

AJUSTE DE UN MODELO CINÉTICO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* EN LA FERMENTACIÓN DE UN SUSTRATO COMPLEJO

JUAN FERNANDO CALDERÓN VARGAS

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2017

AJUSTE DE UN MODELO CINÉTICO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus* EN LA FERMENTACIÓN DE UN SUSTRATO COMPLEJO

JUAN FERNANDO CALDERÓN VARGAS

Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO

Directora
ADRIANA INÉS PÁEZ MORALES
MSc. Microbióloga Industrial

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2017

Nota de Aceptaci3n

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Bogot3, D.C., Noviembre de 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano de la Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI

Director de Investigaciones

Ing. ARMANDO FERNÁNDEZ CÁRDENAS

Director Programa Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

Dedico este trabajo a mis padres por la paciencia y comprensión durante mi formación profesional. Por su inagotable apoyo, y los valores que me han inculcado para ser la persona que soy.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a la microbióloga industrial y directora del proyecto Adriana Inés Páez Morales, por transmitirme sus conocimientos y enseñanzas; además de su constante apoyo en la parte experimental y la parte investigativa.

Al grupo de investigación de Procesos de Separación no convencionales (GPS) y al Sena Tecnoparque Nodo Bogotá, por su asistencia tanto teórica como experimental durante la realización del proyecto.

A los docentes que a lo largo del pregrado compartieron sus conocimientos y me apoyaron para culminar esta etapa de mi vida.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS	21
1. MARCO TEÓRICO	22
1.1 ÁCIDO LÁCTICO	22
1.1.1 Obtención del ácido láctico	23
1.1.1.1 Obtención por vía química	23
1.1.1.2 Obtención a partir de microorganismos	24
1.1.2 Aplicación industrial	27
1.1.3 Métodos de Separación	27
1.1.3.1 Clarificación de medios de fermentación por microfiltración con flujo cruzado	28
1.1.3.2 Extracción Reactiva	28
1.1.3.3 Electrodiálisis	29
1.1.4 Mercado del Ácido Láctico	29
1.2 FERMENTACIÓN	29
1.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	30
1.4 MODELOS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO	32
1.4.1 Ecuación Logística	34
1.4.2 Modelo de Monod	35
1.4.3 Modelo de Moser	36
1.4.4 Modelo de Teissier	37
1.4.5 Modelo de Haldane	38
1.4.6 Modelo de Contois	39
1.4.7 Modelo de Amrane y Prigent	40
1.4.8 Modelo de Gompertz	41
1.4.9 Modelo de Powell	42
1.5 VALIDACIÓN DE MODELOS CINÉTICOS	43
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	44
2.1 CEPA BACTERIANA	44
2.2 PIÑA (<i>ANANAS COMOSUS MER</i>)	44
2.3 REACTIVOS	45
2.4 TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN	45
2.5 FERMENTACIÓN MICROBIANA	46
2.5.1 Activación de la Ceba	48
2.5.2 Preparación del medio	48
2.5.3 Fermentación	49
2.6 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA	49
2.6.1 Diluciones	50

2.6.2 Siembra	50
2.6.3 Obtención de datos	50
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
3.1 FERMENTACIÓN	52
3.2 CINÉTICA MICROBIANA	52
4. CONCLUSIONES	62
5. RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Reactivos.	45
Tabla 2. Crecimiento microbiano durante la fermentación.	51
Tabla 3. Valores de los parámetros estimados de los modelos de crecimiento microbiano a partir del método integral de análisis en la fermentación de un sustrato complejo con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	59

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfico 1. Crecimiento de biomasa a través del tiempo.	53
Gráfico 2. Crecimiento Microbiano y Consumo de Sustrato a través del tiempo.	54
Gráfico 3. Ajuste de datos experimentales a los modelos cinéticos cuya variable independiente es la biomasa.	55
Gráfico 4. Ajuste de datos experimentales a los modelos cinéticos cuya variable independiente es el tiempo.	56
Gráfico 5. Tasa de crecimiento específica en función del tiempo.	57
Gráfico 6. Dispersión de tiempos calculados.	58
Gráfico 7. Dispersión de biomasa calculada.	59

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura del ácido láctico.	23
Figura 2. Producción de ácido láctico por vía química.	24
Figura 3. Rutas metabólicas para la producción de ácido láctico a partir de bacterias ácido lácticas.	25
Figura 4. Crecimiento microbiano a través del tiempo.	31
Figura 5. Metodología de la fermentación.	47
Figura 6. Fermentador cargado con el caldo de cultivo.	48

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 2. Frasco de tapa azul	72
Imagen 3. Tubo de cultivo tapa rosca.	72
Imagen 4. Caja de Petri.	73
Imagen 5. