peptone, magnesium sulfate, manganese sulfate, potassium di phosphate, ammonium citrate and sodium acetate in the culture medium. In addition, the presence or absence of calcium carbonate (1.5% m / v) in the culture medium, the temperature (30 and 37 ° C) and the culture time (22, 46, 72 and 118) were evaluated. h). In this way, the best production of lactic acid was obtained at 37 ° C and 72 h in the presence of calcium carbonate. Furthermore, according to the Plackett-Burman design, meat extract and casein peptone were identified to significantly influence the production of lactic acid. According to these two factors, the response surface methodology was developed, using the steepest ascent strategy and the central composite design. Thus, it was determined that 18.69 g / L of meat extract and 7.88 g / L of casein peptone allowed to obtain 84.2 g / L of lactic acid. Finally, scaling in a 3 L bioreactor in a batch process allowed 71.4 g / L of lactic acid to be obtained.

Keywords: Lactic acid, *Lactobacillus*, Response surface, Central Composite Design

I. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es de gran interés a nivel industrial debido a sus propiedades fisicoquímicas y aplicaciones en las industrias alimentaria, química, biomédica, peletera, cosmética, farmacéutica, entre otras (1).

Actualmente, los problemas ambientales y energéticos, motivan a las industrias a desarrollar nuevas estrategias de producción que promuevan el uso de tecnologías limpias y sostenibles. Ante tal hecho, las investigaciones se centran en la búsqueda de nuevas alternativas para resolver esta problemática. Un ejemplo de ello es el ácido láctico, el 90 % es producido por bacterias ácido-lácticas. De esta forma, el ácido láctico es ópticamente puro, utilizando sustratos de bajo costo, y con un gasto de energía mínimo (1,2).

Las bacterias ácido-lácticas realizan la fermentación láctica, se prefiere a las del género *Lactobacillus* de tipo homofermentativa porque se puede obtener ácido láctico como producto final a fin de disminuir los costos de producción (3).

Las fermentaciones se pueden realizar en cultivo sumergido o en superficie (medio sólido), la elección del medio depende del microorganismo y de las variables que se evalúen en el proceso. En consecuencia, la fermentación en cultivo sumergido es ventajoso porque permite controlar las condiciones de cultivo como temperatura, pH, agitación, etc. Además, si se desea evaluar el efecto de los componentes nutricionales que favorecen aumentar la concentración de ácido láctico, éste tipo de fermentación permite la fácil recuperación del producto, brinda una alta concentración de producto y/o rendimiento, reduce la contaminación del medio de cultivo y facilita un análisis rápido (4–7).

Por otro lado, recientes investigaciones han optimizado los parámetros del proceso y los medios de cultivo para obtener una mayor producción, rendimiento o productividad de ácido láctico. En este aspecto, los métodos estadísticos permiten determinar los factores que influyen en la producción y sus interacciones sobre una respuesta determinada.

Entre los métodos, más utilizados en la selección de factores están los diseños factoriales y la MSR, así como, para la optimización de las condiciones de operación. Además, por las características antes mencionadas, el método de superficie de

respuesta es utilizado en la optimización de los componentes del medio de cultivo en procesos fermentativos.

Por ello, esta investigación tuvo como objetivo principal producir ácido láctico a partir de una cepa de *Lactobacillus* sp. aislado de frutos de la región Loreto utilizando la metodología de superficie de respuesta.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Producir ácido láctico a partir de *Lactobacillus* sp. aislado de frutos de la Región Loreto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar la cepa de *Lactobacillus* con mayor capacidad para producir ácido láctico a partir del cepario del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.
2. Determinar los factores nutricionales de *Lactobacillus* sp. mediante un diseño experimental de Plackett-Burman que mejore la obtención de ácido láctico.
3. Optimizar la obtención de ácido láctico con los factores nutricionales principales mediante la metodología de superficie respuesta.
4. Escalar la producción de ácido láctico en biorreactor de 3L, usando un proceso tipo lote, a partir de las condiciones optimizadas en la escala de matraces.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes

El ácido láctico y sus subproductos son ampliamente empleados en la industria alimentaria, química, farmacéutica, cosmética, tratamiento de cuero, del plástico, la agricultura, textil, alimentación animal, entre otros. Las aplicaciones potenciales de este ácido pueden ser como aditivo alimentario, regulador de pH, químico anti-edad, curtimiento de pieles, precursor de ácido poliláctico (PLA), etc. ; lo que permite que la utilización de estos productos sean de gran uso para el hombre y el medio ambiente (8). Actualmente, la producción de este ácido orgánico se viene dando por la vía biotecnológica donde se utilizan bacterias ácido-lácticas (BAL), lo cual disminuye el costo de producción y gasto de energía, así como se utiliza sustratos baratos o residuos industriales.

Estela y col (2007)(9) evaluaron la composición del medio de cultivo y las condiciones del proceso de fermentación para obtener una producción optimizada de ácido láctico utilizando una cepa de *Lactobacillus plantarum* L10.

Suarez (2007)(10) estudió la producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus casei* ATCC 7469 donde empleó el medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS) con la finalidad de evaluar distintas concentraciones de carbonato de calcio, el cual actúa como un amortiguador de las variaciones de pH, y concluyó que el uso del carbonato de calcio es esencial para obtener un mayor rendimiento de ácido láctico.

Por otro lado, se reportan estrategias de optimización utilizando como base los diseños factoriales (Plackett-Burman). Por ejemplo, Chauhan y col (2007)(11) evaluaron diferentes componentes nutricionales utilizando el diseño de Plackett – Burman, donde establecieron que la peptona, extracto de levadura, acetato de sodio, K_2HPO_4 , extracto de carne y jugo de dátil influyen significativamente en la cantidad de ácido láctico.

Coelho y col (2011)(12) utilizaron el diseño Plackett-Burman para determinar que componentes influyen significativamente en los g/L de ácido láctico utilizando *Lactobacillus plantarum*, de este modo, el licor de maíz, K_2HPO_4 y Tween 80 fueron los componentes que resultaron significativos, que en concentraciones optimizadas por el método de superficie de respuesta se obtuvo 94,8 g /L de ácido láctico (quince veces mayor que en el medio inicial).

De igual manera, Bustos y col (2004)(13) utilizaron la MSR para optimizar la concentración de los nutrientes: licor de maíz, extracto de levadura y peptona; donde se produjo 58,9 g/L de ácido láctico por *Lactobacillus coryniformis* en un tiempo de fermentación de 96 h.

En investigaciones recientes aprovecharon los residuos agroindustriales, subproductos de la industria láctea, etc., empleándolos en los procesos de bioconversión, de esta manera redujeron los costos de producción. Así Dumbrepatil y col (2008)(14) produjeron ácido láctico utilizando melaza de caña.

Lima y col (2009)(15) enfocaron su trabajo en la optimización del ácido láctico utilizando melaza de caña, extracto de levadura hidrolizada, licor de maíz con un cultivo de *Lactobacillus* SMI8, obteniendo una producción óptima de 41,52 g/L de ácido láctico a partir de 16,48 g/L de licor de maíz, 4,93 g/L de extracto de levadura y melaza de caña.

Además, Vaca (2011) (16) evaluó la calidad de melaza de caña, y determinó que la concentración y pureza son factores determinantes a utilizar como sustrato en el medio de fermentación.

Por otro lado, Araya-Cloutier y col (2010)(17) utilizaron jugo preparado a partir de residuos de pulpa de piña e hidrolizado de dicho jugo, los cuales fueron utilizados como sustratos en la fermentación, con ambos sustratos se obtiene ácido láctico pero en mayor cantidad se obtiene con el hidrolizado de piña.

García M y col (2013)(18) propusieron la utilización de lactosuero como sustrato para la *Lb. casei* en un cultivo desarrollado en lotes. Asimismo, Eneque y col (2014)(19) trabajaron con lactosuero desproteínizado y *Lactobacillus bulgaricus*, donde obtuvieron un porcentaje de acidez de 2,14 % y 44,07 mL de ácido láctico por cada litro de suero.

Cabe mencionar que existe interés por el uso de sustratos no convencionales que permiten obtener un alto rendimiento de ácido láctico. Así, Wang y col (2010)(20) evaluaron el potencial de glucosa, harina de yuca; maíz como fuentes de carbono utilizando *Lactobacillus rhamnosus*, de este modo, la harina de yuca permitió la obtención de alta concentración de ácido L-láctico. Por tanto, el uso de sustratos complejos (como residuos agroindustriales) y el estudio de cepas del género *Lactobacillus* son una alternativa para la producción de ácido láctico.

3.2 Ácido Láctico

El ácido láctico es un ácido carboxílico conocido como ácido 2- hidroxipropanoico, que fue descubierto y aislado de leche agria por Scheele Swedish en 1780 (21,22). En 1839, Fremy realizó la fermentación usando diferentes sustratos que contienen grandes cantidades de carbohidratos (azúcar refinada, leche, almidón y dextrina) con los que obtuvo ácido láctico. Pasteur en 1857, demostró que la fermentación láctica se debe a la presencia de microorganismos (*Lactobacillus*) y no porque forma parte de la composición de la leche, de esta manera determinó el papel que *Lactobacillus* tiene en la producción de ácido láctico (23).

La estructura química del ácido láctico presenta tres átomos de carbono los cuales son: dos átomos de carbono terminales siendo uno de ellos el que forma parte del grupo carboxilo y un átomo de carbono central, que está ligado a un grupo hidroxilo (24).

Presenta dos enantiómeros que se encuentran en la naturaleza como D (-) ácido láctico y L (+) ácido láctico (Figura 1), pero también lo podemos encontrar en forma de mezcla racémica, que lo conforman los isómeros D (-) y L (+) ácido láctico en concentraciones equivalentes (25). El isómero L (+) es considerado beneficioso para la salud humana porque es metabolizado por nuestro organismo lo que conlleva a ser utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica. En cambio, el isómero D (-) puede ser perjudicial en cantidades elevadas (21,26,27).

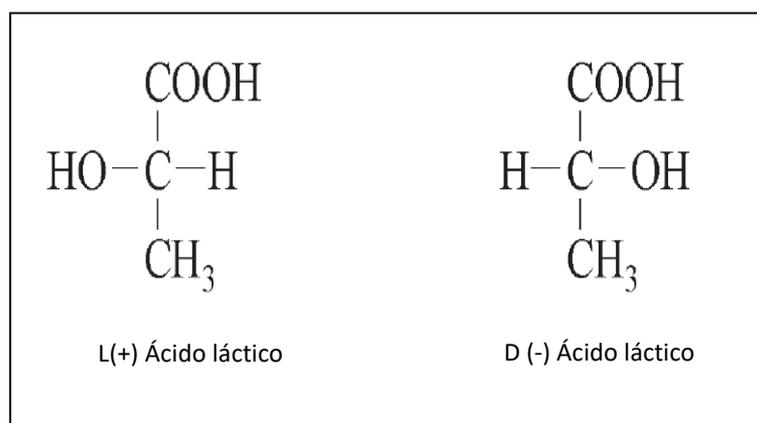


Figura 1. Estructura química de los isómeros del ácido láctico.

Fuente: Tomado de Starr y Westhoff (2014)

3.2.1. Propiedades

El ácido láctico, líquido viscoso, inodoro e incoloro; presenta una alta solubilidad en solventes polares como el agua y el alcohol, pero es insoluble en solventes orgánicos como el cloroformo, éter, éter de petróleo, etc.(24,28). Además, los isómeros que se encuentran en estado puro son sólidos altamente higroscópicos que poseen un alto punto de ebullición de 125 a 140 °C (29). El ácido láctico que se produce por biotecnología bajo sus dos formas - D y - L, tienen una apariencia de color amarillenta debido a que presenta ciertas impurezas provenientes del sustrato que se utilizó en la producción, presencia de otros ácidos como acético y tartárico que también se producen durante la fermentación y la presencia de minerales, etc. También presentan distintos grados de pureza (80 %, 95 % y 105 %) que especifican su calidad y que dependen de la industria en donde se utilice (28). A continuación, se mostrará ciertas propiedades fisicoquímicas (Tabla 1) (30).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico

Fórmula	C ₃ H ₆ O ₃
Peso molecular	90,08
Índice de refracción	1,44
Punto de fusión	L (+) y D(-): 52,8 a 54 °C
	DL: 16,8 a 33 °C
Punto de ebullición	125 – 144 °C
Gravedad específica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40,33 mNsm ⁻²
Densidad	1.249
Constante dieléctrica	22 e

Fuente: Tomado de Perry y col (1992)

3.2.2. Clases de ácido láctico

- **Ácido láctico crudo o comercial.** Se utiliza básicamente en la industria de cueros donde se requiere el ácido láctico a una concentración del 50 % de pureza (31).

- **Ácido láctico grado alimentario.** Según la Food Chemical Codex (FCC) el ácido láctico de grado alimentario debe tener una pureza del 80%, en concentraciones mínimas de cloruros y sulfatos (< 0,1%)(29).
- **Ácido láctico grado farmacéutico.** Presenta una pureza del 88 % con presencia de metales pesados de 33 mg/kg además la presencia de sulfatos y cloruros debe ser menor al 0,05 % (29).
- **Ácido láctico grado USP.** El estándar de ácido láctico según la USP debe tener una pureza del 90 %.

A continuación, se muestran ciertos criterios de calidad del ácido láctico (Tabla 2) (8).

Tabla 2. Especificaciones de calidad

Parámetro	Grado Farmacéutico	Grado FCC	Grado alimenticio
Pureza (%)	88,000	95-105	80,00
Cloruros (%)	0,008	0,20	0,02
Sulfatos (%)	0,020	0,25	0,05
Arsénico (mg/kg)	4,000	3,00	0,20
Metales pesados (mg/kg)	33,000	10,00	10,00
Hierro (mg/kg)	10,000	10,00	10,00
Cenizas (%)	0,100	0,10	0,10

Fuente: Tomado de Starr y Westhoff (2014)

3.2.3. Aplicaciones

El ácido láctico es utilizado a nivel mundial en distintos tipos de industrias: alimentaria, farmacéutica, peletera, textil, química, medica, etc. Está considerado por la FDA (Food and Drug Administration) como aditivo alimentario GRAS (Generally Recognized as Safe)(32), por ende es empleado en la industria alimentaria principalmente como acidulante y conservante en diferentes productos alimenticios tales como néctares, zumos de frutas, aceitunas, etc. (23). En productos fermentados tales como yogurt, mantequilla, verduras enlatadas actúa como agente mejorador del sabor. Por otra parte es aplicado en el procesamiento de panes, dulces, refrescos, cerveza donde es utilizado

como aromatizante, regulador del pH e inhibidor de bacterias que puedan estar presentes durante el procesamiento (27,33,34).

En la industria de pintura y textil se utiliza como solvente, agente controlador del pH y fijador del teñido (35,36). Asimismo, en la industria química y de los cueros se utiliza en la producción de sales, en la obtención de etanol, propilenglicol, polímeros acrílicos, removedor de polímeros, resinas, como agente de limpieza, para el desencalado, remojado y acidulado del recubrimiento de pieles (23,31,35,37).

Las sales derivadas de ácido láctico son usadas como disolventes, emulsionantes y plastificantes las cuales sirven para elaborar diferentes productos que hoy en día se encuentran en el mercado y que también intervienen en diferentes procesos químicos, uno de ellos es el lactato de etilo que se utiliza para la elaboración de disolventes verdes que se utilizan en productos que buscan eliminar la utilización de sustancias peligrosas y tóxicas (36,37). Otro derivado es el ácido poliláctico (APL) que se usa como polímeros biodegradables para la elaboración de envases, plásticos, fibras, espumas, materiales médicos, etc.; su uso es considerado una alternativa verde porque reemplaza a los productos que son elaborados a partir del petróleo lo que permite la reducción de la huella de carbono (3,38,39).

En la industria farmacéutica y cosmética, el ácido láctico y sus subproductos son aplicados, porque poseen ciertas propiedades que permiten elaborar productos con efectos hidratantes, antimicrobianos, rejuvenecedores de la piel y productos de enjuague bucal (40). Las propiedades de las sales de lactato radican fundamentalmente porque tienen la capacidad de retener agua, retrasan el crecimiento de *Clostridium botulinum* y permiten la supresión de la formación de tirosinasa (27,33,41). Cabe destacar que el lactato de etilo es utilizado para elaborar ungüentos tópicos, lociones, soluciones parenterales, polímeros biodegradables para aplicaciones médicas (como suturas quirúrgicas, fármacos de liberación controlada y prótesis), productos antiacné, cremas para el cuidado de la piel, productos humectantes, etc. Asimismo, otros derivados como lactato de sodio y calcio son utilizados para la elaboración de aplicaciones parenterales, de diálisis, aplicación en tratamientos de deficiencia de calcio, y como agente anti caries (27,34).

Otro campo donde se viene utilizando el ácido láctico es en productos que se utilizan para la alimentación animal, estos productos son obtenidos mediante la fermentación de forrajes húmedos, que son conservados en silos, los cuales son conocidos como ensilados que al contener ácido láctico permite que tengan una vida útil más larga además

de tener un alto valor nutritivo. Por otro lado, se utiliza el lactato de amonio como sustituyentes de la urea y del citrato de amonio porque permite una mayor producción de leche con un alto valor nutritivo en el ganado bovino (42).

Finalmente, el ácido láctico y sus derivados permiten elaborar formulaciones naturales y seguras que no tengan impactos ambientales ni efectos toxicológicos (33). En la Figura 2 (43), se observan las distintas aplicaciones del ácido láctico.

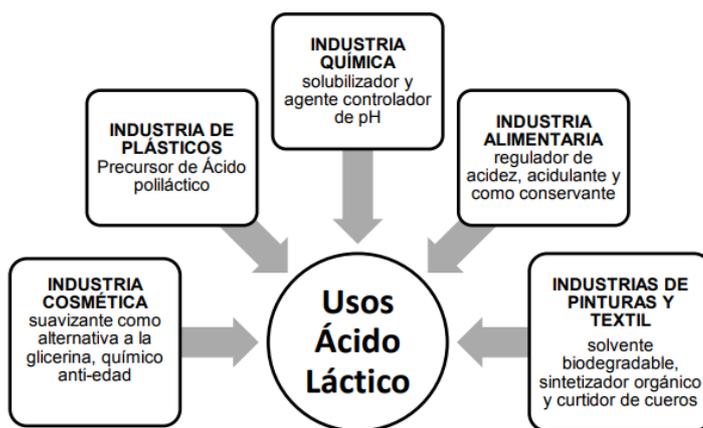


Figura 2. Aplicaciones del ácido láctico

Fuente: Tomado de Del Pozo y col (2010)

3.3 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido-lácticas constituyen un grupo diverso de microorganismos que presentan características en común (de acuerdo a su forma, fisiología y metabolismo). Presentan aplicaciones potenciales en diversas industrias y en los últimos años han venido siendo estudiadas posibilitando conocer su comportamiento de acuerdo con las características que presentan.

BAL son Gram-positivas no esporuladas, morfológicamente pueden ser cocos o bacilos, carecen de la enzima citocromo catalasa (catalasa negativos), son benzidina y oxidasa negativas, son ácido tolerantes pudiendo desarrollarse a pH ácidos (menor a 5), por lo general crecen en condiciones anaeróbicas, pero pueden ser anaeróbios facultativos o microaerotolerantes (44).

Presentan la capacidad de producir ácido láctico como metabolito principal de la fermentación, por ello se pueden clasificar según su capacidad fermentativa de

carbohidratos, es decir la ruta biosintética que utilizan y los metabolitos que se producen, de esta manera podemos clasificarlas como homofermentativas y heterofermentativas.

El grupo de bacterias homofermentativas siguen la ruta Embden – Meyerhoff – Parnas (EMP) dando únicamente como producto principal ácido láctico y esto se debe gracias a las enzimas aldolasas que poseen (45).

En el caso de las heterofermentativas no siguen la vía EMP porque carecen de aldolasas por ende utilizan rutas alternas como la pentosa monofosfato o la de la hexosa monofosfato dependiendo de la fosfoacetolasa que prescinde la fermentación de azúcares dando origen a la producción de ácido láctico y otros subproductos tales como ácido acético, CO₂ y otros ácidos orgánicos (45).

Existen diferentes géneros de BAL, las más conocidas son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*; donde el género *Lactobacillus* es el sobresaliente y más utilizado en la producción de ácido láctico (45).

3.3.1 Género *Lactobacillus*

Pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*, presentan una característica morfológica bacilar donde algunos son alargados o cortos y crecen generalmente en cadenas (Figura 3). Las características de crecimiento son importantes para la síntesis de sus diferentes metabolitos, dentro de las cuales la temperatura óptima de crecimiento oscila entre 30 a 40 °C. Sin embargo, pueden crecer en un rango de 2 a 53 °C; el rango de pH está entre 5,5 a 6,5 (46).

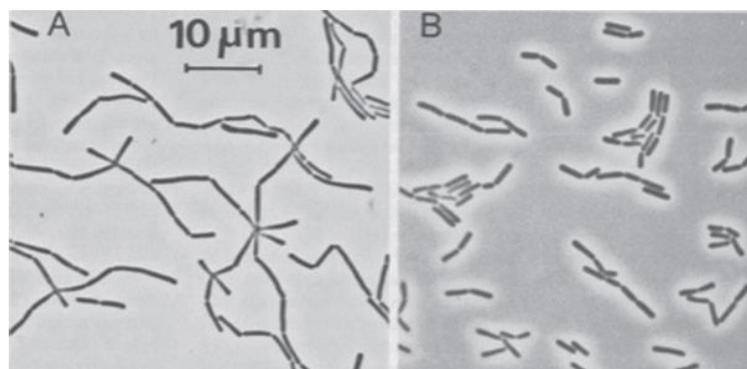


Figura 3. Micrografías que muestran diferentes morfologías celulares de lactobacilos. (A) *Lactobacillus gasseri*; (B) *Lactobacillus agilis*

a. Metabolismo de *Lactobacillus*

Las especies que conforman este género presentan ciertas características fisiológicas, como la fermentación de azúcares, actividades proteolítica y lipolítica (45,47). Los azúcares son la fuente principal de carbono y energía es por ello que es necesario que sea utilizado por la bacteria y para ello se emplean diferentes sistemas de transportes que van actuar en la absorción de los carbohidratos.

De preferencia *Lactobacillus* prefiere metabolizar glucosa, pero también pueden metabolizar otras hexosas como fructosa, galactosa, lactosa, sacarosa, etc. La ruta glucolítica (Figura 4) es utilizada por distintas familias *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*. En esta vía, la glucosa se convierte en ácido láctico obteniendo por cada molécula de glucosa consumida, 2 moléculas de ácido láctico, y 2 moléculas de adenosín trifosfato (ATP) teniendo como enzima clave a la aldosa fructosa-1,6-difosfato (FDP) (Vía homofermentativa). Cabe mencionar que en general los monosacáridos que ingresan a la célula o se liberan en el citoplasma por hidrólisis de disacáridos ingresan a la glucólisis a nivel de glucosa-6-fosfato (G6P) o son procesados por la vía de Leloir, esta última vía es utilizada por la galactosa.

Algunos disacáridos son metabolizados por *Lactobacillus* como la sacarosa, lactosa, maltosa, celobiosa, etc. estos azúcares se transportan a través de la membrana celular, ya sea como azúcares libres o fosforilados, y luego se dividen en dos monosacáridos, estos pueden ser transportados por las permeasas o transportados por el sistema fosfotransferasa (PTS) para luego seguir la vía glucolítica; en el caso de la lactosa es transportada por el sistema PTS o puede ser importada por las permeasas, en caso de ser transportada por el sistema PTS la galactosa sigue la vía tagatosa-6-fosfato donde la galactosa es transformada hasta tagatosa-1,6-difosfato para después seguir la vía glucolítica; en caso de ingresar por intermedio de las permeasas esta sigue la ruta de Leloir donde la galactosa es transformada hasta glucosa-6-fosfato y de esta manera pueda realizar la glucólisis (48).

En el caso de los aminoácidos BAL en general son auxótrofos para un número variable de aminoácidos, por ello necesitan metabolizar proteínas el cual inicia con una proteinasa de envoltura celular que degrada la proteína en oligopéptidos que posteriormente son absorbidos por las células a través de sistemas específicos de transporte de péptidos para más degradación en péptidos y aminoácidos más cortos mediante la acción de varias peptidasas intracelulares (49). De esta manera se hace posible la obtención de aminoácidos para un crecimiento adecuado ya que dependen de un sistema proteolítico

totalmente activo para cumplir sus requerimientos de aminoácidos. Sin embargo, se ha encontrado que en el genoma de *Lb. plantarum* se codifica la enzima que se encarga de la síntesis de aminoácidos con excepción de la leucina, la isoleucina y valina (50).

b. Clasificación según su capacidad fermentativa

Según la clasificación de Kandler and Weiss (1986) (51) las diferentes especies de *Lactobacillus* pueden ser ubicadas dentro de tres grupos, en el primer grupo se encuentran las estrictamente homofermentativas, que no fermentan pentosas ni gluconato y siguen la vía EMP (Figura 4,a), poseen la enzima aldolasa FDP; en el segundo grupo se encuentran las heterofermentativas facultativas que fermentan hexosas siguiendo la ruta EMP y las pentosas utilizando la vía de las fosfocetolasas dando metabolitos como ácido láctico, acético, fórmico, alcohol (etanol) y CO₂ (Figura 4,b); y en el tercer grupo se encuentran los estrictamente heterofermentativas tales como *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis* donde como productos finales se obtiene ácido láctico, ácido acético y CO₂ y siguen la ruta del fosfogluconato heteroláctica (Figura 4,c) (52,53).

Además, existen especies como *Lactobacillus vini* y *Lb. plantarum* que realizan fermentación homoláctica de las pentosas que siguen la ruta de la pentosa - fosfato donde por acción de las transquetolasas y transaldolasas se obtiene únicamente ácido láctico (54).

c. Requerimientos nutricionales

Lactobacillus requiere aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, especialmente se requiere al ácido glutámico, isoleucina, leucina y valina, metionina, biotina. En el caso de los metales Mg⁺², Mn⁺², Fe⁺², Fe⁺³, y Zn⁺², son utilizados como minerales para el cultivo (55).

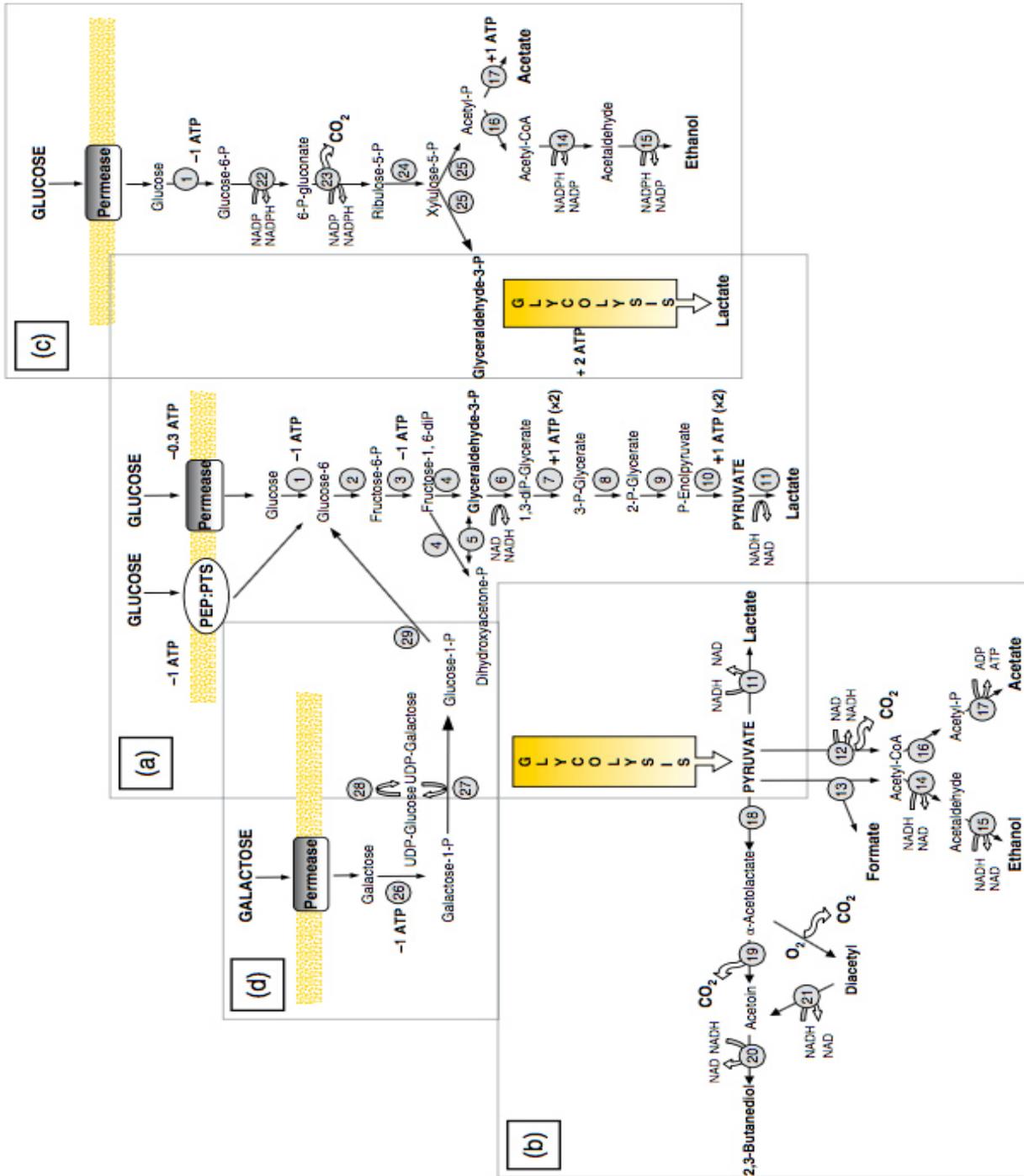


Figura 4. Ruta metabólica de la glucosa. (a) Ruta homofermentativa. (b) Metabolismo de ácidos mixtos. (c) Ruta heterofermentativa. (d) Ruta de Leloir.

Fuente: Tomado de Mozzi y col (2016)

3.4 Fermentación

El proceso de fermentación consiste en un proceso catabólico de oxidación incompleta que ocurre en condiciones anaeróbicas donde el aceptor final de electrones es una molécula orgánica, obteniéndose de esta manera como producto final un compuesto orgánico. En la fermentación láctica, el compuesto que se obtiene es el ácido láctico, un ácido orgánico que a partir de una mol de glucosa se obtienen dos moles de lactato (56).

3.4.1 Condiciones del proceso fermentativo que afectan la obtención de ácido láctico

a. pH

BAL tienen rangos de pH que oscilan entre 5 y 7 aunque estas bacterias resisten rangos de pH bajos, conforme va transcurriendo la fermentación pueden ser inhibidas por el mismo ácido láctico ya que el pH intracelular de la bacteria variará y las macromoléculas se verán alteradas en su funcionamiento (57,58). El pH del medio se fija al inicio de la fermentación y es necesario controlarlo porque mientras se van produciendo los ácidos orgánicos estos se van acumulando en el medio de fermentación y esto hace que la bacteria se vea inhibida en su crecimiento. Para evitar ello se utiliza agentes neutralizantes como el carbonato de calcio para que de esta manera se pueda controlar la acidez producida en el medio (formación de lactato de calcio). Bujang y col (59) reportaron que la concentración de este agente neutralizante es indiferente en la obtención de ácido láctico.

b. Temperatura

Lactobacillus es una bacteria mesófila, que crece en un rango de 30 °C a 40 °C. La temperatura afecta el crecimiento del microorganismo, el tiempo del proceso y el rendimiento del producto (46). Con el fin de obtener buen rendimiento, la temperatura debe ser mantenida constante en un margen cercano o igual al óptimo, sino podría ocasionar un retardo en el crecimiento en bajas temperatura o stress debido al choque en altas temperaturas.

Además, de influir en el crecimiento de los microorganismos (la cual es específica para cada género), también afectan a las enzimas que tienen una temperatura óptima a la cual alcanzan su máxima actividad enzimática y por consiguiente, en la actividad metabólica del microorganismo, que en consecuencia influyen en el crecimiento y la producción de metabolitos (60).

c. Fuente de carbono

El medio de cultivo para BAL debe estar constituido por diferentes nutrientes; uno de ellos la fuente de carbono constituidos por azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, etc. Al emplear azúcares puros se obtienen, mejores rendimientos de ácido láctico, sin embargo, el inconveniente es el costo que se suma en la producción ya que estos azúcares son caros. Otra alternativa es el uso de residuos industriales como la melaza de caña, lactosuero, etc., los cuales permiten obtener ácido láctico de forma más económica que los anteriores y serian buena opción para reemplazarlos (61).

d. Fuente de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno son usadas en la formación de enzimas. Sin embargo, la concentración de la fuente de nitrógeno no debe ser muy alta porque puede ser tóxica o inhibitoria para la bacteria (62).

Actualmente, se han utilizado diferentes fuentes de nitrógeno como extracto de levadura, peptona, licor macerado de maíz, salvado de trigo el extracto de carne y de malta (63). Estas fuentes de nitrógeno que se utilizan en la fermentación láctica deben ser ricas en péptidos, bases pirimidinas y purinas (61).

e. Micronutrientes

Se requieren pequeñas cantidades de estas sustancias porque intervienen como cofactores y participan en el funcionamiento celular. Las concentraciones de estos minerales son complejos cuando se agregan al medio de fermentación porque a concentraciones muy altas inhiben el crecimiento celular. Dentro de este grupo podemos encontrar al Mn, Mg, K, P, etc. (64).

Manganeso interviene en la activación de la lactato deshidrogenasa (LDH) que se lleva a cabo por la estimulación del Mn^{+2} , en otros casos actúa como cofactor uniéndose a la enzima superóxido dismutasa (SOD) o puede cumplir la misma función de la enzima (65).

Potasio interviene en la regulación del pH intracelular, fabricación de proteínas y en el caso del fosfato como lo reportado por Amrane (2000) (66), indica que el fosfato inorgánico ejerce un efecto sobre la producción de lactato donde ya que se observaron incrementos importantes de ácido láctico en los medios que fueron suplementado con este ion.

3.4.2 Tipos de fermentación

Los tipos de fermentaciones se pueden clasificar según el producto final obtenido, según el medio de cultivo utilizado, y según el sistema de operación (67,68).

a. Según el medio de cultivo utilizado

a.1 Fermentación en cultivo sumergido (FCS)

La fermentación del cultivo sumergido fue descubierta por Ebner y col (1993), presenta determinadas características una de ellas es que permite un mayor control de los parámetros (pH, la temperatura, componentes nutricionales, etc.), mayor producción, rendimiento y productividad en el desarrollo del proceso. Además, han sido reportadas investigaciones relacionadas a la optimización de factores; y este tipo de fermentaciones ha permitido una fácil recuperación del producto para análisis. Cabe destacar que existe un menor riesgo de contaminación utilizando este medio de fermentación y los nutrientes del medio están distribuido homogéneamente y disponibles (67).

a.2 Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en un cultivo sólido se caracteriza porque el interior de la matriz sólida no presenta agua libre, pero tiene una cierta humedad que permite el crecimiento de microorganismos. La presencia de agua es esencial para el crecimiento de estos y para la disponibilidad del sustrato; generalmente las levaduras y hongos son los que se utilizan en este tipo de fermentación a diferencia de las bacterias que según los estudios realizados son inadecuadas utilizarlas en un medio sólido para la fermentación. Además, aquí el control de las variables de proceso no requiere un control riguroso salvo la humedad, la oxigenación y la remoción de calor (69,70).

b. Según el sistema de operación

b.1 Sistema de operación por lotes

Una fermentación discontinua es un sistema cerrado (Figura 5), se caracteriza porque todos los componentes son adicionados antes de la inoculación; el crecimiento del microorganismo depende del sustrato limitante. En este tipo de fermentación, ocurre limitación del crecimiento causada por inanición o por acumulación de metabolitos. Ciertos factores como la temperatura, el pH, aireación, agitación son determinadas al inicio y pueden variar durante el proceso (68).

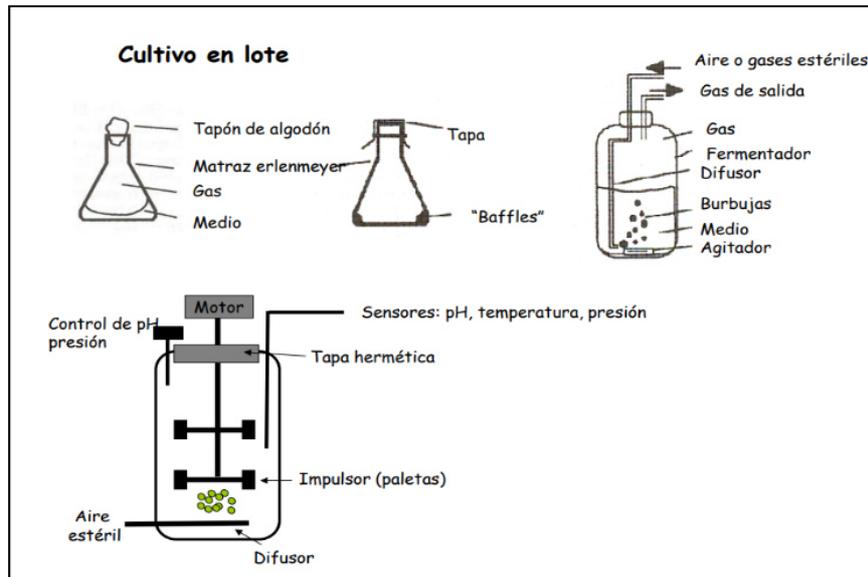


Figura 5. Fermentación en un sistema de cultivo en lote.

Fuente: Tomado de UNAM. Dpto. de Físicoquímica

b.2 Sistema de operación en continuo

Permite el crecimiento de los microorganismos en un sistema abierto donde se suministra de manera constante los componentes del medio (nutrientes, sustrato, etc.), de esta manera se mantienen siempre las células en fase logarítmica durante largos periodos de tiempo. La fase estacionaria se alcanza porque los nutrientes nos son aportados o porque los metabolismos de las células producen sustancias tóxicas para ellas y por lo tanto dejan de crecer, esto se evita con este cultivo (Figura 6)(68).

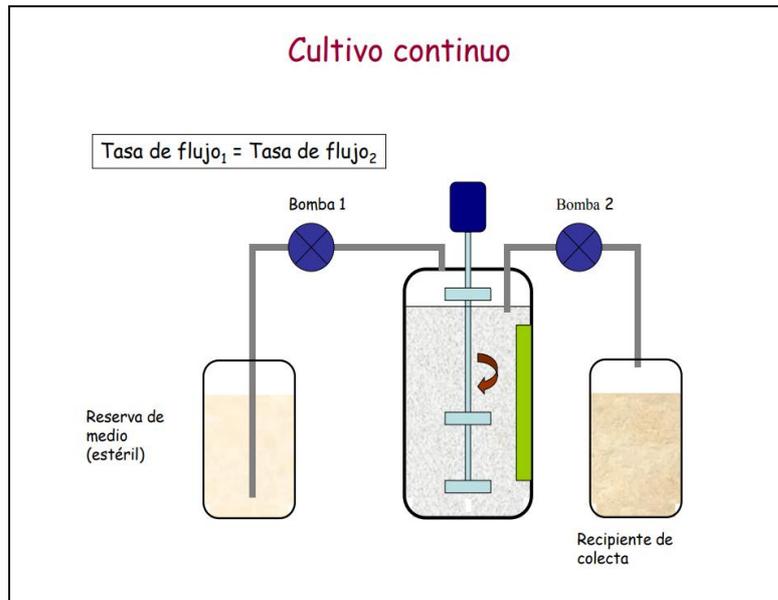


Figura 6. Fermentación en un sistema de cultivo continuo.

Fuente: Tomado de UNAM. Dpto. de Fisicoquímica

3.5 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

La MSR permite la optimización de procesos basada en diseños factoriales de procedimiento secuencial, utilizadas para tratar respuestas de interés de carácter cuantitativo. Además, consiste en diseñar experimentos y determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos obtenidos (71).

Por lo tanto, el objetivo principal de esta metodología es determinar las condiciones óptimas de un proceso que satisfagan los requerimientos de operación y establecer los valores de las variables independientes que optimizan el valor de la variable de respuesta (Figura 7).

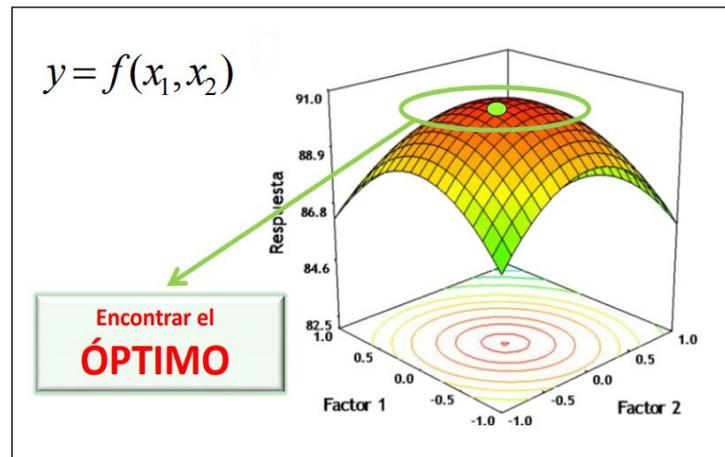


Figura 7. Metodología de superficie de respuesta (MSR)

Fuente: Adaptado de Myers y col (2016)

3.5.1 Definición

a. Superficie de respuesta

Es la representación geométrica de la función objetivo. La relación entre el eje Y (variable dependiente) y los niveles ubicados en el eje X (X_1 y X_2 factores) representan una superficie (Figura 8). Con los modelos matemáticos, podemos aproximarnos a ella como la superficie de respuesta predicha, representación geométrica de un modelo (72).

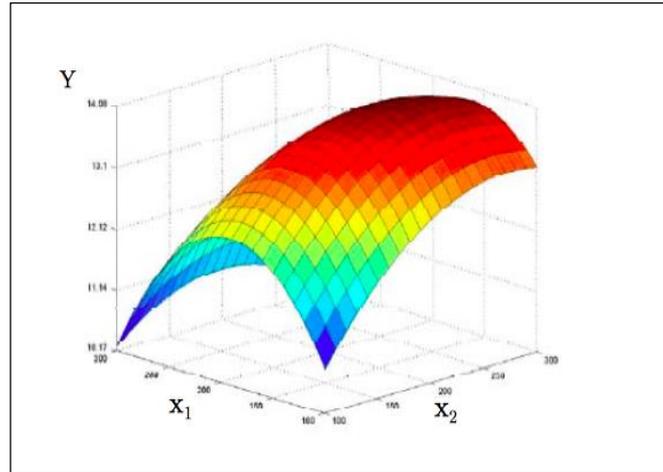


Figura 8. Superficie de respuesta tridimensional.

b. Contorno de gráficos

Es una gráfica que permite observar la forma de una superficie de respuesta en tres dimensiones. Presentan líneas de contorno que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano X_1X_2 . Cada curva representa un valor específico de la altura de la superficie, es decir un valor específico \hat{Y} (73).

La figura 9 representa una gráfica de contorno donde se puede visualizar bidimensionalmente la superficie y los valores específicos de cada respuesta que son producto de la conexión de cada factor. Existen diferentes graficas de contornos como la de patrón máximo simple, patrón minimax y patrón de cresta ascendente. En este caso se puede observar un patrón de cresta ascendente que mientras aumenta la respuesta, el color se oscurece; este tipo de gráfica se da cuando la respuesta aumenta producto del incremento de uno de los factores mientras el otro disminuye al mismo tiempo.

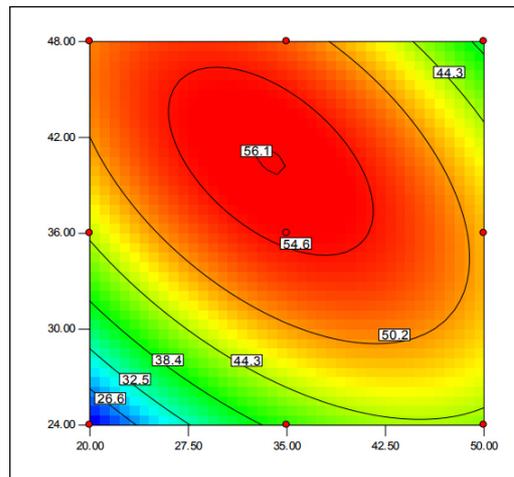


Figura 9. Gráfica de contorno

Fuente: Tomado de Statgraphics

c. Falta de ajuste

La falta de ajuste evalúa si una relación curvilínea podría ajustar mejor a los datos que un modelo lineal, es decir si en caso la relación funcional entre los factores y la variable de respuesta no se pueden escribir correctamente lo adecuado sería utilizar un mejor modelo donde se agregue otros términos (74).

Si el valor p es menor o igual que α , se concluye que el modelo no se ajusta con precisión a los datos. En cambio, si el valor p es mayor que α , el modelo lineal utilizado es el adecuado.

d. Análisis de varianza (ANOVA)

Se refiere a un conjunto de situaciones experimentales y procedimientos estadísticos para el análisis de respuestas cuantitativas de unidades experimentales (75).

3.5.2 Aplicación de MSR

MSR se puede aplicar a nivel industrial y de laboratorio donde se observa que es posible ejecutarlo en distintos procesos, así como en las mejoras de los productos existentes evidenciándose una mejor calidad, eficiencia en el rendimiento, reducción de tiempos y costos en el desarrollo de ensayos y/o el proceso (71,76)

3.5.3 Etapas de la optimización

El proceso de optimización consta de 3 etapas, la primera consiste en realizar un *screening* seguidamente de la elección del diseño experimental secuencial (Diseño simplex en escalamiento ascendente, Método del ascenso más pronunciado, etc.) y finalmente realizar la adecuación al modelo de segundo orden.

A continuación la secuencia de pasos desarrollados en las 3 etapas antes mencionadas:

- Definir los objetivos de la optimización, es decir se debe plantear el problema a resolver y la respuesta a evaluar.
- Seleccionar los factores que son significativos (Etapas de *screening* o etapa 1)
- Se debe establecer la región de operabilidad y entorno experimental el cual debe estar dirigido hacia el entorno del óptimo.
- Construir el diseño experimental de optimización (Método del ascenso más pronunciado o etapa 2).
- Utilizar modelos de segundo orden cuando se encuentre en la región del óptimo (optimización final o etapa 3).
- Realizar una gráfica de superficie de respuesta.
- Verificar los resultados (Respuesta optimizada).

a. Screening

Al inicio de un proceso de optimización, diferentes factores pueden influir en la variable de respuesta en estudio, por ello es necesario identificar a los factores estadísticamente significativos que evidencien un aumento en la eficacia del proceso. Dentro de los diseños más usados tenemos a los diseños factoriales 2^k , factoriales fraccionados y al diseño Plackett – Burman (72)

a.1 Diseño factorial

El diseño factorial es la construcción de tratamientos (experimentos) donde se seleccionan factores (k) y sus niveles (n) y la combinación de ellos, establece n^k ensayos por corrida (77). Estos diseños sirven para identificar los factores significativos y sus interacciones.

El diseño factorial puede ser completo o fraccionado. En el caso de diseños factoriales completos, se realizan todas las posibles combinaciones de cada factor. Si sólo se

corriese una parte del total de las combinaciones, el diseño factorial es fraccionado.

	x_1	x_2		x_1	x_2	x_3		x_1	x_2	x_3	x_4
1	-	-		1	-	-		1	-	-	-
2	+	-		2	+	-		2	+	-	-
3	-	+		3	-	+		3	-	+	-
4	+	+		4	+	+		4	+	+	-
				5	-	-	+	5	-	-	+
				6	+	-	+	6	+	-	+
				7	-	+	+	7	-	+	+
				8	+	+	+	8	+	+	+
								9	-	-	-
								10	+	-	-
								11	-	+	-
								12	+	+	-
								13	-	-	+
								14	+	-	+
								15	-	+	+
								16	+	+	+

Figura 10. Matriz de experimentos para los diseños factoriales completos 2^2 , 2^3 y 2^4

Fuente: Tomado de Ioan Ferré (2011)

La figura 10 representa las posibles combinaciones que uno puede obtener de acuerdo con el número de factores evaluados cuando se trabaja con diseños factoriales completos. La matriz comprende 2^k filas ($2 \cdot 2 \cdot \dots \cdot 2 = 2^k$ experimentos) y k columnas, que corresponden a los k factores en estudio (78).

a.2 Diseño Plackett - Burman

Diseño factorial incompleto de dos niveles, este diseño se puede utilizar cuando se trabaja con varios factores (k) porque el número de experimentos que da es igual a $K+1$; no obstante, los efectos principales pueden confundirse con las interacciones de 2 factores o entre sí generando un fenómeno conocido como construcción de “*aliasing*” (79). Por lo que la claridad del diseño se ve afectado en cuanto al papel que juegan los factores principales e interacciones en el modelo final en comparación con los diseños factoriales completos; para ello es conveniente incorporar al diseño variables “*dummy*” (factores no utilizados) para evitar dicha confusión. Además, se recomienda la aplicación de este diseño para estudios de robustez o cuando se realiza ensayos demasiados costosos (80).

		K						
		A	B	C	D	E	F	G
N	Corrida							
	1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
	2	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
	3	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
	4	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
	5	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
	6	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
	7	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	

Figura 11. Diseño Plackett - Burman de 8 experimentos y 7 factores

Fuente: Adaptado de Cortés (2013)

El número de experimentos (N) que arroja este diseño siempre es un múltiplo de 4, donde N es igual al n° de factores (K) aumentado en 1, por lo que en total se tendrán K+1 corridas, como mostrado en matriz representada en la figura 11.

b. Escalamiento

b.1 Método del ascenso más pronunciado

Es un procedimiento para recorrer secuencialmente la trayectoria de la máxima pendiente, que nos lleva en dirección del máximo aumento de la respuesta (73). Se establece un punto de origen desde donde se empezará a recorrer la trayectoria de ascenso, de esta manera se realiza un diseño de primer orden, que puede ser un diseño factorial en donde el punto central puede coincidir con el punto de origen. Si el modelo de primer orden es adecuado, esto se utiliza para direccionar mayores valores de la variable y observar la respuesta.

La falta de ajuste del modelo de primer orden nos indica que se ha llegado a la región del óptimo lo que nos conlleva a realizar modelos de segundo orden para obtener información más precisa del óptimo (73).

El procedimiento de la construcción de la secuencia experimental incluye diseños factoriales de primer orden (81).

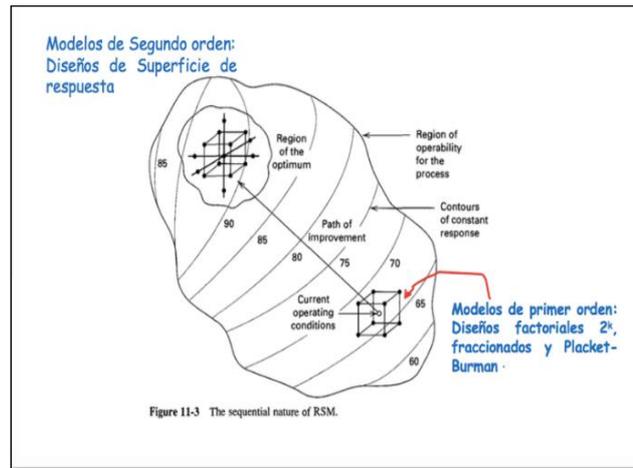


Figura 12. Carácter secuencial de la metodología de superficie de respuesta.

Fuente: Adaptado de Montgomery (2002)

La representación gráfica (Figura 12) nos muestra el procedimiento secuencial de la MSR, cuando el experimentador se encuentra en una zona alejada del óptimo se tiene que seguir una serie de pasos hasta llegar a la zona óptima.

c. Ajustes de modelos de segundo orden

c.1 Diseño Box-Behnken

El diseño Box- Behnken es descrito porque es una alternativa al diseño compuesto central descrita por Box y Behnken que consiste en correr solamente 3 niveles de los factores y que el diseño sea rotatable. Este diseño combina diseños factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. El diseño es utilizado cuando el experimentador está buscando solamente las mejores condiciones de su proceso elaborando la combinación de sus factores y cuando se conoce la zona de operación segura del proceso (71).

El diseño se ilustra en la figura 13 donde se puede observar que es un diseño esférico el cual no contiene ningún punto en los vértices de la región cubica.

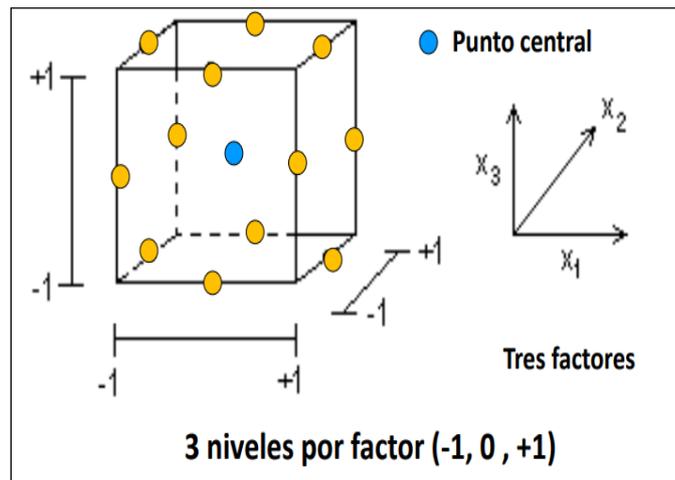


Figura 13. Diseño Box-Behnken para $k=3$
Fuente: Adaptado de Montgomery (2002)

c.2 Diseño central compuesto (DCC)

DCC consta de un diseño factorial a dos niveles donde se le agrega a cada factor dos puntos axiales que se ubican por debajo y por encima de los niveles mínimo y máximo respectivamente (observar la representación en la Figura 14). El diseño central compuesto puede tener diferentes propiedades como ortogonalidad, rotabilidad y uniformidad (71). Según Montgomery (2004) (73), el valor de α depende del número de puntos en la porción factorial del diseño. En este trabajo fue utilizado este diseño en la metodología de superficie de respuesta.

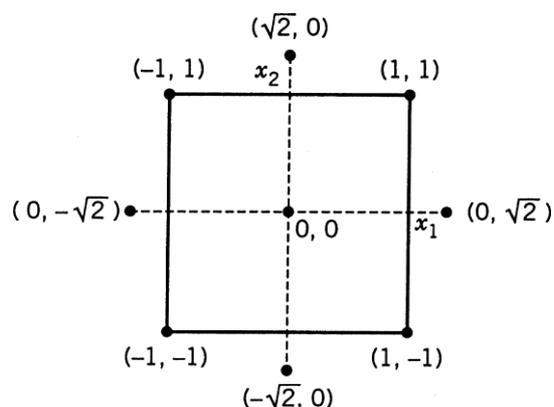


Figura 14. DCC para $K=2$ y $\alpha = \sqrt{2}$.

Fuente: Tomado de Myers y col (2016).

En el caso de la figura 14, muestra el DCC para $k = 2$, donde la distancia axial (α) es $\sqrt{2}$. Este diseño representa ocho puntos igualmente espaciados en un círculo más el punto central obteniendo un total de 9 experimentos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis y pruebas de este trabajo se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.1 Materiales

Los materiales, reactivos y equipos utilizados se encuentran descritos en el anexo 1.

4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Determinación de masa celular

La cuantificación de biomasa se realizó por el método de turbidimetría y masa seca (82).

Se tomaron 500 μL de muestra y se realizaron diluciones (Figura 15), las cuales fueron medidas en el espectrofotómetro a 620 nm y las absorbancias obtenidas fueron calculadas de la curva de Mc Farland para ser expresadas en concentración celular $\times 10^8$ UFC/mL. Las mediciones fueron realizadas a 620 nm de longitud de onda (Anexo 2).

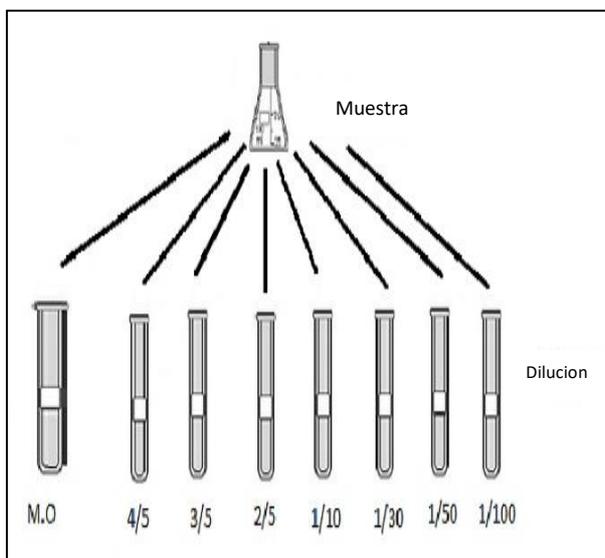


Figura 15. Metodología de turbidimetría

Por otro lado, la medición de biomasa seca se realizó tomando 5 mL de muestra en un tubo limpio y seco previamente pesado, se centrifugó a 5000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante. Las células fueron lavadas y sometidas nuevamente a centrifugación (5000 g por 10 min), este procedimiento se repitió dos veces; finalmente, las células se secaron a 105 °C por 5 h y hasta obtener un peso constante de la masa (Figura 16).

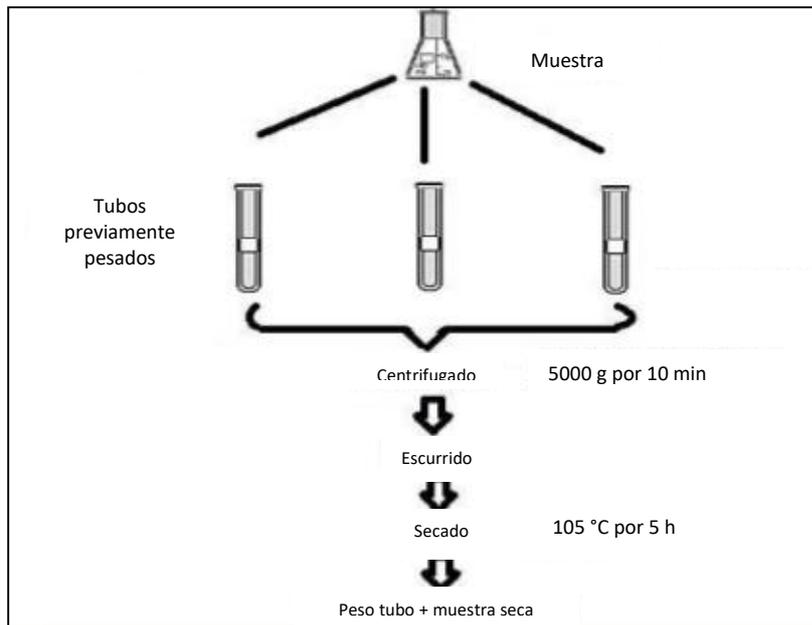


Figura 16. Metodología de biomasa seca

La biomasa seca fue expresada en g/L y se calculó de la siguiente manera (1):

$$X \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{W_{M+T} - W_T}{V} \quad | \quad (1)$$

Donde W_{M+T} es la masa en g de la muestra más el tubo; W_T , la masa en g del tubo donde se coloca la muestra; y V , el volumen de la muestra inicial en L.

4.2.2 Determinación de azúcares totales

Se determinó la concentración de azúcares totales por el método de antrona descrito por Dreywood (1946) con algunas modificaciones (83).

Se preparó el reactivo de antrona al 0,2 % en ácido sulfúrico concentrado. En 30 mL de ácido sulfúrico concentrado y frío disolver poco a poco 0,1 g de antrona en agitación, luego aforar a 50 mL con el ácido. Las muestras obtenidas de la fermentación fueron centrifugadas previamente, del sobrenadante se tomó 500 μL y se colocó en microtubos de 2 mL colocados sobre hielo, a estos tubos se les adiciono 1 mL del reactivo de antrona. Enseguida se homogenizó la mezcla, y se colocó sobre hielo, después, los tubos se transfirieron a un baño de agua en ebullición durante 5 min. Después, los tubos se colocaron sobre hielo, una vez enfriados se procedió a realizar la medición a una longitud de onda de 640 nm (Anexo 3).

4.2.3 Determinación de ácido láctico

Se determinó ácido láctico por dos métodos: titulación y colorimetría.

El método de titulación se realizó según la técnica oficial AOAC (1999), que consiste en una volumetría ácido-base, que valora la acidez de la fermentación, expresada en g de ácido láctico por cada litro de muestra fermentada (84).

Se colocaron 10 mL del sobrenadante de fermentación (previamente centrifugado) en un matraz de 100 mL, después se agregó una gota del indicador de fenolftaleína e inmediatamente se tituló con NaOH 0,1 N. Cuando se observó la solución rosado rocella se finalizó la titulación y el volumen gastado fue utilizado para el cálculo del ácido láctico, según la siguiente fórmula:

$$\text{g/L de ácido láctico} = \frac{V \cdot N \cdot 90}{M} \quad (2)$$

Donde V es el volumen gastado de NaOH; N, la normalidad de NaOH; y M, el volumen de muestra.

En la segunda parte del trabajo, se empleó el método de cloruro férrico modificado descrito por Pacios (2009), que se basa en la formación de un complejo (color amarillo) formado por la reacción entre los iones férricos y los hidroxiacidos, cuya intensidad es equivalente a la cantidad de ácido láctico presente en la muestra (85).

Se preparó una solución de cloruro férrico agregando 0,5 g de FeCl₃, 1 mL HCl 0,1N y se enrasó hasta 50 mL con agua destilada, durante todo el procedimiento se protegió el reactivo de la luz. Del cultivo, se utilizó el sobrenadante libre de células, al cual se añadió carbonato de calcio al 1,5 % y luego se calentó a 50 °C por 5 min. Después, se centrifugó, y a 1 mL del sobrenadante se añadió 1 mL de la solución de cloruro férrico. La lectura se realizó a 440 nm. La cuantificación se realizó en forma de lactato debido a que las muestras no fueron sometidas a un proceso de separación del ácido láctico (Anexo 4).

4.3 Metodología experimental

4.3.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la reactivación y activación de los inóculos fue el caldo MRS, cuya composición se encuentra en la tabla 3. El medio MRS fue creado por De Man, Rogosa y Sharpe (1960) para obtener un buen crecimiento de *Lactobacillus* y de

otras BAL. En ensayos posteriores se utilizó melaza de caña y otros medios de cultivo que han sido seleccionados para los respectivos ensayos.

Tabla 3. Composición de caldo MRS

Componentes	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	10,00
Extracto de carne	8,00
Extracto de levadura	4,00
Glucosa	20,00
K ₂ HPO ₄	2,00
Tween 80	1,00
Di- amonio-hidrogenocitrato	2,00
Acetato sódico	5,00
Sulfato de magnésico	0,20
Sulfato de manganeso	0,04

Fuente: Merck

4.3.2 Microorganismo utilizado

En la etapa de selección se utilizaron 13 cepas de BAL del género *Lactobacillus* aislados de frutos de la región Loreto, estos microorganismos pertenecen al cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los frutos de donde se aislaron las BAL fueron: Huito (*Genipa americana*), Cocona (*Solanum sessiliflorum*), Guayaba (*Psidium guajava*), Ungurahui (*Oenocarpus bataua*), Humari (*Poraqueiba sericea*), y Aguajillo (*Mauritia aculeata Kunth*).

Las cepas Hui1, Hui2 Hui3 Hui4 son procedentes del fruto huito (*Genipa americana*); Agu2 y Agu3 del fruto aguajillo (*Mauritia aculeata Kunth*); Coc5 de la cocona (*Solanum sessiliflorum*); Gua1 de la guayaba (*Psidium guajava*); Hum1 y Hum2 del humari (*Poraqueiba sericea*) y Ung1, Ung2, Ung4 proceden del unguurahui (*Oenocarpus bataua*) (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas bacterianas aisladas de frutos

Fruto	Código de la cepa
Huito	Hui 1
	Hui 2
	Hui 3
	Hui 4
Aguajillo	Agu 2
	Agu 3
Cocona	Coc 5
Guayaba	Gua 1
Humari	Hum 1
	Hum 2
Ungurahui	Ung 1
	Ung 2
	Ung 4

4.3.3 Preparación y selección del microorganismo utilizado

a. Reactivación de la cepa

Se utilizó el caldo MRS como medio de pre-enriquecimiento. Cada una de las 13 cepas fueron inoculadas en tubos que contenían 2 mL del medio, e incubados a 30° C por 24 h.

b. Activación de la cepa

Las cepas reactivadas fueron inoculadas en tubos que contenían 2 mL de medio MRS, y se incubaron a 30 °C por 24 h.

c. Selección de la cepa

Se empleó el método de Chen y col (2010)(86) con algunas modificaciones. Este método tiene como fundamento la reacción entre el carbonato de calcio y la acidez producida por la bacteria durante su crecimiento en agar MRS; mientras ocurre la reacción se puede observar un halo producto de la reacción del carbonato de calcio con el ácido secretado por la bacteria; por lo tanto, a mayor acidez producida se evidenciará un mayor halo. La metodología de Chen fue modificada utilizando la técnica del sacabocado donde un volumen determinado de ácido láctico se inoculó en un pocillo y se midió el diámetro del

halo generado. Además, se utilizó una solución estándar de ácido láctico como control positivo para corroborar lo que indicaba dicha técnica.

Los inóculos activados fueron transferidos a matraces de 100 mL que contenían 20 mL del medio de cultivo. Los cuales fueron incubados a 30 °C por 24 h en agitación a 150 rpm. Luego las células fueron centrifugadas a 5000 g por 10 min. Posteriormente, en placas con agar suplementadas con carbonato de calcio al 0,1 %, se formaron pocillos de 5 mm mediante la técnica del sacabocado, en el cual se inoculó el sobrenadante obtenido de la fermentación. Después de 24 h se midió los diámetros de halos formados.

4.3.4 Curva de crecimiento de microorganismo seleccionado

Para determinar los parámetros cinéticos del crecimiento del microorganismo seleccionado y establecer el tiempo de cultivo previo a la fase de fermentación, fue elaborada la curva de crecimiento. Se inoculó la cepa en tubos de ensayos conteniendo 2 mL de caldo MRS e incubó a 30 °C por 24 h, luego se realizó un segundo pasaje a otro tubo de ensayo y se incubó en las condiciones antes descritas. Después fue transferido el contenido de este cultivo (2 mL) a un matraz de 100 mL que contenía 20 mL de caldo MRS y se incubó a 30 °C. En condiciones estériles, se tomaron alícuotas de 500 µl cada dos horas durante 26 h. Las muestras tomadas fueron diluidas y medidas en el espectrofotómetro a 620 nm.

4.3.5 Etapa de producción de ácido láctico

Se preparó el inóculo realizando dos pasajes sucesivos de la cepa en caldo MRS, posteriormente se transfirió 2 mL del pasaje anterior a un matraz que contenía 20 mL del mismo medio. Se dejó incubando durante 10 h y se centrifugó a 2000 g por 10 min. El pellet obtenido fue lavado dos veces consecutivas con buffer fosfato 50 mM pH 7 y al finalizar fue suspendido en 1 mL del mismo buffer fosfato en condiciones estériles. A partir de esta suspensión celular, se inició el cultivo a una concentración celular inicial de 10^9 UFC /mL en el medio de fermentación. Este procedimiento se realizó para todos los diseños de producción y optimización de ácido láctico (Anexos 5 y 6) (Figura 17).

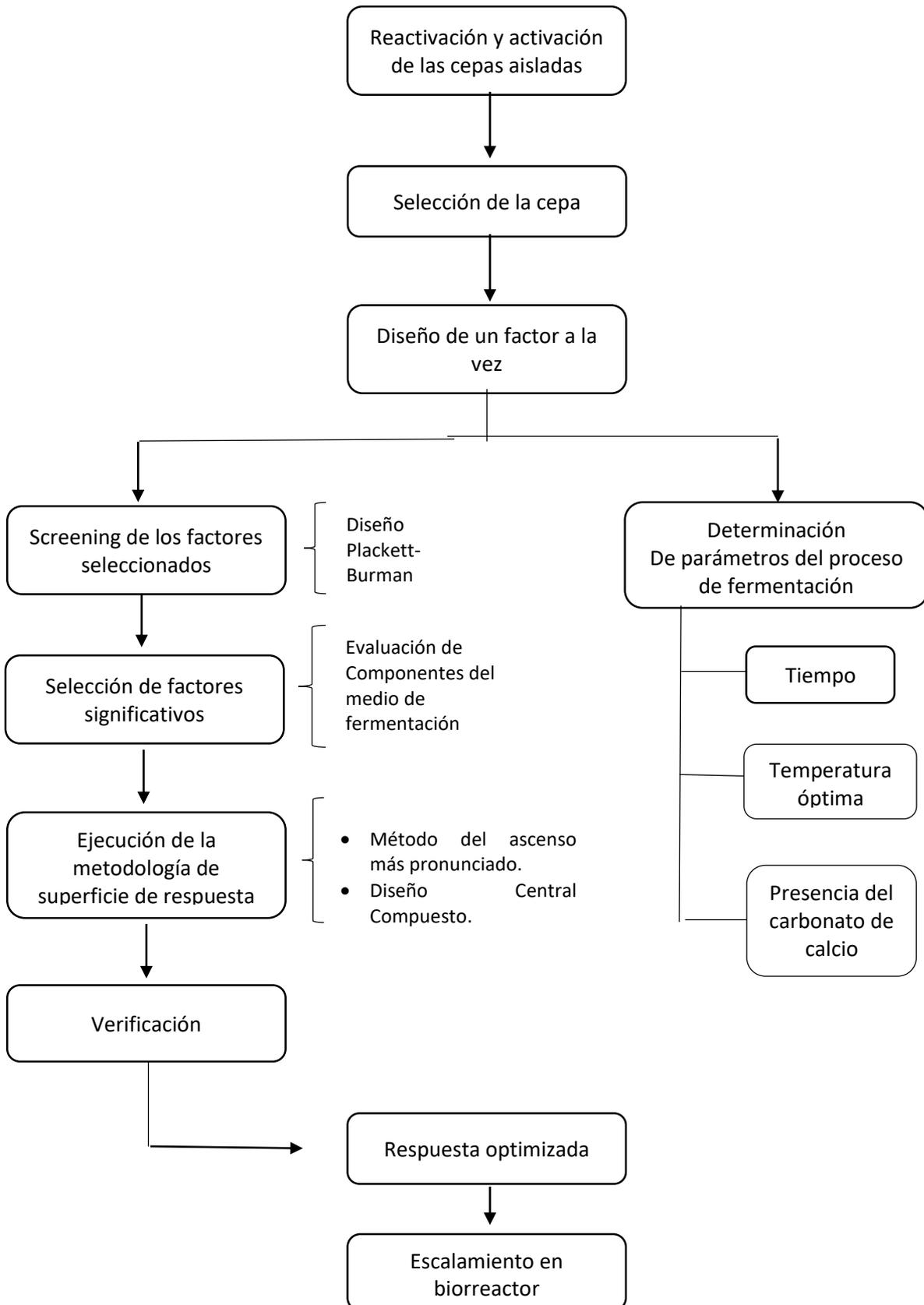


Figura 17. Esquema de la optimización de la producción de ácido láctico.

4.3.6 Diseño de un factor a la vez

Se evaluaron diferentes tipos de nutrientes (fuentes de carbono, nitrógeno e iones) con la finalidad de determinar la influencia de cada factor sobre la producción de ácido láctico, la significancia con respecto a los demás factores. Las fuentes de carbono, nitrógeno e iones están en la tabla 5.

Se utilizó un medio de cultivo base constituido por medio MRS a una concentración de 2,6 g/L, el cual fue suplementado con los diferentes factores (Tabla 5), en el caso de las fuentes de nitrógeno, citrato de amonio y acetato de sodio además del medio base fueron suplementadas con glucosa. La concentración de ácido láctico fue determinada por titulación ácido - base.

Tabla 5. Fuentes de carbono, nitrógeno e iones del medio de cultivo de *Lactobacillus* sp.

Factores					
Fuente de carbono	Concentración (g/L)	Fuente de nitrógeno	Concentración (g/L)	Fuente de iones	Concentración (g/L)
Acetato de sodio	12	Extracto de carne	4	K ₂ HPO ₄	0,5
Almidón					
Jugo de caña de azúcar					
Celobiosa					
Citrato de amonio		Extracto de levadura		MnSO ₄	0,05
Fructosa					
Galactosa					
Glucosa		Peptona bacteriológica		MgSO ₄	0,01
Lactosa					
Maltosa					
Melaza de caña		Peptona de caseína			
Sacarosa					
Tween 80					

4.3.7 Efecto de la temperatura, tiempo de fermentación y presencia de carbonato de calcio en la producción de ácido láctico

La temperatura, el tiempo de fermentación y la regulación del pH son factores de control crítico para maximizar las concentraciones de ácido láctico (Tabla 6).

Se evaluaron dos temperaturas a 30 °C y 37 °C utilizando un medio constituido por caldo MRS a una concentración de 2,6 g/L suplementado con melaza de caña (azúcares totales 100 g/L) durante un tiempo de fermentación de 24 h (Tabla 7).

Una vez definida la mejor temperatura se evaluó el tiempo y la influencia del carbonato de calcio (Tabla 8). Los tiempos de fermentación fueron 22, 46, 72, 94 y 118 h; y la influencia del carbonato de calcio fue al 1,5% manteniendo el pH del medio en 6,5 hasta su agotamiento. La determinación de ácido láctico fue realizada por el método del cloruro férrico modificado.

Tabla 6. Parámetros determinados en el proceso fermentativo de *Lactobacillus* sp.

Parámetro	Rango
Temperatura (°C)	30
	37
Tiempo (h)	22
	46
	72
	96
	118
Carbonato de calcio (%)	1,5

Tabla 7. Determinación de la mejor temperatura de fermentación de *Lactobacillus* sp.

Variable	Rango	Condiciones de trabajo
Temperatura (°C)	30	Medio base 2,6 g / L Melaza de caña (100 g / L de azúcares totales presentes) pH 6,5
	37	

Tabla 8. Variables determinadas del proceso de fermentación

Variable	Rango	Variable	Condiciones de trabajo
Tiempo (h)	22	Con carbonato de calcio	Temperatura: 37° C Medio base 2,6 g /L Melaza de caña (100 g / L de azúcares totales presentes) pH: 6,5
	46		
	72		
	96		
	118		
	22	Sin carbonato de calcio	
	46		
	72		
	96		
	118		

4.3.8 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para obtener un mejor medio de cultivo

La producción de ácido láctico se realizó en dos etapas, en la primera se diseñó Plackett-Burman para identificar la influencia de los componentes en la formación de ácido láctico. Y en la segunda, se desarrolló la metodología de superficie de respuesta utilizando el método del ascenso más pronunciado donde se realizaron modelos de primer orden (diseño factorial) y el diseño central compuesto (DCC) que corresponde a un modelo de segundo orden, finalmente se determinaron las concentraciones óptimas de los factores para la producción optimizada de ácido láctico.

a. Screening mediante el diseño Plackett- Burman

El diseño Plackett – Burman descrito por los mismos, fue diseñado para establecer si el resultado de un procedimiento analítico se ve afectado por cambios en cada factor relevante, se estudian $K = N-1$ variables, donde K es el número de factores, N es el número de experimentos y múltiplo de 4 (87).

Los medios seleccionados en el diseño de un factor a la vez fueron utilizados en el diseño de Plackett – Burman, el cual se utilizó para establecer los efectos de los factores cuyo diseño fue de 2^{7-1} , cuyos factores fueron: extracto de carne, peptona de caseína, sulfato de magnesio, acetato de sodio, sulfato de manganeso, citrato de amonio y fosfato di potásico. Se trabajó en matraces de 25 mL (20 mL de medio de cultivo) y las

concentraciones utilizadas fueron a dos niveles, un nivel máximo y un nivel mínimo en variables codificadas (+1, -1) (Tabla 9).

Una vez definidas las variables independientes, se utilizó el software Statistica 10 para análisis estadístico, donde se estableció la matriz (Tabla 10) para el diseño Plackett - Burman, que muestra un total de 8 ensayos correspondientes a la aleatorización de los 7 factores (variables independientes) en dos niveles y con una réplica, y 2 ensayos que corresponden a los puntos centrales del diseño matriz. La Tabla 10 muestra los rangos y la matriz establecida en variable codificada y variable natural.

Tabla 9. Variables y niveles usados en el diseño Plackett-Burman para el cultivo de *Lactobacillus* sp.

Variables independientes		Variables codificadas	
		Nivel bajo	Nivel alto
		-1	+1
X ₁	Extracto de carne	1	10
X ₂	Peptona de caseína	1	10
X ₃	Citrato de amonio	0	2
X ₄	Acetato de sodio	0	5
X ₅	Sulfato de magnesio	0	0,2
X ₆	Sulfato de manganeso	0	0,05
X ₇	Fosfato dipotásico	0	2

Donde:

Los valores de las variables independientes se encuentran expresadas en concentración g/L.

Tabla 10. Diseño de Plackett-Burman en variable codificada y variable natural con una réplica.

Matriz														
Nº ensayos	Variables codificadas							Variables Naturales (g/L)						
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Extracto de carne	Peptona de caseína	Citrato de amonio	Acetato de sodio	Sulfato de magnesio	Sulfato de manganeso	Fosfato dipotasico
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	1,0	1,0	0,0	5,0	0,2	0,05	0
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	10,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,05	2
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	1,0	10,0	0,0	0,0	0,2	0,00	2
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	10,0	10,0	0,0	5,0	0,0	0,00	0
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	1,0	1,0	2,0	5,0	0,0	0,00	2
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	10,0	1,0	2,0	0,0	0,2	0,00	0
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	1,0	10,0	2,0	0,0	0,0	0,05	0
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	10,0	10,0	2,0	5,0	0,2	0,05	2
9	0	0	0	0	0	0	0	5,5	5,5	1,0	2,5	0,1	0,025	1
10	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	1,0	1,0	0,0	5,0	0,2	0,05	0
11	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	10,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,05	2
12	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	1,0	10,0	0,0	0,0	0,2	0,00	2
13	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	10,0	10,0	0,0	5,0	0,0	0,00	0
14	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	1,0	1,0	2,0	5,0	0,0	0,00	2
15	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	10,0	1,0	2,0	0,0	0,2	0,00	0
16	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	1,0	10,0	2,0	0,0	0,0	0,05	0
17	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	10,0	10,0	2,0	5,0	0,2	0,05	2
18	0	0	0	0	0	0	0	5,5	5,5	1,0	2,5	0,1	0,025	1

b. Metodología de superficie de respuesta: Método del ascenso más pronunciado

b.1 Trayectoria de ascenso

Se realizó un modelo factorial 2^2 con una réplica y dos puntos centrales, para ello se emplearon dos factores en dos niveles de concentración, los cuales se encontraban en el rango citado por la bibliografía. Se trabajó en matraces de 25 mL (20 mL de medio de cultivo) en las condiciones establecidas. La matriz del diseño se encuentra en la tabla 11.

Tabla 11. Diseño factorial 2^2 de extracto de carne y peptona de caseína para la producción de ácido láctico

Matriz				
N° ensayos	Variables codificadas		Variables naturales	
	X ₁	X ₂	(g/L)	
			Extracto de carne	Peptona de caseína
1	-1	-1	1,0	1,0
2	1	-1	10,0	1,0
3	-1	1	1,0	10,0
4	1	1	10,0	10,0
5	0	0	5,5	5,5
6	-1	-1	1,0	1,0
7	1	-1	10,0	1,0
8	-1	1	1,0	10,0
9	1	1	10,0	10,0
10	0	0	5,5	5,5

* Fuente de carbono: melaza de caña con 100g/L de azúcares totales presentes

Posteriormente, se realizó la trayectoria de ascenso hasta que la variable de respuesta no muestre un incremento. Se realizaron cinco pasos sobre dicha trayectoria, una vez definido el rango de concentraciones de las variables independientes donde se observa los máximos valores de la variable dependiente; se trabajó un nuevo diseño factorial 2^2 con 4 puntos centrales en total, donde finalmente se logró conseguir la cercanía a los valores óptimos (Tablas 12, 13).

Tabla 12. Pasos de la trayectoria de ascenso

Pasos	Variables Codificadas		Variables Naturales (g/L)	
	X_1	X_2	ϵ_1	ϵ_2
Origen	0	0,0	5,5	5,5
Δ	1	0,3	5,0	1,0
Origen + Δ	1	0,3	10,5	6,5
Origen + 2Δ	2	0,6	15,5	7,5
Origen + 3Δ	3	0,9	20,5	8,5
Origen + 4Δ	4	1,2	25,5	9,5
Origen + 5Δ	5	1,5	30,5	10,5

Tabla 13. Diseño factorial 2² de extracto de carne y peptona de caseína para la producción de ácido láctico

Matriz				
N° ensayos	Variables codificadas		Variables naturales (g/L)	
	X ₁	X ₂	Extracto de carne	Peptona de caseína
1	-1	-1	10,0	6,0
2	1	-1	25,0	6,0
3	-1	1	10,0	9,0
4	1	1	25,0	9,0
5	0	0	17,5	7,5
6	0	0	17,5	7,5
7	0	0	17,5	7,5
8	0	0	17,5	7,5

b.2 Producción mediante el diseño central compuesto (DCC)

En esta parte del trabajo, fueron evaluados dos variables independientes en cinco niveles y cinco repeticiones en el punto central. Las variables independientes se codificaron con la ecuación 3 donde X_i es el valor codificado de una variable independientes; ϵ_{pc} , el valor natural de una variable independiente en el punto central; ϵ_i , el valor natural de una variable independiente y $\Delta\epsilon_i$, la variación del cambio de valor en una variable independiente.

$$X_i = \frac{\epsilon_i - \epsilon_{pc}}{\Delta\epsilon_i} \quad (3)$$

Se realizaron un total de trece experimentos, hechos en matraces de 25 mL que contenían 20 mL del medio de producción. En la Tabla 14 se muestra el rango y los niveles de las variables estudiadas. El comportamiento del sistema se representa matemáticamente por el siguiente modelo de ecuación cuadrática:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i \chi_i + \sum \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum \beta_{ij} \chi_i \chi_j \quad (4)$$

La ecuación 4 corresponde a una ecuación de tipo cuadrática donde Y es la respuesta prevista de ácido láctico en g/L, β_0 es el intercepto, β_{ii} es el coeficiente de interacción, y las variables independientes corresponden a X_i y $X_i X_j$.

Se representa la matriz del diseño utilizado (Tabla 15).

Tabla 14. Rangos y niveles utilizados en el diseño central compuesto

Variable Independiente (g/L)	Código	Rangos y niveles				
		- 1.414*	-1	0	1	1.414*
Extracto de carne	X_1	12,34	14	18	22	23,66
Peptona de caseína	X_2	5,38	6	7,5	9	9,62

*Los valores $\pm 1,414$ corresponden a α que se obtienen de la $\sqrt{2}$

Tabla 15. Diseño central compuesto en variable codificada y natural para la producción de ácido láctico

Matriz				
N° ensayos	Variables codificadas		Variables Naturales (g/L)	
	X_1	X_2	Extracto de carne	Peptona de caseína
1	-1	-1	14,0	6,0
2	-1	+1	14,0	9,0
3	+1	-1	22,0	6,0
4	+1	+1	22,0	9,0

5	-1,414	0	12,34	7,5
6	+1,414	0	23,66	7,5
7	0	-1,414	18,0	5,38
8	0	+1,414	18,0	9,62
9	0	0	18,0	7,5
10	0	0	18,0	7,5
11	0	0	18,0	7,5
12	0	0	18,0	7,5
13	0	0	18,0	7,5

4.3.9 Escalamiento en biorreactor

a. Producción de ácido láctico en proceso por lotes

El biorreactor utilizado fue de tipo tanque agitado, empleando un modo de operación por lotes, con el cual se desarrolla la fermentación en un tiempo determinado. Con este tipo de biorreactor (Figura 18) se trabaja en estado no estacionario y se utiliza básicamente en pruebas de pequeña escala.

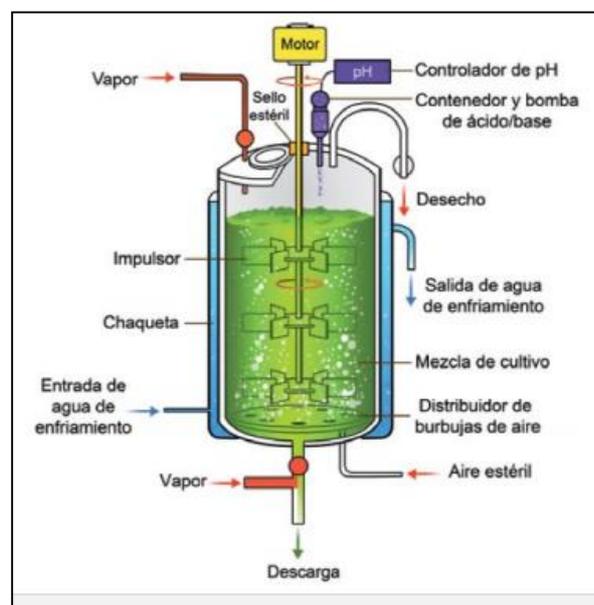


Figura 18. Partes de un biorreactor tipo tanque agitado.

Se reactivó la cepa en 2 mL de medio MRS y se incubó a 37 °C por 24 h. Luego se

transfirió el contenido del tubo a un matraz de 100 mL que contenía 40 mL del medio de cultivo MRS, y se incubó por 24 h a 37°C sin agitación, finalmente, el contenido fue transferido a un matraz de 500 mL que contenía 400 mL de caldo MRS. Se incubó a 37 °C durante 10 h sin agitación y una vez finalizada la incubación se realizó la preparación del inóculo. Se trabajó en un biorreactor APPLIKON de 3 L de capacidad total utilizando un volumen de trabajo de 2 L del medio de fermentación. Este medio estuvo constituido por melaza de caña, extracto de carne, peptona de caseína, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato dipotásico, acetato de sodio y carbonato de calcio; las concentraciones fueron establecidas en el proceso de optimización a nivel de matraces. Las condiciones del proceso fueron 37 °C, 300 rpm y pH inicial de 6,5 sin alimentación de oxígeno y un tiempo de 72 h. Se realizó la prueba sin control de pH, es decir, solamente se adicionó al inicio carbonato de calcio al 1,5% el cual fue disminuyendo conforme transcurrió la fermentación. Durante el ensayo fue monitoreado el ácido láctico, azúcares totales y la temperatura (Anexo 7).

b. Determinación del consumo de sustrato y formación de producto

Para determinar las curvas de consumo de sustrato y formación de producto se realizó la medición de azúcares totales, biomasa y ácido láctico producido. Los resultados obtenidos de cada curva sirvieron para definir el coeficiente de rendimiento de producto con respecto al sustrato mediante la siguiente ecuación.

Donde $Y_{p/s}$ es el rendimiento de sustrato en producto, P_0 y S_0 son las concentraciones iniciales de producto y sustrato de la fermentación en g/L. Es la relación del ácido láctico producido y el consumo de azúcares totales contenidos en la melaza de caña del medio de fermentación.

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (5)$$

La productividad (Q_p) del proceso fermentativo fue calculada de acuerdo a la ecuación 6 que se indica a continuación:

$$\text{Productividad de ácido láctico} = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (6)$$

La concentración de ácido láctico se estableció en g de ácido láctico producido por unidad de volumen del medio:

$$\text{Concentración de ácido láctico} = \frac{\text{Acido lactico (g)}}{V \text{ inicial del medio (L)}} \quad (7)$$

4.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del ensayo de un factor a la vez y de las pruebas de determinación de parámetros del proceso fermentativo fueron expresados cada uno con \pm error estándar y se analizó el ANOVA de un solo factor; seguidamente se realizó la prueba de Tukey de comparación múltiple, sólo para el ensayo de un factor a la vez y la prueba de Dunnett para la selección de la cepa con un nivel de confianza del 95 %.

Los resultados de los ensayos del diseño factorial fraccionado y de la optimización (MSR) se analizaron por ANOVA, donde además se elaboraron y analizaron las gráficas de Pareto, superficie de respuesta, valores calculados vs observados, y gráfica de contornos. El software Statistica 10 fue empleado para los análisis estadísticos donde ANOVA se trabajó con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Además, la falta de ajuste y el coeficiente de regresión lineal fueron evaluados para verificar si nuestros resultados se ajustan bien a los modelos de primer orden, y para explicar las respuestas obtenidas en cada diseño de acuerdo con el modelo utilizado.

V. RESULTADOS

Selección de cepa bacteriana

Se seleccionó la mejor cepa bacteriana productora de ácido láctico utilizando la metodología modificada de Chen y col (2010) midiendo el halo formado producto de la reacción. En la tabla 16 se observa el promedio de los diámetros de halos formados, la cepa Hui 1 presentó el mayor diámetro (Figura 20). Además, estadísticamente con la prueba de Dunnett (Anexo 8) se determinó que hubo diferencia significativa con respecto a las otras cepas. Por este motivo, Hui1 fue seleccionada para los posteriores ensayos (Figura 19).

Tabla 16. Diámetros de halos formados por cepas bacterianas productoras de acidez

Fruto	Código de la cepa	Promedio de diámetros de halos formados (mm)
Huito	Hui 1	12,33 \pm 0,88

	Hui 2	9,17 ± 0,44
	Hui 3	10,17 ± 0,44
	Hui 4	8,5 ± 0,50
Aguajillo	Agu 2	8,33 ± 0,17
	Agu 3	7,17 ± 0,17
Cocona	Coc 5	8,83 ± 0,17
Guayaba	Gua 1	8,67 ± 0,33
Humari	Hum 1	7,87 ± 0,07
	Hum 2	8,17 ± 0,44
Ungurahui	Ung 1	8,33 ± 0,17
	Ung 2	7,50 ± 0,29
	Ung 4	7,67 ± 0,17

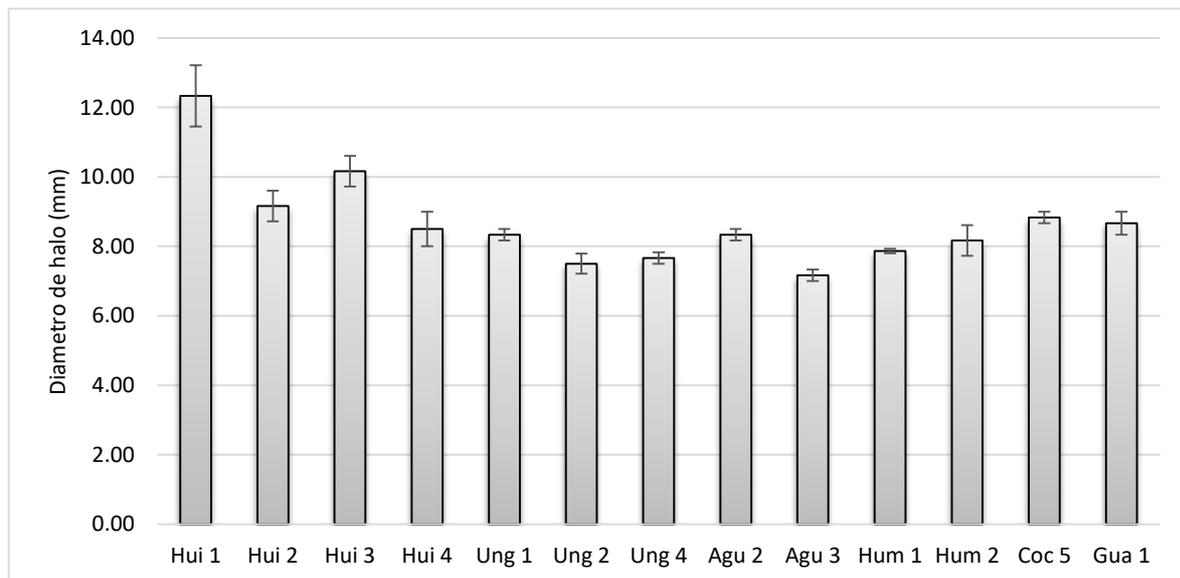


Figura 19. Diámetros de halos formados en placas con agar y carbonato de calcio.

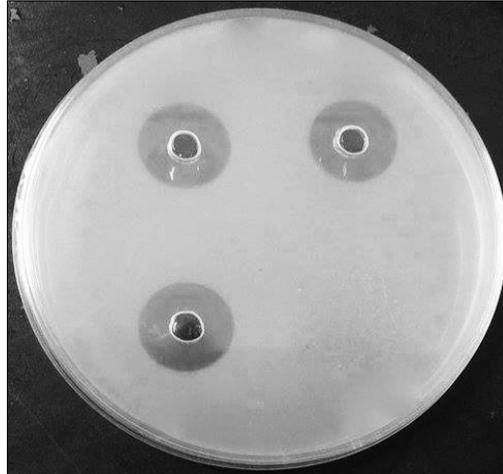


Figura 20. Halos formados por cepas bacterianas productoras de ácido láctico sobre agar carbonato de calcio

Curva de crecimiento de la cepa Hui 1

En la figura 21 se muestra que el microorganismo creció en el medio MRS a 30 °C y 150 rpm entre las 4 y 14 h, basado en esta curva de crecimiento, el cultivo de fermentación se inició a partir de inóculos de 10 h.

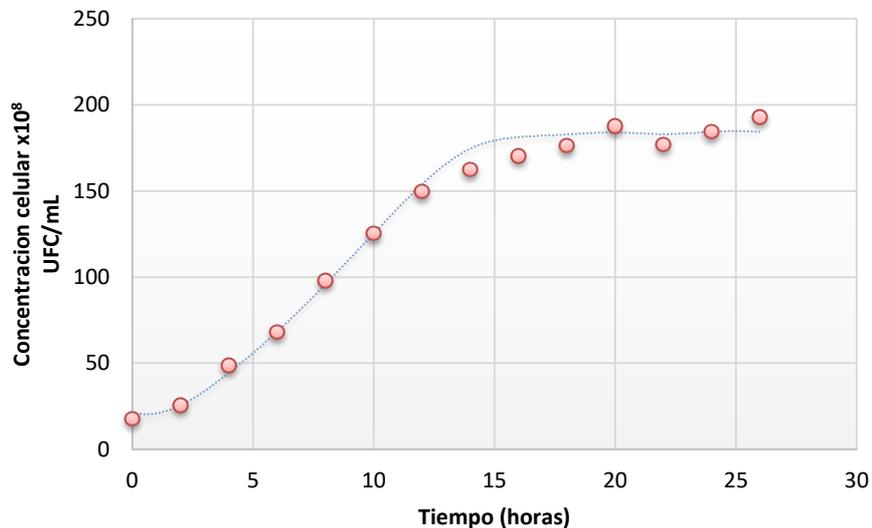


Figura 21. Curva de crecimiento microbiana

Diseño de un factor a la vez

La influencia de diferentes fuentes de carbono se muestra en la Figura 22, donde se determinó que la melaza y el acetato incrementan la producción hasta 9,59 y 10,88 g/L respectivamente. Según la prueba de Tukey, se obtuvo que los factores presentan diferencia significativa con respecto al medio base. Por lo tanto, en los siguientes ensayos se utilizó melaza de caña a una concentración de azúcares totales de 100 g/L; y en el caso del acetato de sodio y citrato de amonio se evaluaron en el diseño Plackett-Burman para los siguientes ensayos (Anexo 9).

De forma similar, se analizaron los componentes nitrogenados e iones, donde se obtuvo una mayor producción con el extracto de carne ($10,13 \pm 0,29$ g/L de ácido láctico) y peptona de caseína ($8,78 \pm 0,05$ g/L de ácido láctico). Con respecto a las fuentes de iones, el sulfato de magnesio, fosfato dipotásico, y sulfato de manganeso produjeron $5,9 \pm 0,45$; $6,75 \pm 0,18$ y $3,65 \pm 0,07$ g/L de ácido láctico respectivamente (Figura 23).

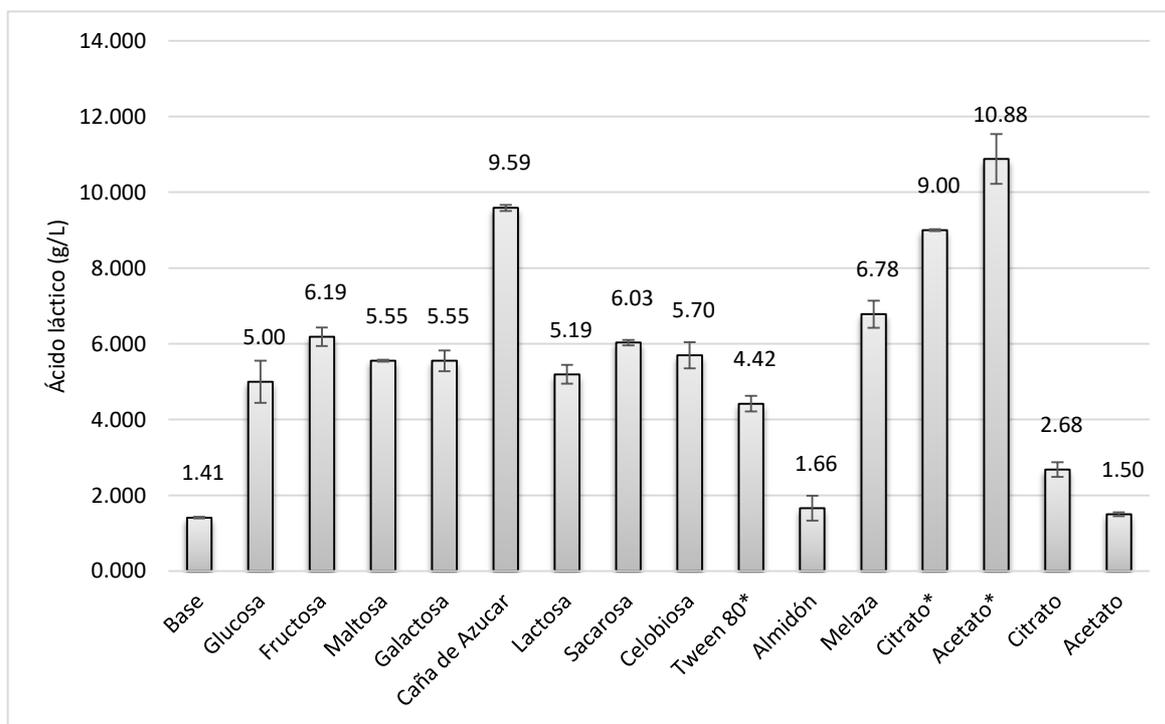


Figura 22. Efecto de las fuentes de carbono en la producción de ácido láctico por *Lactobacillus sp.*

*Suplementados con glucosa

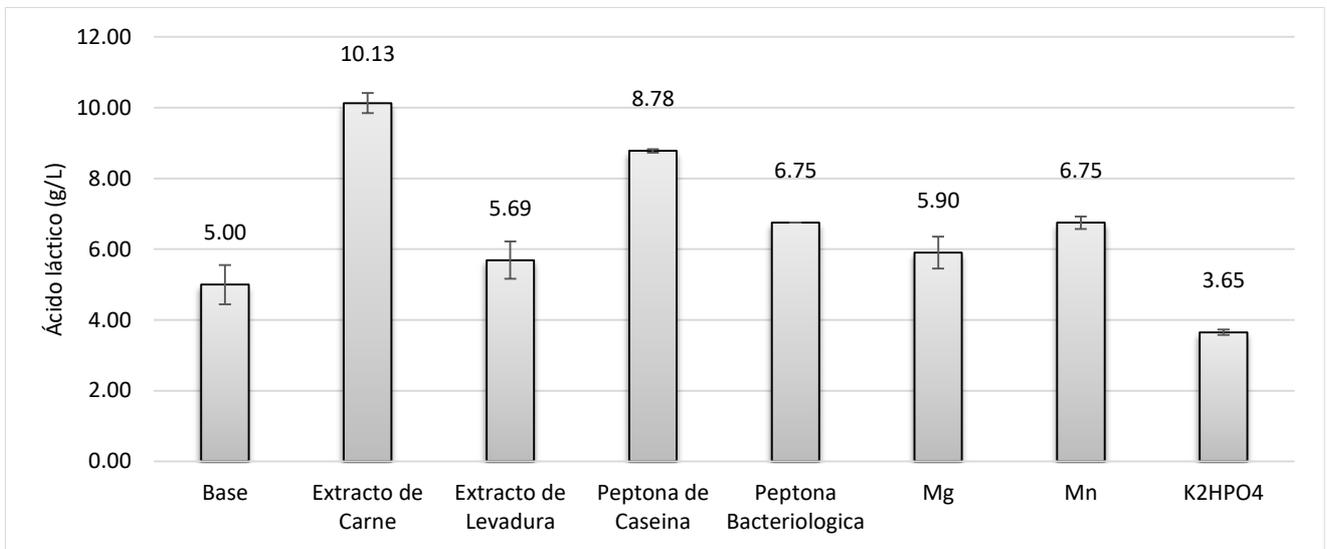


Figura 23. Influencia de las fuentes de nitrógeno e iones en la obtención de ácido láctico por *Lactobacillus sp.*

Determinación de los parámetros de fermentación

Temperatura

Para ello se tomaron 30 °C y 37°C. En la figura 24, se observa que a 37 °C se obtiene la mayor concentración de ácido láctico en comparación con 30 °C, a las 24 h.

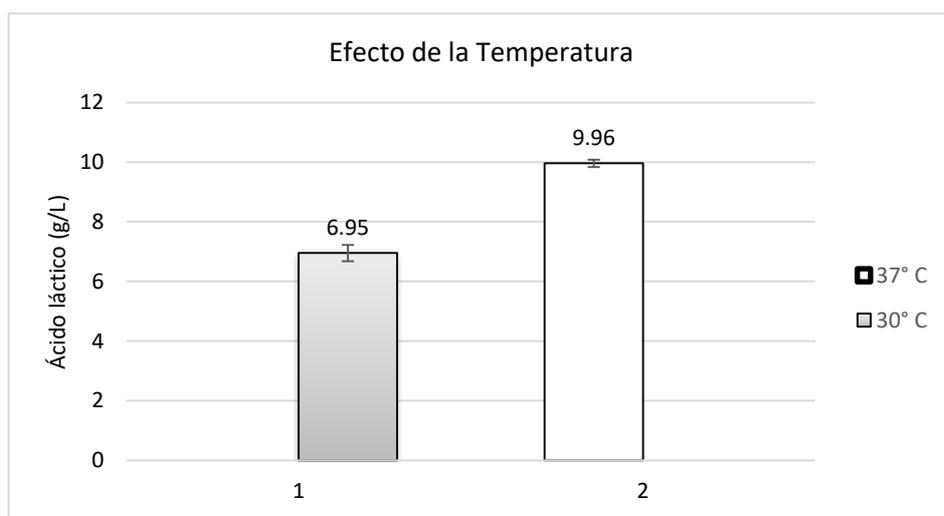


Figura 24. Evaluación de temperatura en la producción de ácido láctico por *Lactobacillus sp.*

Evaluación del tiempo de fermentación y la presencia de carbonato de calcio en la producción de ácido láctico

En la figura 25, se representa la obtención de ácido láctico en función del tiempo de cultivo, donde se evaluó la influencia del carbonato de calcio en el proceso fermentativo. Las concentraciones de ácido láctico producidas utilizando carbonato de calcio a las 22, 46, 72, 94 y 118 h fueron: 19,31; 30,51; 34,54; 34,96 y 34,74 g/L respectivamente. Paralelamente se evaluaron los procesos de fermentación sin carbonato de calcio y se obtuvieron concentraciones de ácido láctico de 10,24; 11,94; 11,77; 13,41 y 12,53 g/L respectivamente.

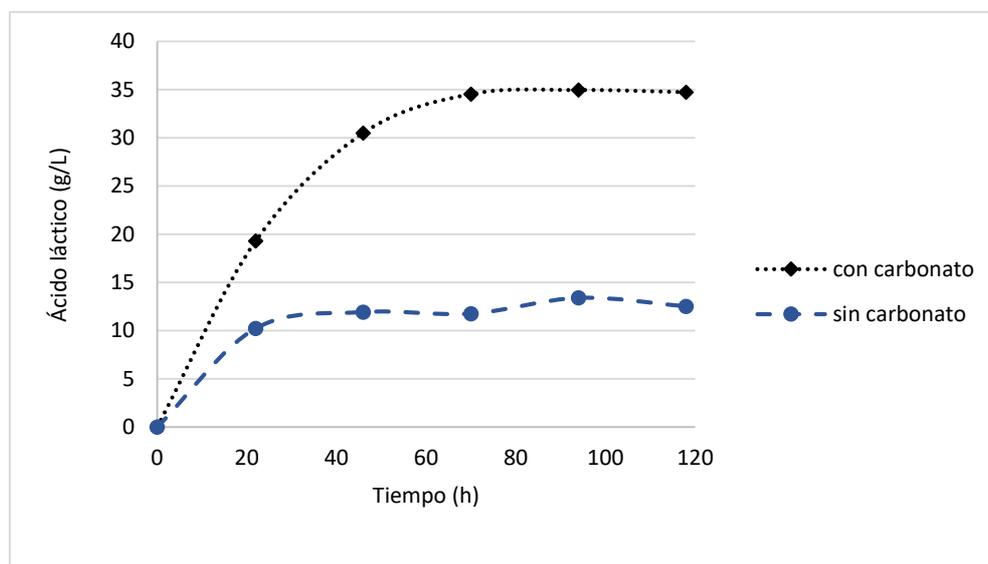


Figura 25. Efecto del tiempo de fermentación y de carbonato de calcio en la obtención de ácido láctico por *Lactobacillus* sp.

Se observó que fue predominante la cantidad de ácido láctico que se obtuvo a las 72 h (Figura 25), y después la producción se mantiene constante. Asimismo, con el uso de carbonato de calcio se obtuvo mayor cantidad de ácido láctico; esto indica que la variación del pH es un factor a considerar en los procesos fermentativos.

Diseño Plackett- Burman

La tabla 17 muestra los resultados de la producción de ácido láctico en g/L del diseño experimental de Plackett - Burman, y de acuerdo a los resultados obtenidos se determinó la influencia de cada factor.

Tabla 17. Matriz experimental de Plackett-Burman

Matriz								
Nº ensayos	Variables Naturales (g/L)							Ácido láctico (g/L)
	Extracto de carne	Peptona de caseína	Citrato de amonio	Acetato de sodio	Sulfato de magnesio	Sulfato de manganeso	Fosfato Dipotásico	
1	1,00	1,00	0,00	5,00	0,20	0,05	0,00	61,4
2	10,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,05	2,00	70,2
3	1,00	10,00	0,00	0,00	0,20	0,00	2,00	51,0
4	10,00	10,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	74,5
5	1,00	1,00	2,00	5,00	0,00	0,00	2,00	49,8
6	10,00	1,00	2,00	0,00	0,20	0,00	0,00	65,3
7	1,00	10,00	2,00	0,00	0,00	0,05	0,00	63,7
8	10,00	10,00	2,00	5,00	0,20	0,05	2,00	75,7
9	5,50	5,50	1,00	2,50	0,10	0,025	1,00	63,8
10	1,00	1,00	0,00	5,00	0,20	0,05	0,00	60,5
11	10,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,05	2,00	61,2
12	1,00	10,00	0,00	0,00	0,20	0,00	2,00	54,2
13	10,00	10,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	74,2
14	1,00	1,00	2,00	5,00	0,00	0,00	2,00	44,6
15	10,00	1,00	2,00	0,00	0,20	0,00	0,00	66,7
16	1,00	10,00	2,00	0,00	0,00	0,05	0,00	64,3
17	10,00	10,00	2,00	5,00	0,20	0,05	2,00	75,9
18	5,50	5,50	1,00	2,50	0,10	0,025	1,00	63,5

Tabla 18. Análisis de varianza (ANOVA) del diseño Plackett-Burman

Factor	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrado	F	p
(1) Extracto de carne	816,41	1	816,41	134,15	0,0000
(3) Peptona de caseína	179,92	1	179,92	29,56	0,0003
(3) Citrato de amonio	0,1	1	0,097	0,02	0,9019
(4) Acetato de sodio	24,46	1	24,46	4,02	0,0728
(5) Sulfato de magnesio	4,24	1	4,24	0,69	0,4233
(6) Sulfato de manganeso	171,72	1	171,72	28,22	0,0003
(7) K₂HPO₄	142,95	1	142,95	23,49	0,0007
Error	60,86	10	6,09		
Total suma de cuadrados	1400,66	17			

R²:0,95655; R² (ajustado):0,92614

El R² indica que el 95,65 % de variabilidad en la respuesta sería argumentado por el modelo obtenido en el diseño factorial fraccionado.

Del análisis ANOVA (Tabla 18), se observa que los factores que influyeron significativamente en la producción de ácido láctico fueron extracto de carne, peptona de caseína, fosfato dipotásico y sulfato de manganeso ($p < 0,05$). Los componentes se seleccionaron en un nivel de confianza del 95% según sus efectos.

La representación gráfica del cuadro de Pareto (Figura 26) muestra como los factores evaluados influyen sobre la variable dependiente. Además, la línea roja en este gráfico indica el valor que define estadísticamente los factores significativos. Así, los que sobrepasen esta línea ejercen un efecto significativo sobre la variable dependiente.

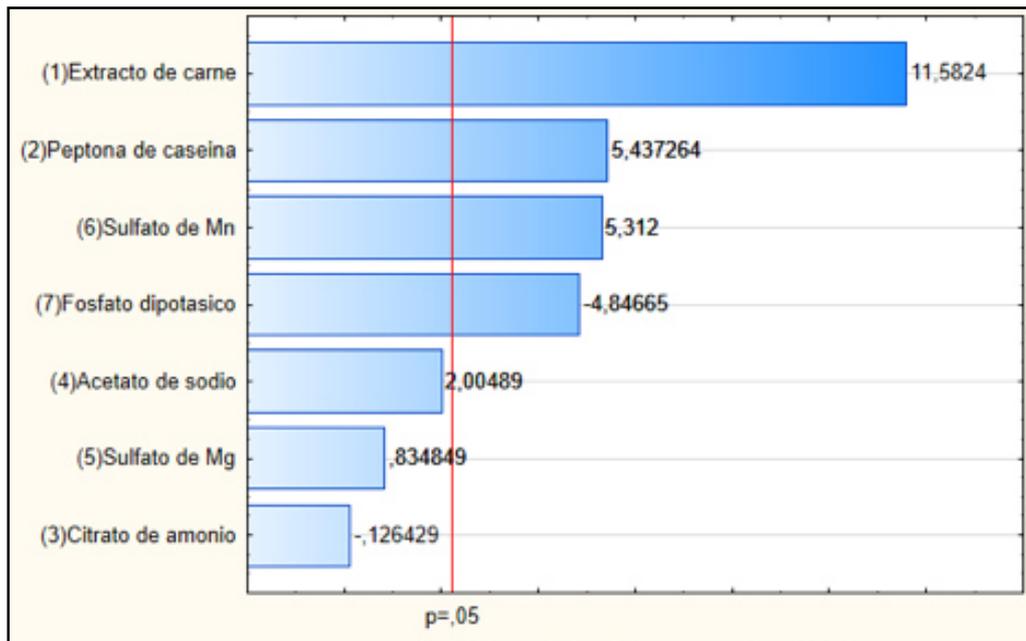


Figura 26. Diagrama de Pareto mostrando los factores que influyen sobre la producción de ácido láctico (g/L)

El diagrama de Pareto igual que ANOVA (Tabla 18), presenta que cuatro factores son significativos; siendo el extracto de carne, peptona de caseína y sulfato de manganeso los que mostraron un efecto positivo, en consecuencia, las concentraciones utilizadas se podrían aumentar en los diseños de optimización. En el caso del fosfato dipotásico su efecto fue significativo (aunque negativo) en la producción de ácido láctico, por lo tanto, la cantidad debería ser menor a la utilizada en el diseño.

Los demás factores evaluados como el acetato de sodio, sulfato de magnesio y citrato de amonio no presentaron efecto estadísticamente significativo. Sin embargo, se comprobó que su presencia en el medio de cultivo aporta micronutrientes necesarios para el requerimiento de la bacteria.

Tomando en consideración lo antes descrito, la peptona y el extracto de carne se seleccionaron como fuentes de nitrógeno para optimizar la producción de ácido láctico. El sulfato de manganeso (0,03 g/L) y el fosfato dipotásico (1 g/L) se utilizaron en la producción de ácido láctico, pero como valores constantes. Del mismo modo, el acetato de sodio y sulfato de magnesio fueron utilizados a las concentraciones de, 5 y 0,2 g/L respectivamente. El citrato de amonio se descartó del medio de cultivo por su baja influencia en la producción de ácido láctico.

Trayectoria de ascenso

De acuerdo con los resultados obtenidos del diseño de Plackett-Burman, se ejecutó un nuevo diseño factorial 2² utilizando como variables el extracto de carne y la peptona de caseína. El medio de cultivo y las condiciones de cultivo utilizado en esta fase del estudio se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Componentes constantes del medio de fermentación para la producción de ácido láctico por *Lactobacillus* sp.

Componentes	Concentración (g/L)	Condiciones
Melaza de caña	(100 g / L de azúcares totales presentes)	pH: 6,5 T°: 37 ° C Tiempo: 72 h Carbonato de calcio: 1,5 %
Acetato de sodio	5,00	
Sulfato de manganeso	0,03	
Sulfato de magnesio	0,20	
K ₂ HPO ₄	1,00	

Los resultados obtenidos con el diseño factorial 2² se muestran a continuación (Tabla 20).

Tabla 20. Diseño factorial 2² de extracto de carne y peptona de caseína

Matriz			
N° ensayos	Variables naturales (g/L)		Ácido láctico (g/L)
	Extracto de carne	Peptona de caseína	
1	1,0	1,0	50,0
2	10,0	1,0	70,9
3	10,0	10,0	60,2
4	10,0	10,0	75,7
5	5,5	5,5	67,6
6	1,0	1,0	51,9
7	10,0	1,0	68,6

"PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LACTOBACILLUS SP. AISLADO DE FRUTOS DE LA REGIÓN LORETO"

8	1,0	10,0	60,5
9	10,0	10,0	72,1
10	5,5	5,5	62,9

Tabla 21. Análisis de varianza del diseño factorial 2²

Factor	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrado	F	P
(1) Extracto de carne	523,94	1	523,94	119,20	0,0001
(2) Peptona de caseína	91,27	1	91,27	20,24	0,0064
1 por 2	13,67	1	13,67	3,03	0,1421
Residual	26,28	6	4,38		
Falta de ajuste	3,73	1	3,73	0,83	0,4048
Error puro	22,55	5	4,51		
Total suma de cuadrados	655,15	9			

R²:0,9599; R² (ajustado):0,93984

No se observó interacción de las variables independientes (p=0,1421) (Tabla 21). Por otra parte, se puede observar en el diagrama de Pareto (Figura 27) que las dos variables extracto de carne y peptona de caseína fueron significativos para el proceso.

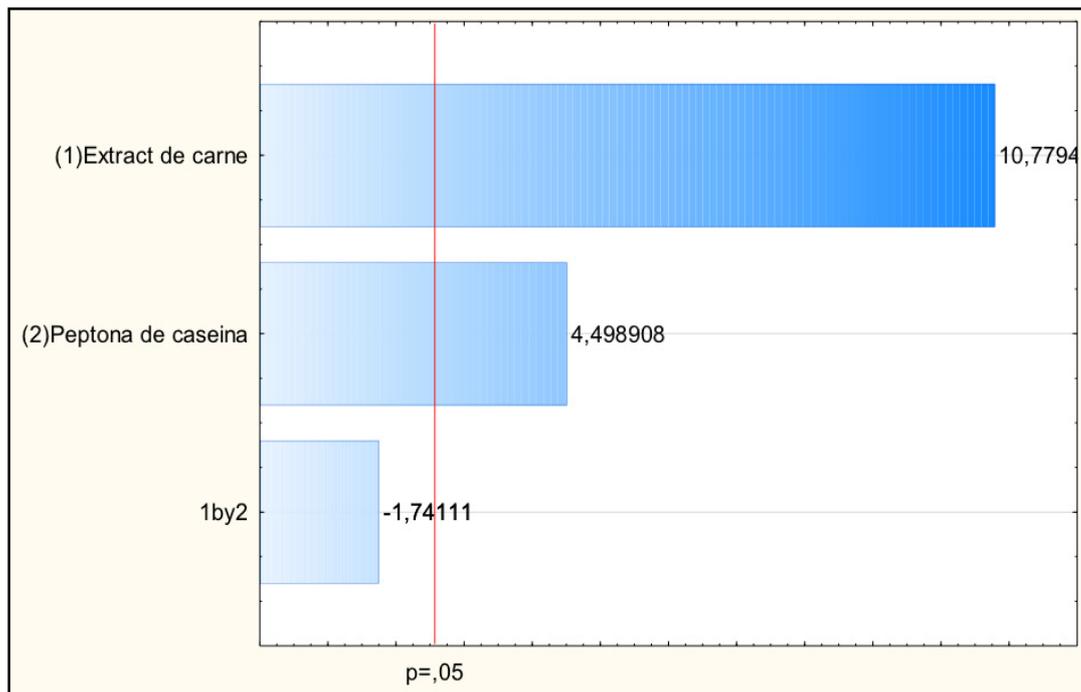


Figura 27. Diagrama de Pareto del efecto de los compuestos nitrogenados

El modelo determinado no presentó falta de ajuste de acuerdo con el valor p ($p > 0,05$), sugiriendo que debe continuar utilizándose modelos de primer orden. Del análisis ANOVA (Tabla 21), se puede observar que el R^2 fue 0,959, lo cual indica que el 95,9 % de variabilidad en la respuesta podría ser argumentado por el modelo establecido en el diseño factorial 2^2 .

Posteriormente fueron calculados los efectos estimados y los coeficientes de regresión que definen el modelo matemático según la siguiente ecuación:

$$Y = 64.052 + 8.093 X_1 + 3.378 X_2 - 1.307X_1X_2 \quad (8)$$

Donde:

X_1 ; Extracto de carne
 X_2 ; Peptona de caseína

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el anterior diseño, se realizaron otros ensayos hasta encontrar la zona de optimización, para ello se consideró las proporciones

definidas en la ecuación lineal (8), se realizaron cinco pasos utilizando el método del ascenso más pronunciado. Se partió del punto central de cada factor, y se agregó cinco unidades (en términos de g/L) de extracto de carne y una unidad de peptona de caseína. En la tabla 22 se puede observar la trayectoria de ascenso para los dos factores en términos de concentraciones.

Tabla 22. Pasos de la trayectoria de ascenso

Pasos	Variables Codificadas		Variables Naturales (g/L)		Ácido láctico (g/L)
	X ₁	X ₂	€ ₁	€ ₂	
Origen	0	0,0	5,5	5,5	62,9
Δ	1	0,3	5,0	1,0	---
Origen + Δ	1	0,3	10,5	6,5	70,4
Origen + 2 Δ	2	0,6	15,5	7,5	79,0
Origen + 3 Δ	3	0,9	20,5	8,5	82,1
Origen + 4 Δ	4	1,2	25,5	9,5	78,5
Origen + 5 Δ	5	1,5	30,5	10,5	78,5

Donde:

€₁; Extracto de carne
€₂; Peptona de caseína

Se observó en la trayectoria de ascenso que el máximo incremento ocurrió cuando se utilizó 20,5 g/L de extracto de carne y 8,5 g/L de peptona de caseína, después de haber alcanzado el valor máximo ocurrió una reducción de la variable dependiente. Entonces, una vez encontrado el intervalo de mayor respuesta, se realizó un nuevo diseño factorial con nuevos valores para las dos variables independientes (Tabla 23).

Tabla 23. Matriz factorial 2² de extracto de carne y peptona de caseína para la producción de ácido láctico

Matriz			
N° ensayos	Variables naturales (g/L)		Ácido láctico (g/L)
	Extracto de carne	Peptona de caseína	
1	10,0	6,0	69,2
2	25,0	6,0	74,0
3	10,0	9,0	70,0
4	25,0	9,0	79,2
5	17.5	7.5	86,9
6	17.5	7.5	85,5
7	17.5	7.5	86,7
8	17.5	7.5	86,4

El ANOVA (Tabla 24) muestra que el diseño factorial 2² (Tabla 23) presenta falta de ajuste ($p < 0,05$), por ello el siguiente diseño utilizado fue un modelo de segundo orden empleando los valores cercanos al del factorial 2².

Tabla 24. Análisis de varianza del diseño factorial 2²

Factor	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrado	F	p
Punto central	352,45	1	352,45	235,46	0,0000
(1) Extracto de carne	49,00	1	49,00	32,73	0,0046
(2) Peptona de caseína	9,00	1	9,00	6,01	0,0702
Residual	5,99	4	1,49		
Falta de ajuste	4,84	1	4,72	11,35	0,0434
Error puro	1,15	3	0,38		
Total suma de cuadrados	416,44	7			

R²:0,983562; R² (ajustado):0,97484

Diseño central compuesto (DCC)

Se realizó un modelo de segundo orden que corresponde al diseño central compuesto (DCC). La matriz está constituida por trece ensayos incluidos cinco puntos centrales y cuatro puntos axiales (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración de ácido láctico del diseño central compuesto

Matriz			
Nº ensayos	Variables Naturales (g/L)		Ácido láctico (g/L)
	Extracto de carne	Peptona de caseína	
1	14,00	6,00	77,3
2	14,00	9,00	79,6
3	22,00	6,00	80,2
4	22,00	9,00	82,7
5	12,34	7,50	77,3
6	23,66	7,50	80,6
7	18,00	5,38	82,1

"PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LACTOBACILLUS SP. AISLADO DE FRUTOS DE LA REGIÓN LORETO"

8	18,00	9,62	84,0
9	18,00	7,50	87,0
10	18,00	7,50	86,0
11	18,00	7,50	86,0
12	18,00	7,50	86,1
13	18,00	7,50	86,0

En los resultados obtenidos se observa que al utilizar 18 g/L de extracto de carne y 7,5 g/L de peptona de caseína se obtuvo un promedio de 86,23 g/L de ácido láctico, lo cual indica la mayor producción en el punto central.

Tabla 26. Análisis de varianza del DCC

Factor	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrado	F	p
(1) Extracto de carne (L)	14,32	1	14,32	27,04	0,0001
(2) Extracto de carne (Q)	106,36	1	106,36	200,81	0,0000
(3) Peptona de caseína (L)	6,74	1	6,74	12,73	0,0091
(4) Peptona de caseína (Q)	23,45	1	23,45	44,23	0,0002
1L by 2L	0,02	1	0,02	0,03	0,8633
Residual	3,71	7	0,53		
Falta de ajuste	2,94	3	0,98	5,11	0,0745
Error puro	0,77	4	0,19		
Total suma de cuadrados	143,59	12			

R²:0,97416; R² (ajustado):0,95571

Del análisis ANOVA mostrado en la tabla 26, no se presentó falta de ajuste en el modelo ($p > 0,05$) que sugiere que el modelo puede describir la influencia de los factores en la respuesta evaluada para predecir la producción de ácido láctico. Además, podemos observar un R² de 97,42 %.

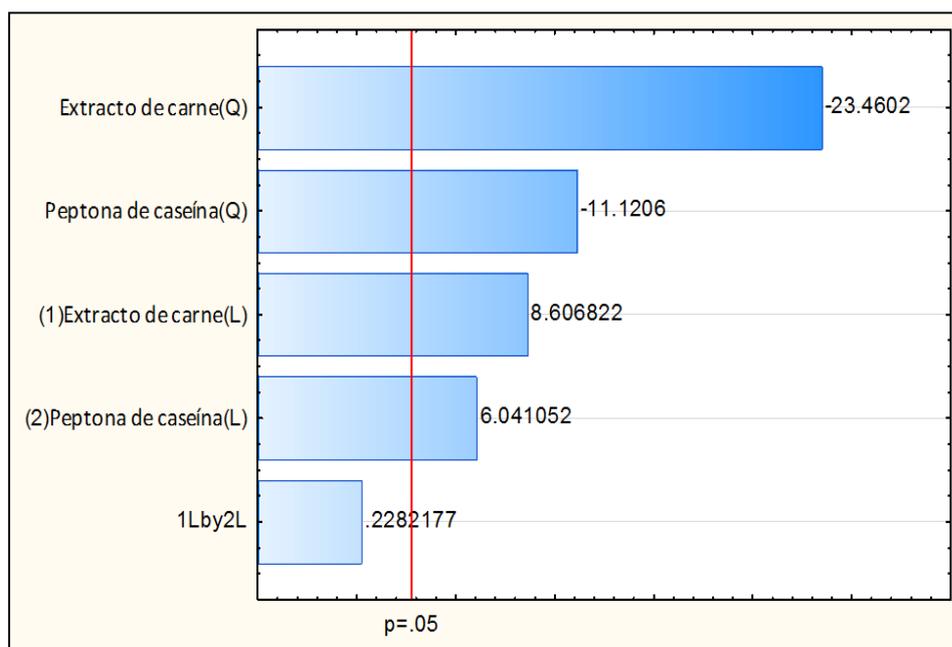


Figura 28. Diagrama de Pareto del DCC

El diagrama de Pareto (Figura 28) donde las dos variables extracto de carne y peptona de caseína (forma lineal, L, y forma cuadrática, Q) fueron factores significativos en el DCC, aunque, sugiere que a concentraciones elevadas de estos factores (en relación a la forma cuadrática de los factores), la obtención de ácido láctico podría ser perjudicada.

Finalmente, se calcularon los coeficientes de regresión (Tabla 27) que definen el modelo con la ecuación 9:

Tabla 27. Coeficientes de regresión del DCC

Factor	Coefficientes de regresión	Error estándar	t(7)	p	-95,% Limite de confianza	+95,% Limite de confianza
Mean/Interc.	-48,0079	12,41799	-3,8660	0,0061	-77,3718	-18,6440
(1) Extracto de carne (L)	9,0512	0,77233	11,7194	0,0000	7,2249	10,8774
(2) Extracto de carne (Q)	-0,2444	0,01725	-14,1708	0,0000	-0,2852	-0,2036
(3) Peptona de caseína (L)	12,6581	2,14595	5,8986	0,0006	7,5837	17,7324
(4) Peptona de caseína (Q)	-0,8161	0,12264	-6,6545	0,0003	-1,1061	-0,5261
1L by 2L	0,0108	0,06065	0,1786	0,8633	-0,1326	0,1542

Ecuación:

$$Y = -48,0079 + 9,0512 X_1 - 0,2444 X_1^2 + 12,6581X_2 - 0,8161X_2^2 + 0,0108X_1X_2 \quad (9)$$

Donde X_1 y X_2 se encuentran en forma de variable natural:

- X_1 ; Extracto de carne
- X_2 ; Peptona de caseína

La producción de ácido láctico puede ser explicada de acuerdo a la ecuación (9) de segundo orden del DCC donde se muestran a las variables X_1 y X_2 que tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$).

A continuación, se pueden observar los gráficos de valores calculados vs valores observados, de superficie de respuesta y de contornos para ácido láctico (g/L).

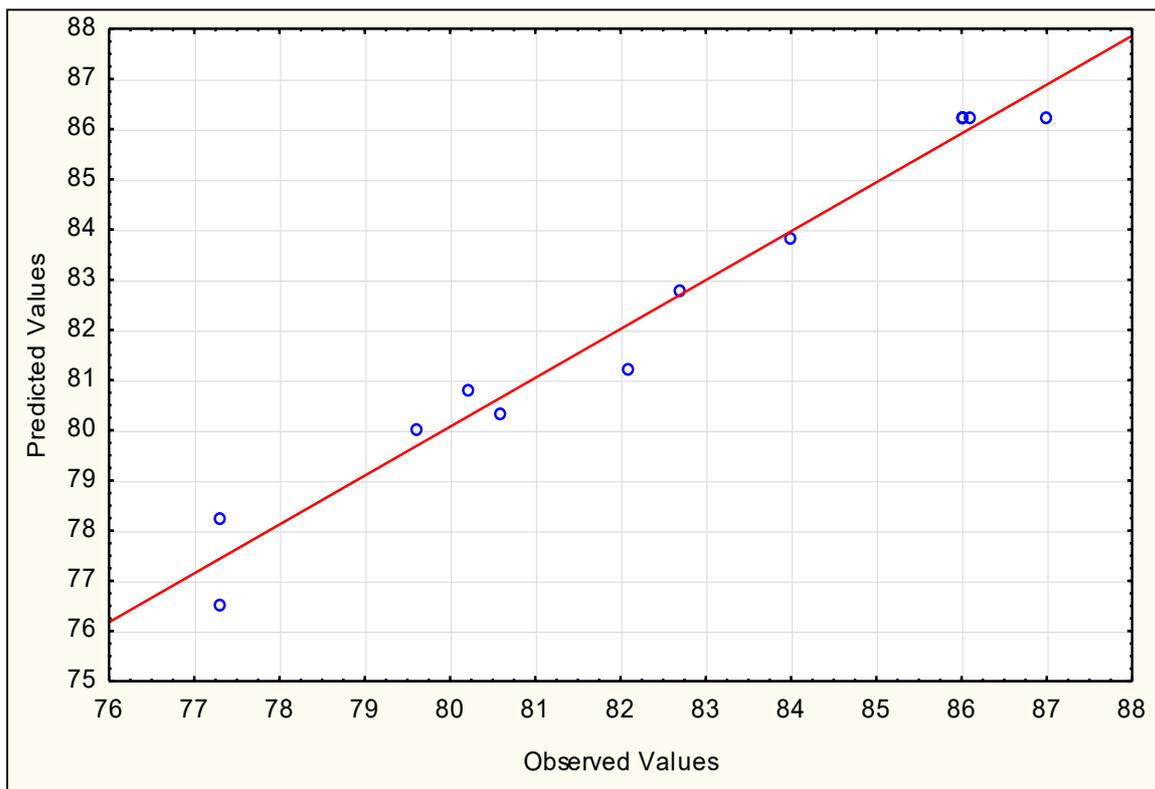


Figura 29. Gráfica de valores calculados vs valores observados

La correlación que existe entre las observaciones experimentales y los valores calculados es fuerte y se puede observar en la figura 29, debido a que los valores se han posicionado alrededor de la línea diagonal, teniendo relación con el valor de R^2 (0,9742).

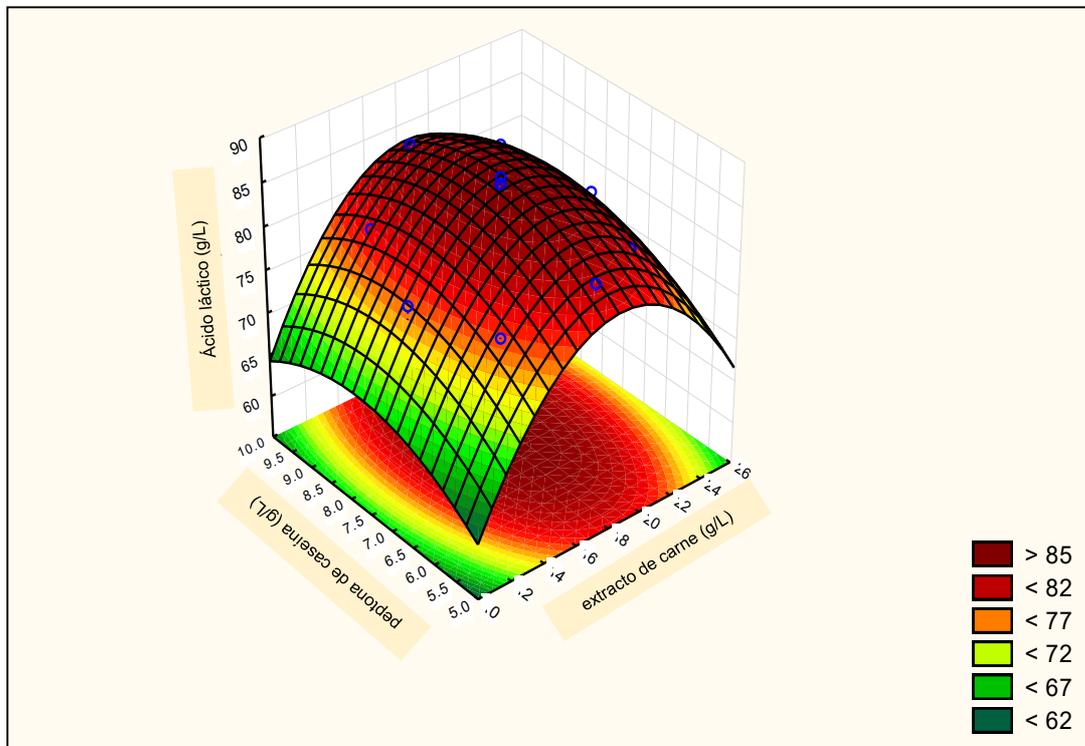


Figura 30. Gráfica de superficie de respuesta

La gráfica de superficie de respuesta (Figura 30) muestra el efecto del extracto de carne y la peptona de caseína sobre la producción de ácido láctico (g/L) para de esta manera localizar el nivel óptimo de cada variable y obtener una máxima respuesta. A concentraciones aproximadas de 18 g/L y 8 g/L, respectivamente se puede observar la máxima producción de ácido láctico; no obstante, a mayores concentraciones (> 22 g/L de extracto de carne y > 12 g/L de peptona de caseína podrían inhibir la formación del producto (respectivamente).

La gráfica de contornos (Figura 31) relación extracto de carne y peptona de caseína permite visualizar de mejor manera la región del óptimo. Las líneas curvas indican que los términos cuadráticos fueron significativos ($p < 0,05$). Además, está representada por diversas coloraciones; el color rojo oscuro representa la zona de máxima producción de ácido láctico, el cual coincide con los valores centrales de 18 y 7,5 g/L; de extracto de carne y peptona de caseína respectivamente.

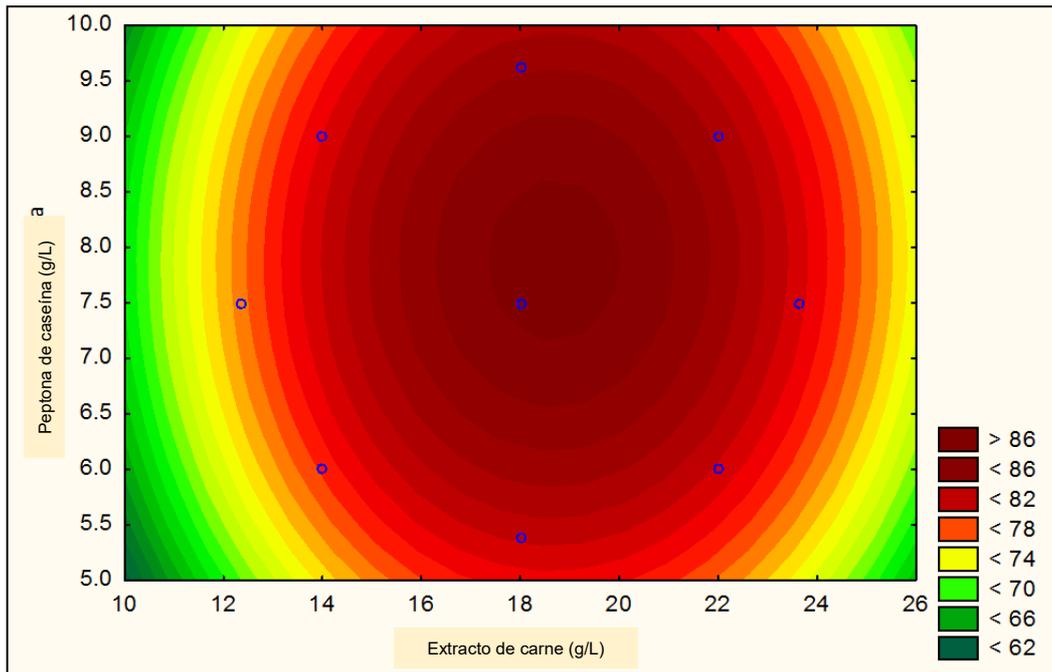


Figura 31. Gráfica de contornos

Finalmente, de acuerdo con los valores críticos se determinaron los valores óptimos para la producción de ácido láctico como 18,69 g/L de extracto de carne y 7,88 g/L de peptona de caseína para una concentración teórica de 86,44 g/L. Estos valores teóricos fueron contrastados experimentalmente.

Verificación del modelo

Experimentalmente, siguiendo las concentraciones óptimas determinadas por el modelo cuadrático se realizó una fermentación en las condiciones de cultivo establecidas y se obtuvo 84,2 g/L de ácido láctico este valor fue similar al calculado de 86,44 g/L por el modelo DCC.

Tabla 28. Verificación de las condiciones óptimas calculadas por el modelo DCC

Condiciones óptimas		ácido láctico en g/L	
Factores	Valores (g/L)	Respuesta estimada	Respuesta experimental
Extracto de carne	18,69	86,44	84,19 ± 0.041*
Peptona de caseína	7,88		

*Media ± error estándar, la verificación se hizo por triplicado.

Escalamiento en biorreactor

Con el propósito de evaluar el escalamiento de la producción en el biorreactor y conocer las curvas biocinéticas, utilizando las condiciones de cultivo optimizadas en los estudios a nivel de matraces. La única modificación que se realizó fue aumentar la agitación a 300 rpm.

La producción de ácido láctico fue de 71,4 g/L a las 72 h, el cual muestra una disminución en aproximadamente 13 g/L con el estudio a nivel de matraces (84,2 g/L).

Tabla 29. Productividad y rendimiento de ácido láctico producido por *Lactobacillus* sp

Tiempo (h)	16	72	Matraz
Y p/s	0,918	0,898	---
Q (g/Lh)	4,40	0,99	1,17

La mayor productividad (4,40 g/L/h) se obtiene a las 16 h de iniciado el proceso de fermentación en el biorreactor, después la productividad en el biorreactor disminuye hasta 0,99 g/L/h según transcurre el tiempo. De la misma manera, se comparó la productividad que se realizó a escala de matraces y se obtuvo una productividad de 1,17 g/L/h.

En la figura 32 que, se observa la producción de ácido láctico a las 16 h llegó a su punto máximo manteniéndose constante después de ese tiempo hasta el término del proceso. De modo similar se observó con el consumo del sustrato, a partir de las 15 h, la concentración de sustrato fue constante, lo cual sugiere que el microorganismo no asimila

este componente del medio.

Por otro lado, el rendimiento producto/sustrato a las 16 h fue de 0,918 g_p/g_s manteniéndose constante hasta finalizar la fermentación (0,898 g_p/g_s).

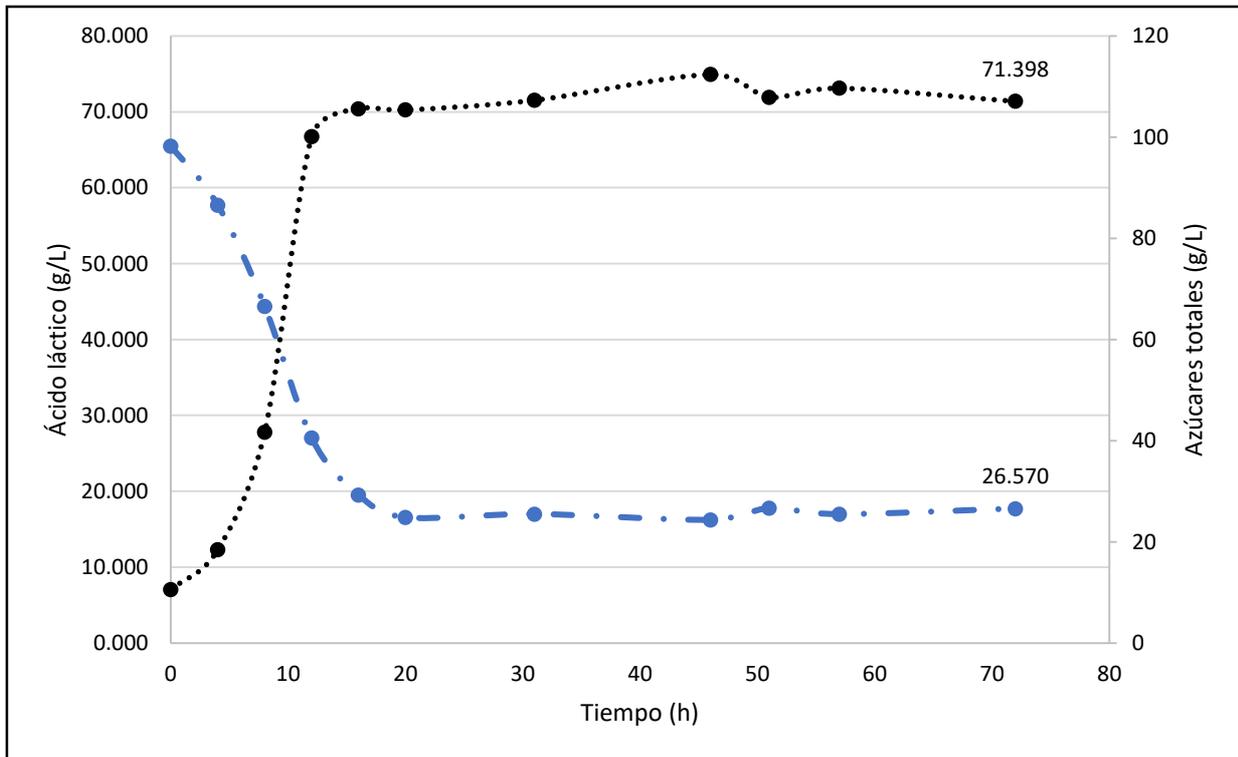


Figura 32. Curvas de la producción de ácido láctico y consumo de sustrato en un proceso de fermentación tipo lote por *Lactobacillus* sp.

VI. DISCUSIÓN

Actualmente, en la producción de metabolitos y enzimas se busca optimizar los componentes del proceso de fermentación como el medio de cultivo (fuentes de carbono, nitrógeno, e iones) y los parámetros de cultivo como, temperatura, pH, aireación, entre otros. Además, se debe tener en cuenta las características del microorganismo utilizado.

En la primera etapa del estudio, se seleccionó a la cepa Hui1 como la mayor productora de ácido láctico, teniendo como indicador el mayor diámetro de halo formado, en agar carbonato de calcio comparado con un ensayo utilizando solución de ácido láctico como control positivo (datos no mostrados). La cepa Hui1 fue identificada como *Lactobacillus sp.* aislada del fruto *Genipa americana* “huito” y tolerante a pH bajo como es el caso de *Lb. plantarum* y *Lb. casei*, que toleran pH menor a 4 (88).

La composición del medio de cultivo es un factor importante en la producción de ácido láctico, en este punto se destaca el uso de carbohidratos. Así, la mayoría de azúcares fueron fermentados con excepción del almidón (figura 22). Este último no aumentó la producción de ácido láctico con respecto al medio base probablemente porque *Lb. plantarum* no produce amilasas, por ello se debe hidrolizar el almidón previamente(61). Los resultados de esta investigación mostraron concordancia al comportamiento descrito para *Lactobacillus sp.* con relación al metabolismo de azúcares que incluyen los monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa) y disacáridos (maltosa, lactosa, sacarosa y celobiosa) (61).

Fructosa, caña de azúcar, melaza de caña, sacarosa, citrato de amonio y acetato de sodio contribuyeron a obtener una cantidad elevada de ácido láctico (Figura 22). En el caso de la fructosa podría explicarse porque sigue la vía glucolítica, similar a la glucosa. La caña de azúcar presenta una composición nutricional rica en azúcares con mayor porcentaje sacarosa y otros componentes como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, manganeso, cobre y zinc, la producción de ácido láctico fue similar a lo descrito por Serna y Rodríguez (2005)(89). Para el caso del citrato de amonio y acetato de sodio fueron evaluados tanto de manera independiente (con el medio base) como suplementados con glucosa, mostró interacción entre citrato de amonio, acetato de sodio y glucosa, esto se debería a la existencia de un cometabolismo del citrato y la glucosa donde la presencia de estos dos compuestos da una mayor ventaja al crecimiento de BAL, además el citrato permite la regeneración del NAD⁺ a través de la reducción del piruvato a lactato dando

una relación directa entre citrato y la producción de ácido láctico, según Magni y col (2000) (90). Del mismo modo, el acetato sigue la ruta del citrato antes descrito.

Por otra parte, la relación existente entre el citrato y la glucosa podría ayudar a que las BAL utilicen eficientemente la glucosa y de esta manera toleren la disminución del pH por efecto de la producción de ácido láctico (91,92). Por lo tanto, este probable cometabolismo permitió seleccionar al citrato y acetato como componentes del medio para las etapas posteriores.

La melaza de caña a diferencia de fructosa, caña de azúcar y sacarosa, es un subproducto industrial de bajo costo que se obtiene del procesamiento del azúcar, constituida por azúcares fermentables, vitaminas, minerales, entre otros (93). Fue seleccionada como principal fuente de carbono.

El rango de concentración entre 100 a 200 g/L de la melaza de caña fue determinado según lo descrito por Dumbrepatil y col (2007) (94), quienes determinaron que 190 g/L permite obtener una buena cantidad de ácido láctico. A la vez, Haully y col (2003)(95) reportaron que 100 g/L de melaza de caña es la concentración adecuada para la producción. Además, la concentración de melaza afecta la cantidad de ácido láctico obtenido; por consiguiente se decidió trabajar a 140 g/L de melaza de caña (100 g/L de azúcares totales presentes) (16).

Con respecto a la fuente de nitrógeno, las BAL presentan baja capacidad de síntesis de aminoácidos necesarios para el crecimiento y mantenimiento celular y por consiguiente obtener una buena producción del metabolito, en este caso ácido láctico. Las fuentes de nitrógeno que habitualmente se utilizan son extracto de levadura, peptona, licor macerado de maíz, extracto de malta, suero de leche, urea, etc. Por esta razón, en este estudio se evaluaron diferentes fuentes tales como extracto de carne, extracto de levadura, peptona de caseína y peptona bacteriológica. De este modo, se seleccionaron el extracto de carne y la peptona de caseína por permitir una mayor producción de ácido láctico de 5 g/L a 10,13 y 8,78 g/L, respectivamente (Figura 23). Son pocos los estudios realizados donde se utiliza el extracto de carne y la peptona de caseína, no obstante, fueron considerados porque forman parte del medio enriquecido MRS y porque presentan características similares al extracto de levadura y a la peptona bacteriológica. El extracto de carne se diferencia del de levadura porque presenta en mayor concentración aminoácidos, péptidos y vitaminas; y además porque aporta bases púricas, ácidos orgánicos, fosfatos y sales inorgánicas.

La mayoría de las investigaciones que utilizan medios complejos incluyen el extracto de levadura. Así, por Aeschlimann y von Stockar (1990) (96) indican que la fuente de nitrógeno es esencial para una eficiente producción de ácido láctico por *Lactobacillus helveticus*, de esta manera se puede comprobar que la inclusión de extracto de levadura y otras fuentes complejas como extracto de carne, peptona, entre otros, que tienen un efecto significativo positivo.

Otro punto importante es la evaluación del efecto de las condiciones de cultivo como temperatura, pH y el tiempo de fermentación; estos factores intervienen en todo proceso fermentativo y deben ser controlados de manera correcta.

La mejor temperatura para *Lactobacillus* sp fue de 37 °C, este resultado fue similar a lo descrito por Hujanen y linko (1996) (97) quienes obtuvieron 3,33 g/L/h a 37°C y 1,71 g/L/h a 41 °C por *Lb. casei*. A la vez Yumoto e Ikeda (1995) (98) determinaron una mayor producción de ácido láctico a 35 °C para *Lb. amylophilus*, y menor a los 40 °C.

Para el caso del pH, el valor fue escogido de acuerdo con lo reportado por John y col (2006)(99) quienes evaluaron un rango de pH entre 4,0 a 10,0 para *Lb. delbrueckii* concluyendo que el pH óptimo fue 6,5. Además, Senthuran y col (1999)(100) informaron que el pH óptimo para *Lb. casei* fue de 6,0 para un medio líquido y 6,5 en un medio sólido. Como los valores de pH óptimos oscilaron entre 6,0 y 6,5 se decidió seleccionar este último para todos los ensayos.

La presencia de carbonato de calcio actuó como agente neutralizante (Figura 25). De este modo, la concentración de ácido láctico aumentó de 12,53 g/L a 34,96 g/L; de manera similar a lo descrito por Chauhan y col (2007)(11) quienes reportaron un incremento de la cantidad de ácido láctico de 16,9 g/L a 45,59 g/L. Este aumento, se le atribuye a la regulación del pH durante todo el proceso de fermentación. Por ello, es recomendable el uso de un compuesto que neutralice la variación del pH, en este caso ocurriría formación de lactato de calcio entre el ácido láctico formado y el carbonato de calcio.

Con relación al tiempo de fermentación fue establecido un periodo de 72 h (Figura 25), porque se observó la máxima producción expresada en gramos de ácido láctico por litro de medio, después de este periodo no hubo incremento significativo de la producción.

La tercera etapa del estudio se centró en la selección y la determinación de las concentraciones de nutrientes para el medio de cultivo, lo cual sirve para determinar el efecto que cada uno de ellos ejerce de manera independiente en la producción de ácido

láctico por *Lactobacillus* sp para incluirlos o excluirlos de la formulación del medio de fermentación.

De acuerdo al diseño Plackett-Burman, el extracto de carne y la peptona de caseína tuvieron una buena influencia sobre la producción de ácido láctico, esto se debería a que, estos componentes son ricos en péptidos, aminoácidos y vitaminas, los cuales son esenciales para el funcionamiento celular. Las concentraciones utilizadas para las fuentes de nitrógeno fueron de 10 g/L, lo mismo fue reportado por Bustos y col (2003) (13). Asimismo, Ohkouchi y col (2007) (101) determinaron que la suplementación con extracto de carne aumentó la productividad del ácido láctico. Considerando que este diseño se caracteriza por dar información de los efectos de cada factor y no de sus interacciones, y trabajos similares, como los reportado por Coelho y col (2011)(12); se seleccionaron componentes que el diseño mostró significativos al 95 % del nivel de confianza.

De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura 26), el $MnSO_4$ influye significativamente en la producción de ácido láctico. Esto es comparable con lo que indica Ríos (2011) (102) que incluyeron iones Mn^{+2} y Mg^{+2} en su medio de cultivo y obtuvieron una mayor productividad de ácido láctico. Esto se explica por la influencia que ejerce el Mn^{+2} en las BAL, las cuales necesitan en su metabolismo iones como el Mn^{+2} porque interviene en el crecimiento y funcionamiento celular como cofactor de algunas enzimas como la ARN polimerasa, LDH, la enzima maloláctica, la NADH oxidasa y la SOD (103), estimulando con ello una mejor fermentación e incluso ayudando a reducir el tiempo de fermentación, como ocurrió en el estudio de Arellano (2013)(104).

El efecto positivo que ejerce $MnSO_4$ a una concentración de 0,05 g/L es diferente a lo descrito por Chauhan y col (2007), en el cual utilizaron la misma concentración de $MnSO_4$ obteniendo un efecto significativo negativo en *Lactobacillus* sp. KCP01. Del mismo modo ocurrió con Coelho y col (2011) al utilizar este ión Mn^{+2} 0,1 g/L. Lo que indica que especies de *Lactobacillus*, como *Lb. plantarum*, tolerarían rangos elevados del ion Mn^{+2} . Sin embargo, en caso inicialmente se utilizó una concentración de 0,05 g/L pero luego se redujo a 0,03 g/L porque hubo una disminución en la producción de ácido láctico. Esto fue comparado con Arellano (2013)(104) quien evaluó diferentes concentraciones de $MnSO_4$ en *Lb. casei*, siendo la mejor condición 0,03 g/L.

La adición de $MgSO_4$ al medio de cultivo fue estudiada por algunos autores. Por ejemplo, Coelho y col (2011) reportaron que esta sal no aumenta la producción de ácido láctico en *Lb. plantarum*. De igual modo, el Mg^{+2} no fue significativo para el diseño Plackett-Burman. Sin embargo, al no incluirlo en la formulación del medio de producción, el ácido láctico disminuyó. En consecuencia, se analizó la concentración utilizada en el *screening* (0,2

g/L) y se comparó con lo reportado por Arellano (2013), quien menciona la suplementación con 0,03-0,2 g/L de $MnSO_4/MgSO_4$. Según Arellano, el Mg^{+2} interacciona con Mn^{+2} ; y además afecta la división celular, el crecimiento, la producción de enzimas que intervienen en el metabolismo de síntesis de ácido láctico (105), por ello fue incluido en el medio de cultivo en concentración constante. Asimismo, la concentración utilizada debe ser baja de lo contrario la bacteria utilizará el sustrato en el mantenimiento celular y crecimiento.

El K_2HPO_4 influye en el metabolismo de *Lactobacillus* sp, pero de manera negativa. Considerando que los iones K^{+1} tienen como una de sus funciones regular el pH citoplasmático (106), y a concentraciones elevadas altera el equilibrio intracelular. Así McLeod y Snell (1947) (107) demostraron que el potasio, fosfato y manganeso son esenciales para el crecimiento de diferentes BAL como *Leuconostoc mesenteroides*, *S. faecalis* y un número de *Lactobacillus* en un medio sintético. Por ello en los ensayos posteriores, se redujo la concentración de K_2HPO_4 de 2 g/L a 1 g/L.

Similar al caso del $MgSO_4$, ocurrió con el acetato de sodio; sin embargo, experimentalmente se comprobó que su presencia es importante para *Lactobacillus* sp, en concordancia con otras investigaciones en especies de *Lactobacillus*. Vincent y Esmond (1953)(108) demostraron la importancia del acetato de sodio en pequeñas cantidades para aumentar el crecimiento de *Lb. Delbrueckii* que de manera indirecta aumenta la producción de ácido láctico. Por lo tanto, el acetato de sodio usado fue de 5 g/L, un aumento de dicha concentración no afecta a la obtención de ácido láctico (109); a menos ocurriese un aumento de la concentración de peptona estuviera mayor a 15 g/L lo cual ayudaría de manera beneficiosa.

$MgSO_4$, $MnSO_4$, CH_3COONa y K_2HPO_4 son esenciales para el crecimiento de *Lactobacillus* en la formación de ciertas enzimas. Por lo que, estos micronutrientes se requieren en pequeñas cantidades en toda fermentación láctica (110).

El citrato de amonio es inespecífico en la producción de ácido láctico, pues también es usado para la formación de acetoina (111); utilizado como agente inhibitorio sobre bacterias Gram-negativas en el medio (112), en nuestro trabajo, el uso de este compuesto fue excluido del medio de cultivo.

Llegado a este punto, se decidió incrementar la producción del ácido láctico trabajando con las fuentes de nitrógeno (peptona de caseína y extracto de carne) a fin de alcanzar gradualmente el punto óptimo. Fue utilizada la MSR, mediante el método del ascenso

más pronunciado, se determinó los valores óptimos de peptona de caseína y extracto de carne. Posterior a la etapa de *screening* se realizó el ascenso, donde se consideró que la falta de ajuste no significativa sea el parámetro indicador para finalizar esta etapa (Tabla 21); debido a ello se realizaron pasos de ascenso (Tabla 22) partiendo desde los puntos centrales de cada factor (5,5 g/L), observándose la máxima concentración de 82 g/L en el tercer paso disminuyendo en los puntos que tuvieron mayores concentraciones de cada factor; probablemente se debe al uso de concentraciones mayores a 20 g/L para BAL tóxicas de nitrógeno como lo reporta Serrato (2004) (62). Aunque, en términos de costos y no de rendimientos el rango de concentraciones que mejor se ajusta serían 15,5 y 7,5 g/L de extracto de carne y peptona de caseína, respectivamente (punto 2). Sin embargo, siguiendo nuestro criterio de optimización (basándonos en la falta de ajuste) se seleccionó el rango de 10 a 25 g/L de extracto de carne, y de 6 a 9 g/L para peptona de caseína en el diseño factorial (Tabla 13). Finalmente, la falta de ajuste resultó significativa (Tabla 24), la cercanía a la región del óptimo y que la trayectoria en ascenso ha permitido que la concentración de ácido láctico vaya en aumento.

El diseño central compuesto (DCC) se usó para estimar los efectos cuadráticos, y para optimizar la producción de ácido láctico (71). Así, mediante este diseño, se obtuvo 84,2 g/L de ácido láctico partir de 140 g/L de melaza de caña (100 g/L de azúcares totales) y de las concentraciones optimizadas del extracto de carne (18,69 g/L) y peptona de caseína (7,88 g/L) a nivel de matraces. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Orozco y Solarte (2003)(28) quienes obtuvieron 90,21 g/L y Coelho (2011) reportó 94,8 g/L de ácido láctico. Sin embargo, la fuente de nitrógeno fue 45 g/L de licor macerado de maíz. Ello motiva, a la búsqueda de alternativas al uso de las fuentes de nitrógeno sintéticas con este tipo de residuos agroindustriales, como lo reportado por Yu y col (2008) (113), quienes optimizaron la producción de ácido láctico y obtuvieron 113,05 g/L. Además, indicaron que existe una relación entre carbono y nitrógeno cuando se alcanza el punto óptimo. Sin embargo, cuando se utilizaron mayores concentraciones se invirtió el efecto, como se observa en figura 30, que a mayores concentraciones de la fuente de nitrógeno ya no se percibe una mayor producción de ácido láctico al contrario; reflejándose lo que la ecuación (9) de coeficientes de regresión modeló, estableciendo que la máxima producción de ácido láctico se ve influenciada por peptona de caseína y extracto de carne aunque no haya una interacción entre ambos pero que a concentraciones muy elevadas de cada uno ejerce la disminución de la producción de ácido láctico probablemente porque las concentraciones de nitrógeno se vuelven tóxicas para la bacteria.

Por otra parte, la cantidad de ácido láctico producida por *Lactobacillus* sp fue de 84,2 g/L comparable a otros trabajos que también evaluaron diferentes sustratos, por ejemplo Wang y col (2010)(20) reportaron una producción de 85,5 g/L de ácido láctico similar a lo producido en este estudio.

La verificación del modelo fue acertada dado que la concentración de ácido láctico calculado por el software coincide con el valor obtenido experimentalmente determinando que las concentraciones de extracto de carne y peptona de caseína dado por la optimización por superficie de respuesta fueron los adecuados corroborando lo que se ajustó por el modelo.

En el escalamiento en biorreactor la mayor producción fue de 71,4 g/L de ácido láctico con una productividad mayor (4,40 g/L/h a las 16 h) en comparación con la producción en matraces (1,17 g/L/h a las 72 h). Sin embargo, al finalizar la fermentación la productividad en el biorreactor disminuyó a 0,99 g/L/h; estos resultados coinciden con el comportamiento obtenido por Coelho y col (2010) donde en biorreactor se alcanzó una mejor productividad 3,43 g/L/h en comparación con 2,89 g/L/h (nivel matraz) a las 12 h, demostrándose que en el escalamiento se pueden obtener valores cercanos a lo que se produce en matraces, pero en un menor tiempo.

El rendimiento (producto/sustrato) obtenido al final de la fermentación en biorreactor (0,898 g_p/g_s) fue similar a los obtenidos por Kotzamanidis y col (2002)(114) quienes presentan un rendimiento de 0,98 (g_p/g_s) y Dumbrepatil y col (2008) de 0,94 g_p/g_s a partir de 100 g/L de azúcares totales presentes en melaza de caña.

Además, se observa que a nivel de biorreactor la producción de ácido láctico fue menor que en matraces, coincidiendo nuevamente con Coelho (89,88 y 94,8 g/L en biorreactor y matraz, respectivamente), esto se debería a que en el biorreactor hay una mayor agitación pudiendo limitar la producción en la bacteria por ser anaeróbica.

VII. CONCLUSIONES

1. *Lactobacillus sp.* Hui1 aislado del fruto *Genipa americana* fue la cepa mayor productora de ácido láctico a 37 °C durante 72 h en presencia de carbonato de calcio como agente neutralizante.
2. Mediante el diseño Plackett - Burman se dedujo que, la producción de ácido láctico por *Lactobacillus sp* Hui1 mejora cuando se usa el extracto de carne, peptona de caseína, sulfato de manganeso y fosfato dipotásico. De acuerdo con el diseño central compuesto, las concentraciones óptimas de los factores fueron: 18,69 g/L de extracto de carne y 7,88 g/L de peptona de caseína; obteniendo de esta manera una concentración experimental de 84,2 g/L de ácido láctico, a nivel de matraces.
3. El medio optimizado de fermentación para la producción de ácido láctico por *Lactobacillus sp.* Hui1, tiene la siguiente composición: melaza de caña (100 g / L de azúcares totales presentes); 18,69 g/L extracto de carne, 7,88 g/L peptona de caseína, 1 g/L fosfato dipotásico, 0,03 g/L sulfato de manganeso, 5 g/L acetato de sodio y 0,1 g/L sulfato de magnesio.
4. En el escalamiento de la producción de ácido láctico se obtuvo una producción de 71,40 g/L con un rendimiento final de 0.898 g_p/g_s, con las condiciones optimizadas a nivel de matraces.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar concentraciones de melaza de caña, mayores de 200 g/L a fin de establecer si existe alguna inhibición por sustrato con la cepa Hui1.
- Determinar la producción de ácido láctico manteniendo el pH constante durante el proceso de fermentación debido a que en otros estudios aumenta la concentración.
- Realizar la modelización matemática de la producción de ácido láctico para mejorar el proceso y predecir el comportamiento.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *J Biotechnol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;156(4):286–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>
2. John RP, Sukumaran RK, Nampoothiri KM, Pandey A. Statistical optimization of simultaneous saccharification and l(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochem Eng J*. 2007;36(3):262–7.
3. Litchfield JH. Lactic Acid, Microbially Produced. *Encycl Microbiol* (Third Ed [Internet]. 2009;(79):362–72. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739445001516>
4. Crueger W, Crueger A. *Biología. Manual de Microbiología Industrial*. Acribia, editor. 1993.
5. Taborsky V. Small-Scale Processing of Microbial Pesticides. In: *Boletín de Servicios Agrícolas No 96*. Praga; 1992.
6. Jackson M. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1997;19(February):180–7.
7. Jáuregui J. Estudio comparativo de la fermentación en cultivo sumergido y en estado sólido de la guayaba de desecho.pdf. *Investigación y Ciencia*.
8. Starr JN, Westhoff G. Lactic Acid. *Ullmann's Encycl Ind Chem* [Internet]. 2014;1–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15_097.pub3
9. Estela W, Melzoch K, Quillama E. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Rev peru biol*. 2007;14(2):271–5.
10. Suarez Zuluaga DA. Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus Casei* ATCC 7469. Universidad de Eafit; 2007.
11. Chauhan K, Trivedi U, Patel KC. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresour Technol*. 2007;98(1):98–103.
12. Coelho LF, De Lima CJB, Rodovalho CM, Bernardo MP, Contiero J. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: Optimization of medium composition. *Brazilian J Chem Eng*. 2011;28(1):27–36.
13. Bustos G, Moldes AB, Alonso JL, Vázquez M. Optimization of D-lactic acid production

- by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiol.* 2004;21(2):143–8.
14. Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(1):333–5.
 15. Lima CJB, Coelho LF, Blanco KC, Contiero J. Response surface optimization of D(-)-lactic acid production by *Lactobacillus* SMI8 using corn steep liquor and yeast autolysate as an alternative nitrogen source. *African J Biotechnol.* 2009;8(21):5842–6.
 16. Vaca Barrera RV. Produccion de acido lactico mediante el uso de *Lactobacillus rhamnosus* a partir de melaza. Universidad Tecnica de Ambato; 2011.
 17. Araya-cloutier C, Rojas-garbanzo C, Velázquez-carillo C. Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultanea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (*Ananas comosus*), para su uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico. *Rev Iberoam polímeros.* 2010;11(7):407–16.
 18. García M C, Arrázola P G, Villalba M. Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial.* 2013;11(1):136–43.
 19. Eneque Manayay Y del M, Velasquez Millones LL. Síntesis de acido lactico a partir de lactosuero desproteinizado utilizando *Lactobacillus bulgaricus* aislado del yogurt. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2014.
 20. Wang L, Zhao B, Liu B, Yang C, Yu B, Li Q, et al. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresour Technol.* 2010;101(20):7895–901.
 21. Panesar PS, Kaur S. Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. *Int J Food Sci Technol.* 2015;50(10):2143–51.
 22. Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *J Chem Technol Biotechnol.* 2006;81(7):1119–29.
 23. Komesu A, Allan J, Oliveira R De, Regina M, Maciel W, Filho RM. Lactic Acid Production to Purification: A Review. *BioResources.* 2017;12(2).
 24. Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electron J Biotechnol.* 2004;7:167–79.
 25. Evangelista RL, Nikolov ZL. Recovery and purification of lactic acid from fermentation broth by adsorption. *Appl Biochem Biotechnol.* 1996;57–58(1):471–80.

26. Huang LP, Jin B, Lant P, Zhou J. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochem Eng J.* 2005;23(3):265–76.
27. Vijayakumar J, Aravindan R, Viruthagiri T. Recent Trends in the Production , Purification and Application of Lactic Acid. *Chem Biochem Eng Q.* 2008;2(2):245–64.
28. Orozco Murillo MP, Solarte JA. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Universidad Nacional de Colombia; 2003.
29. Serna C. L, Rodríguez de S. A, Albán A. F. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Rev Ing y Compet* [Internet]. 2011;5(1):16–26. Available from: <http://revistaingenieria.univalle.edu.co:8000/index.php/incompe/article/view/61>
30. Perry R, Green D, Maloney J. *Manual del Ingeniero Químico*. 6th ed. Mexico: Mc Graw Hill; 1992.
31. Sola Villatoro GV. Estudio de factibilidad para la producción de ácido láctico comercial, a nivel industrial en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2006.
32. Cooper D, Doucet L, Pratt M. Understanding in multinational organizations. *J Organ Behav.* 2007;28(3):303–25.
33. Wee Y, Kim J, Ryu H. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. 2006;44(2):163–72.
34. Product Bulletin PI. *Lactic Acid and Lactates*. Arlington Heights, IL; 1989.
35. Datta R, Tsai S, Bonsignore P, Moon S, Frank JR. Technological and economical potencial of poly(lactic acid) and Lactic Acid Derivatives. *FEMS Microbiol Rev.* 1995;16:221–31.
36. Campos Trindade M. Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de membranas líquidas surfatantes. Universidad Federal de Minas Gerais; 2002.
37. Sheeladevi A, Ramanathan N. Lactic Acid Production Using Lactic Acid Bacteria under Optimized Conditions. 2011;2(6):1686–91.
38. Miller C, Fosmer A, Rush B, McMullin T, Beacom D, Suominen P. 3.17 - Industrial Production of Lactic Acid [Internet]. Second Edi. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier B.V.; 2011. 179-188 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008088504900177X>
39. Vink ETH, Glassner D a., Kolstad JJ, Wooley RJ, O'Connor RP. The eco-profiles for

- current and near-future NatureWorks® polylactide (PLA) production. *Ind Biotechnol* [Internet]. 2007;3(1):58–81. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ind.2007.3.058>
40. Gao C, Ma C, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;29(6):930–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>
 41. Anders IRJ, John G, Milkowski AL. Method for delaying *Clostridium botulinum* growth in fish and poultry. United States; 4,888,191, 1989. p. 58–60.
 42. Norton S, Lacroix C, Vuilleumard J. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. 1994;16:457–66.
 43. Del Pozo Garcia M, Díaz Llorens F, Fernández Procas S, Tellado del Pozo A, Vila Torrent A. Planta de producción de ácido láctico. Cerdanyola del Vallés; 2010.
 44. Parra Huertas R a. Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Fac ciencias Agropecu*. 2010;8:93–105.
 45. Holzappel WH, Wood BJ., editors. *Lactic acid bacteria: Biodiversity and taxonomy*. vol. 2. Wiley; 2014.
 46. Hammes WP, Hertel C. Genus *Lactobacillus*, Beijerinck 1901, 212AL. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Wiley; 2015. p. 32–55.
 47. Huys G, Vancanneyt M, D'Haene K, Vankerckhoven V, Goossens H, Swings J. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res Microbiol*. 2007;803–10.
 48. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, VonWright A, editors. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1993. p. 1–63.
 49. Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *ApplMicrobiol Biotechnol*. 2006;71:394–406.
 50. Kleerebezem M, Hugenholtz J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:232 – 237.
 51. Kandler, O. & Weiss N. Genus *Lactobacillus*, Beijerinck 1901, 212AL. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. p. 1209–34.
 52. Hammes WP, Vogel RF. The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzappel WH, editors. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. vol 2. Blackie Academic & Professional;

1995. p. 19–54.
53. Hammes WP, Hertel C. Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck, 1901. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Al. E, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Berlin: Springer; 2009. p. 465–510.
 54. Okano K, Yoshida, S. T, Anaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Lactic acid fermentation from arabinose by redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:5175–8.
 55. Ledesma, O.V., De Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., De Giori, G.S., Raibaud P. & Galpin JV. A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *J Appl Bacteriol*. 1977;42:123–33.
 56. Vega E, Rodríguez W. Producción de alimentos por actividad bacteriana-Fermentación. 2012;1–12. Available from: https://laboratoriomicroaplicada.files.wordpress.com/2008/11/alimentos_fermentados.pdf
 57. Zhang Y, Cong W, Shi S. Application of a pH feedback-controlled substrate feeding method in lactic acid production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;162(8):2149–2156.
 58. Bamforth CW. *Alimentos: Fermentación y microorganismos*. Zaragoza: Acribia Editorial; 2005. 268 p.
 59. Bujang K, Sujang S, Salwani D, Adeni A. Effects of Calcium Carbonate in Fermentation of L-Lactic Acid from Hydrolyzed Sago Starch. *ICBiotech. Japan*; 2004;26:637–43.
 60. Quintero R. *Ingeniería Bioquímica*. 1st ed. Mexico: Editorial Alhambra; 1981. 33-37 p.
 61. Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme Microb Technol*. 2000;26(2–4):87–107.
 62. Serrato J. Estudio cinético de la fermentación láctica en un reactor de lecho fijo con recirculación. Universidad Nacional De Colombia.; 2004.
 63. Aragon Arias JJ. Evaluación de fuentes alternativas de nitrógeno en fermentación láctica. Universidad Nacional de Colombia; 2015.
 64. Soto Montes CA. Evaluación de la producción de ácido láctico empleando residuo de mora y suero de leche en sistema de lote. Universidad Pontificia Bolivariana; 2015.
 65. Mrvčić J, Stanzer D, Šolić E, Stehlik-Tomas V. Interaction of lactic acid bacteria with

- metal ions: Opportunities for improving food safety and quality. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28(9):2771–82.
66. Amrane A. Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *J Chem Technol Biotechnol.* 2000;75(3):223–8.
67. Parzanese M. Fermentación En Sustrato Sólido : Aprovechamiento De Subproductos De La Agroindustria. *Tecnol para la Ind Aliment.* Ficha N° 2:1–13.
68. Sánchez Miguel A. Fermentación De Malta Empleando Un Sistema Semicontinuo En El Proceso De Elaboración De Cerveza. *Univ Tecnológica La Mix.* 2011;105.
69. Sanchez V. Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos [Internet]. Universidad de Buenos Aires; 1999. Available from: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3218_Sanchez.pdf
70. Couto SR, Sanromán MÁ. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *J Food Eng.* 2006;76(3):291–302.
71. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Response surface methodology. 4th ed. Balding DJ, Cressie NAC, Fitzmaurice GM, Givens GH, editors. New Jersey: John Wiley and Sons; 2016. 855 p.
72. Ayala J, Pardo R. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. Concytec, editor. Lima; 1995. 261 p.
73. Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. Segunda. 2004.
74. Vela Peón F. Prueba de falta de ajuste (lack- of- fit test). Mexico; 2011.
75. Rodríguez E, Desan M. Análisis de la Varianza, ANOVA [Internet]. Mexico; 2016. p. 1–36. Available from: http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/Laboratoriovirtualdeestadistica/CARPETA_3_INFERENCIA_ESTADISTICA/DOC_INFERENCIA/TEMA_4/08_PRUEBA_DE_CHICUADRADA.pdf
76. Rodríguez Bernal J., Serna Jiménez J., Uribe Bohórquez M., Klotz B, Quintanilla Carvajal M. Application of response surface methodology to evaluate the concentration of sugar and commercial starters on the fermentation kinetics of yogurt. *Rev Mex Ing Quim* [Internet]. 2014;13:213–25. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62031166017.pdf>
77. Box G, Behken D. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics.* 1960;4:455–75.

78. Ferré J. El diseño factorial completo 2^k . Universidad Rovira i Virgili. [Tarragona]; 2011.
79. Cortés P, Ruiz M. Diseños factoriales fraccionarios y metodología del diseño robusto de parámetros. Universidad de Granada; 2013.
80. Cámara M., De Zan M., Vera Candiotti L, Goicochea H. Diseño experimental y optimización de sistemas [Internet]. Santa Fe; 2016. Available from: <http://www.fbc.unl.edu.ar/laboratorios/ladaq/wp-content/uploads/2016/06/2-Selección-factores-2016.pdf>
81. Montgomery DC. Diseño y análisis de experimentos. 2004.
82. Arnáiz C, Isac L, Lebrato J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnol del agua*. 2000;45–52.
83. Rodríguez Arzave JA. Manual de practicas de bioquímica [Internet]. 4th ed. Monterrey N. L; 1987. Available from: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020111502/1020111502.html>
84. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Assoc Off Anal Chem Int. 1999;Method ce 2-66.
85. Pacios A, Cruz Y, Bell A, Carrera E, Michelena G. Síntesis y caracterización del lactato ferroso para la fortificación de alimentos infantiles. *CIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar*. 2009;XLIII (1):36–43.
86. Chen YS, Wu HC, Yanagida F. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. *Brazilian J Microbiol*. 2010;41(4):916–21.
87. Plackett RL, Burman JP. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*. 1946;33:305–25.
88. Hammes WP, Hertel C. *Lactobacillus Beijerinck* 1901, 212. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Al. E, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Berlin: Wiley; 2015. p. 1–76.
89. Serna Cock L, Rodríguez de Stouvenel A. Producción Económica de Ácido Láctico Utilizando Residuos de Cosecha y Jugos de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Agric Técnica*. 2007;67(1):29–38.
90. Magni C, García-quintáns N, Martín M, De Mendoza D. Sistemas de utilización del citrato en bacterias ácido lácticas. 2000;1–38.
91. García-Quintáns N, Magni C, De Mendoza D, López P. The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:850–857.

92. Magni C, De Mendoza D, Konings WN, Lolkema JS. Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: resistance against lactate toxicity at low pH. *J Bacteriol.* 1999;181:1451–7.
93. Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia: tecnologia das fermentações*. São Paulo; 1975.
94. Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp . *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation □. 2008;74(1):333–5.
95. Haully M, Oliveira A, Oliveira A. Lactic acid production by *Lactobacillus curvatus* in sugarcane molasses. *Semin Ciências Agrárias, Londrina.* 2003;24:133–42.
96. Aeschlimann A, Von Stockar U. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 1990;32(6201):398–402. Available from: <http://download.springer.com/static/pdf/40/art%253A10.1007%252FBF00903772.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2FBF00903772&token2=exp=1492292719~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F40%2Fart%25253A10.1007%25252FBF00903772.pdf%3ForiginUrl%3Dh>
97. Hujanen M, Linko Y-Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+) - lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;45:307–13.
98. Yumoto I, Ikeda K. Direct fermentation of starch to L-(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. *Biotechnol Lett.* 1995;17(5):543–6.
99. John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.* 2006;41(4):759–63.
100. Senthuran A, Senthuran V, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: A step towards optimization. *J Biotechnol.* 1999;73(1):61–70.
101. Ohkouchi Y, Inoue Y. Impact of chemical components of organic wastes on l(+)-lactic acid production. *Bioresour Technol.* 2007;98(3):546–53.
102. Rios CA. Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando tecnología de membranas. . Qro. Universidad Autónoma de Querétaro; 2011.
103. Archibald FS. Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria.

- Crit Rev Microbiol [Internet]. 1986;13(1):63–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522109>
104. Arellano Arriaga A. Evaluación del proceso de obtención y separación de suero lácteo mediante tecnología de membrana. Universidad Autonoma de Querétaro; 2013.
 105. Nowakowska-Waszczyk A. The effect of certain cations on the growth of *Lactobacillus lactis* and *L. delbrueckii*. II. The influence of magnesium on the morphology and structure of cells. *Acta Microbiol Pol.* 1965;14(2):145–53.
 106. Harold FM, Van Brunt J. Circulation of H⁺ and K⁺ across the plasma membrane is not obligatory for bacterial growth. *Science* (80-). 1977;197:372–3.
 107. McLeod R, Snell E. Some mineral requirement of the lactic acid bacteria. *J Biol Chem.* 1947;170:351–65.
 108. Vincent J. P, Esmond E. S. Peptides and bacterial growth. *J Bacteriol.* 1954;67(1):69–76.
 109. Chauhan K, Trivedi U, Patel KC. Application of Response Surface Methodology for Optimization of Lactic Acid Production Using Date Juice. *Journal Microbiol Biotechnol.* 2006;16(9):1410–5.
 110. Madigan, M. T., Martinko J. M. y Parker J. Brock: *Biología de los Microorganismos*. 10th ed. México: Pearson Educación; 2004. 103-111 p.
 111. McFaddin. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3rd ed. 2003.
 112. Laboratori Britania. M.R.S. Caldo [Internet]. Argentina; p. 1–2. Available from: http://www.britanialab.com/productos/413_hoja_tecnica_es.pdf
 113. Yu L, Lei T, Ren X, Pei X, Feng Y. Response surface optimization of l(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochem Eng J.* 2008;39(3):496–502.
 114. Kotzamanidis C, Roukas T, Skaracis G. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World J Microbiol Biotechnol.* 2002;18:441–448.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Materiales y reactivos

- Asa de siembra
- Beakers (40 y 250 mL)
- Matraces (25, 100 y 500 mL)
- Micropipetas (200 y 1000 μ L)
- Pipetas
- Placas Petri
- Probetas (50 y 250 mL)
- Termómetro
- Tubos de ensayo
- Acetato de sodio (AMRESCO)
- Agua destilada
- Caldo MRS (MERCK)
- Carbonato de calcio (AMRESCO)
- Celobiosa (AMRESCO)
- Citrato de amonio (MERCK)
- Extracto de carne (OXOID)
- Extracto de levadura (OXOID)
- Fosfato dipotásico (AMRESCO)
- Galactosa (AMRESCO)
- Glucosa (AMRESCO)
- HCl (AMRESCO)
- Lactosa (AMRESCO)
- Maltosa (AMRESCO)
- Melaza de caña
- NaOH (AMRESCO)
- Peptona de caseína (OXOID)
- Peptona bacteriológica (OXOID)
- Sulfato de magnesio (MERCK)
- Sulfato de manganeso (MERCK)
- Tween 80 (AMRESCO)

Equipos de análisis

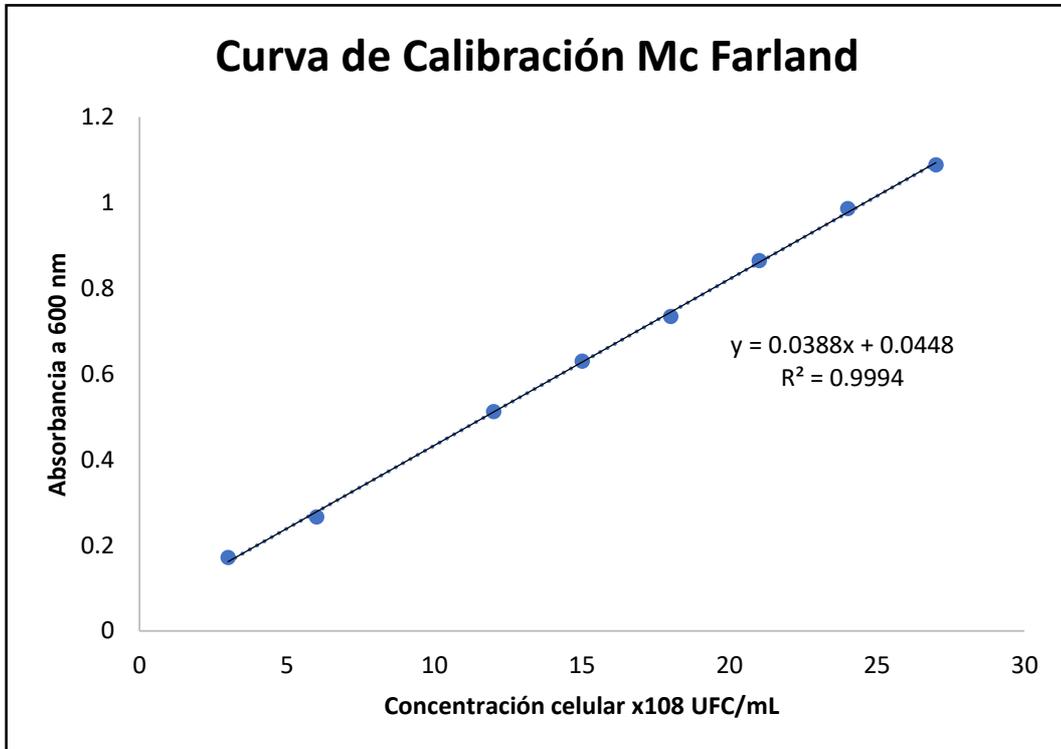
- Espectrofotómetro Genesys 10 UV (THERMO)
- pH metro (HANNA)
- Refractómetro (ECURED)

Equipos de procesos

- Autoclave
- Balanza Analítica (EPPENDORF)
- Biorreactor ez- control (APPLIKON)
- Centrifuga 5810R (EPPENDORF)
- Cocinilla
- Incubadora (PRECISION)
- Shaker (PRECISION)

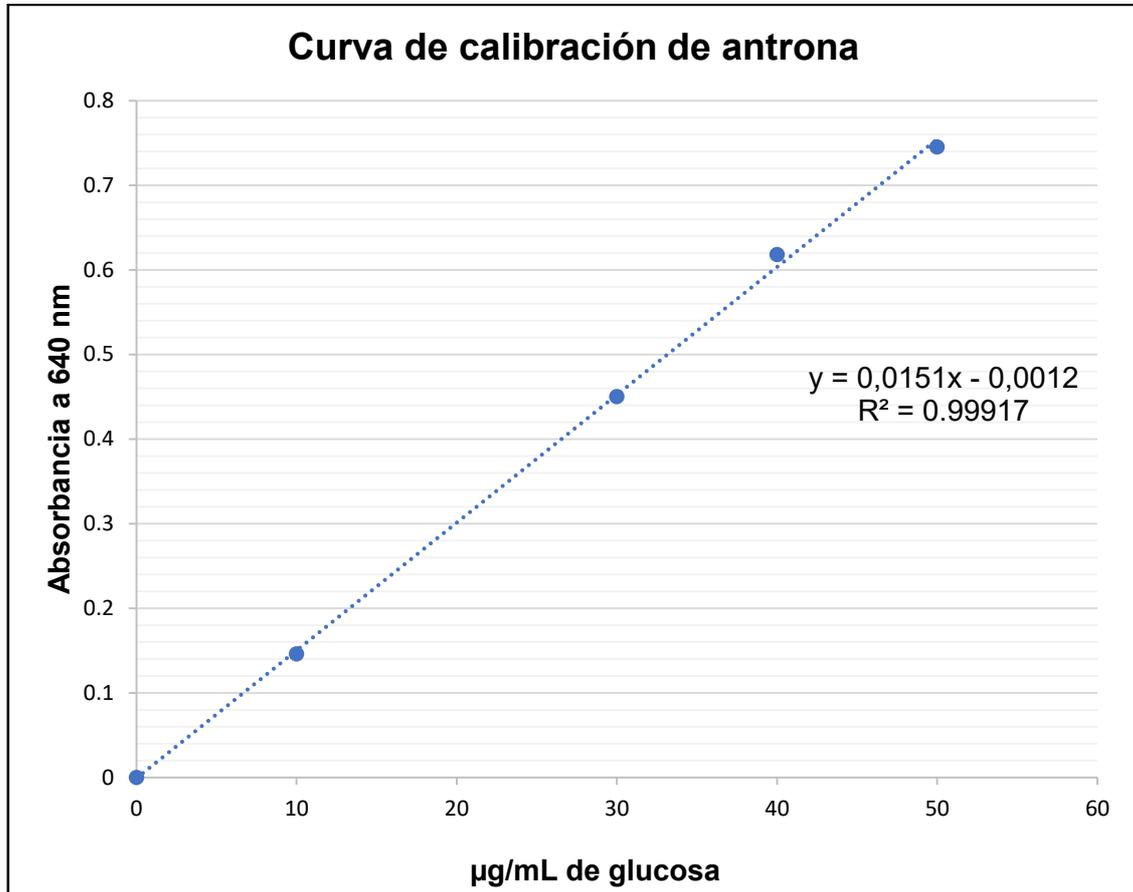
ANEXO 2

Curva de Mc Farland



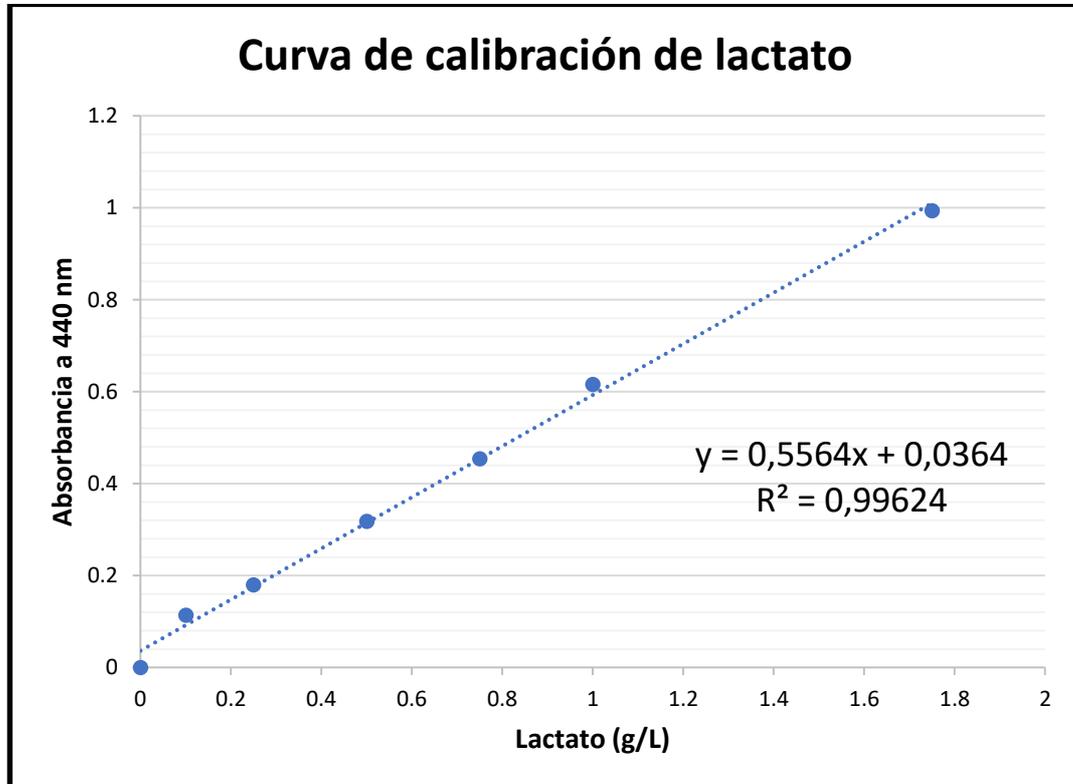
ANEXO 3

Curva de calibración con antrona para determinar azúcares totales



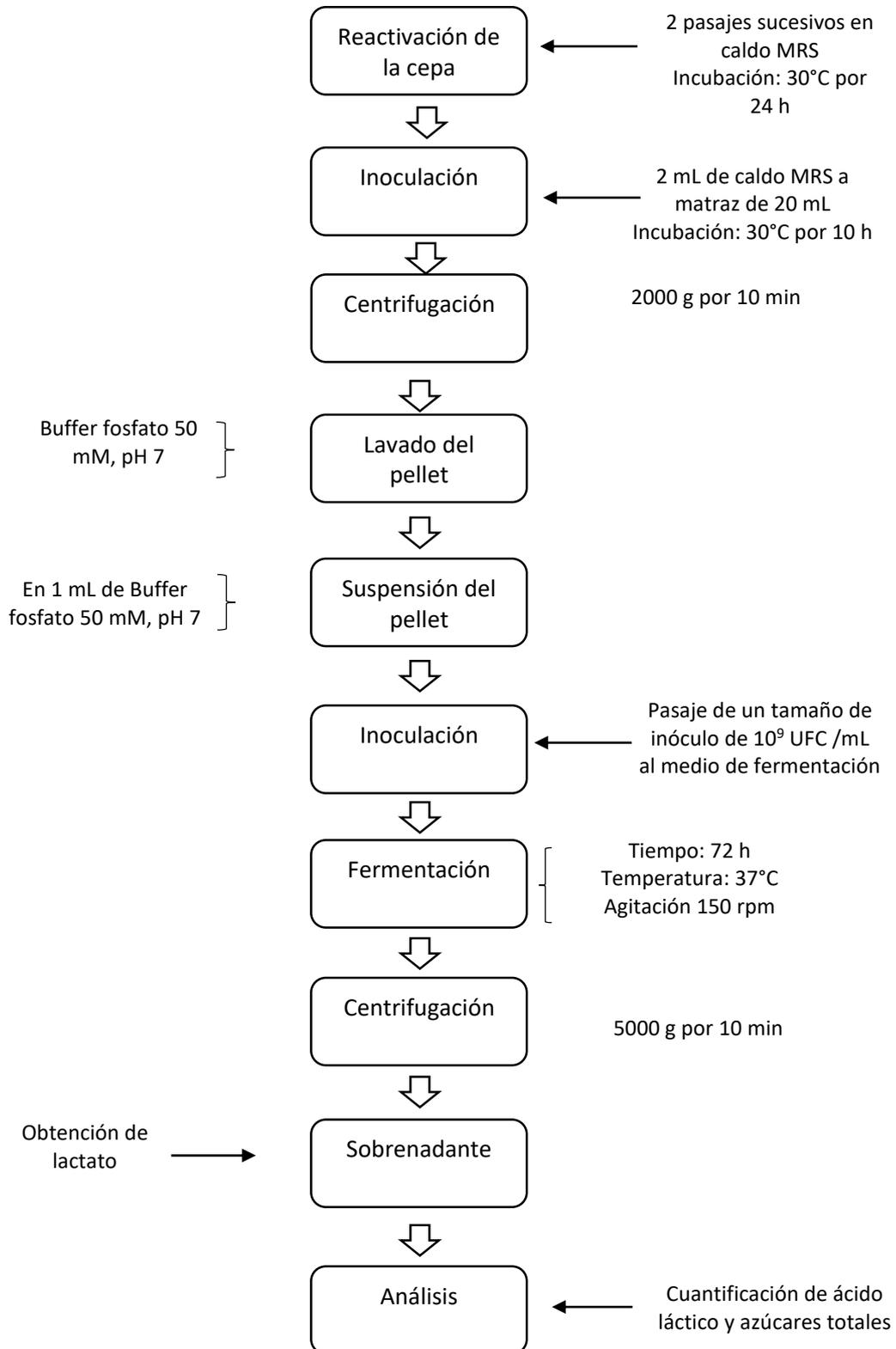
ANEXO 4

Curva de calibración de lactato por el método de cloruro férrico



ANEXO 5

Diagrama de proceso de la producción de ácido láctico



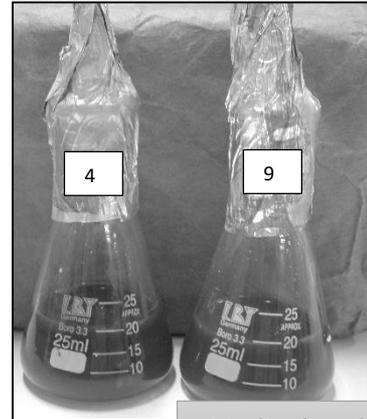
ANEXO 6

Producción de ácido láctico a nivel de matraces

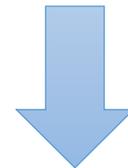


Melaza de caña
(Fuente de carbono)

Preparación de
medio de cultivo



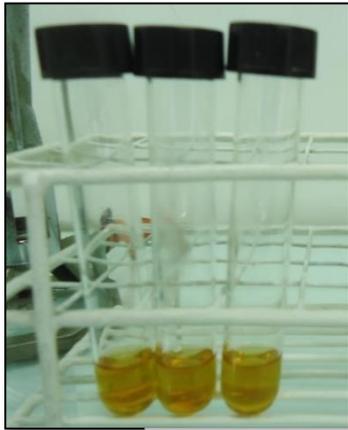
Medio de cultivo



Producción a nivel de matraces

ANEXO 7

Desarrollo del proceso de fermentación en biorreactor



Reactivación de la cepa

Pasaje a matraz



Escalamiento

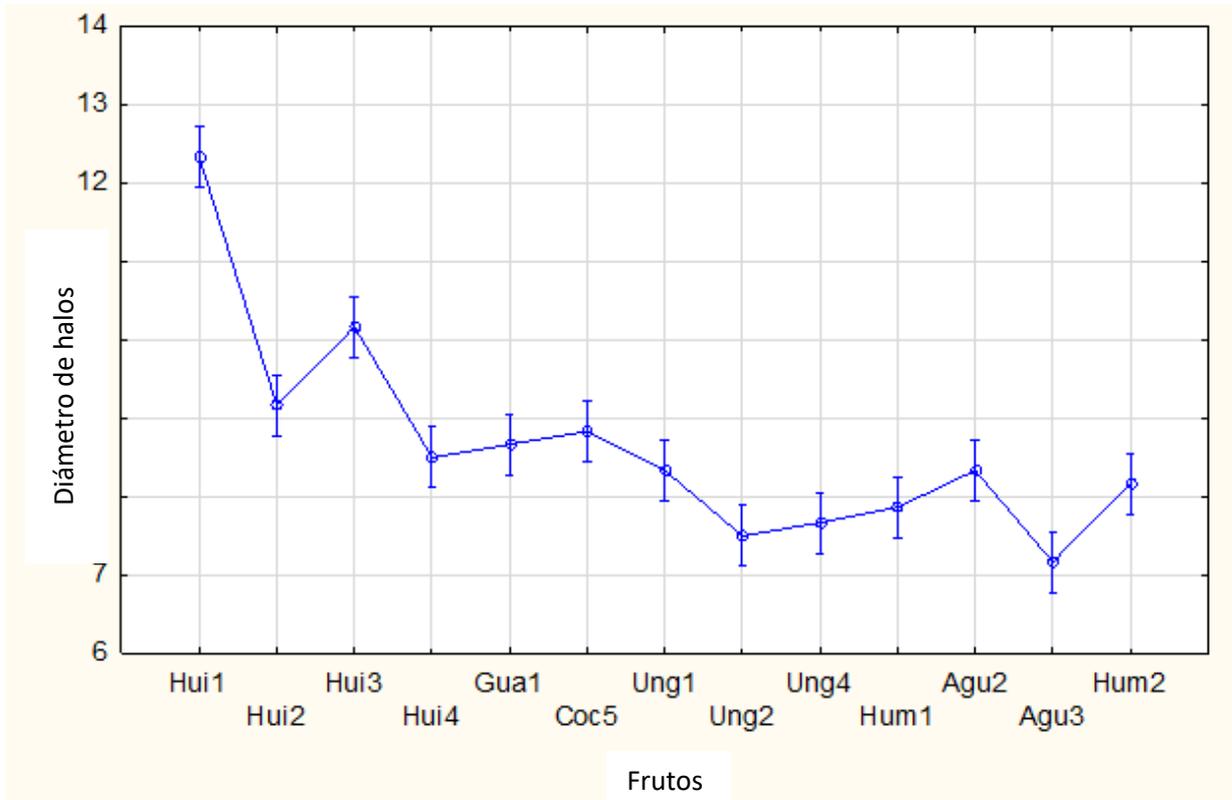


Jarra de biorreactor con medio de cultivo



ANEXO 8

Prueba de Dunnett de la selección de la cepa mejor productora de ácido láctico



Dunnett test; variable Var2 (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests (2-sided) Error: Between MS = .44974, df = 26.000		
Cell No.	Var1	{1} 12.333
1	Hui1	
2	Hui2	0.000053
3	Hui3	0.004945
4	Hui4	0.000009
5	Gua1	0.000011
6	Coc5	0.000016
7	Ung1	0.000007
8	Ung2	0.000007
9	Ung4	0.000007
10	Hum1	0.000007
11	Agu2	0.000007
12	Agu3	0.000006
13	Hum2	0.000007

ANEXO 9

Prueba de Tukey del diseño de un factor a la vez

- Fuentes de carbono

Tukey HSD test; variable Ácido láctico (g/L) (Spreadsheet5) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .17357, df = 16.000											
Cell No.	Fuentes de carbono	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	Base		0.00017	0.00017	0.00017	0.00018	0.00017	0.00017	0.00017	0.00018	0.00051
2	glucosa	0.00017		0.99964	1.00000	0.99999	0.00017	1.00000	0.99944	1.00000	0.18843
3	Fructosa	0.00017	0.99964		0.99919	0.94514	0.00018	0.99482	1.00000	0.97703	0.03767
4	maltosa	0.00017	1.00000	0.99919		0.99999	0.00017	1.00000	0.99878	1.00000	0.21089
5	Galactosa	0.00018	0.99999	0.94514	0.99999		0.00017	1.00000	0.93511	1.00000	0.48069
6	Caña de Azúcar	0.00017	0.00017	0.00018	0.00017	0.00017		0.00017	0.00018	0.00017	0.00017
7	Lactosa	0.00017	1.00000	0.99482	1.00000	1.00000	0.00017		0.99300	1.00000	0.28526
8	Sacarosa	0.00017	0.99944	1.00000	0.99878	0.93511	0.00018	0.99300		0.97147	0.03504
9	Celobiosa	0.00018	1.00000	0.97703	1.00000	1.00000	0.00017	1.00000	0.97147		0.38737
10	Tween 80*	0.00051	0.18843	0.03767	0.21089	0.48069	0.00017	0.28526	0.03504	0.38737	
11	Almidón	1.00000	0.00017	0.00017	0.00017	0.00018	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00039
12	Melaza	0.00017	0.07142	0.32074	0.06287	0.02111	0.00123	0.04377	0.33873	0.02913	0.00034
13	Citrato*	0.00017	0.00019	0.00026	0.00019	0.00018	0.00018	0.94428	0.00027	0.00018	0.00017
14	Acetato*	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017	0.98725	0.00017	0.00017	0.00017	0.00017
15	Citrato	0.48741	0.00026	0.00019	0.00027	0.00051	0.00017	0.00033	0.00019	0.00041	0.03995
16	Acetato	1.00000	0.00017	0.00017	0.00017	0.00018	0.00017	0.00017	0.00017	0.00018	0.00054

*Los valores de color rojo son los que resultan ser significativos con respecto a cualquier factor con el que se está realizando la comparación.

- Fuentes de nitrógeno e iones

Tukey HSD test; variable Ácido láctico (g/L) (Spreadsheet15) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .22832, df = 8.0000										
Cell No	Fuentes de nitrógeno iones	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
1	Base		0.99999	0.51115	0.03048	0.00051	0.87389	0.00287	0.55798	0.55798
2	Mg	0.99999		0.40869	0.04091	0.00046	0.77853	0.00233	0.46918	0.46918
3	Mn	0.51115	0.40869		0.00243	0.00238	0.99589	0.02946	0.99999	0.99999
4	K ₂ HPO ₄	0.03048	0.04091	0.00243		0.00024	0.00543	0.00025	0.00744	0.00744
5	Extracto de carne	0.00051	0.00046	0.00238	0.00024		0.00126	0.41787	0.01184	0.01184
6	Extracto Levadura	0.87389	0.77853	0.99589	0.00543	0.00126		0.01232	0.98592	0.98592
7	Peptona Caseína	0.00287	0.00233	0.02946	0.00025	0.41787	0.01232		0.11975	0.11975
8	Peptona Bacteriológica	0.55798	0.46918	0.99999	0.00744	0.01184	0.98592	0.11975		1.00000

*Los valores de color rojo son los que resultan ser significativos con respecto a cualquier factor con el que se está realizando la comparación.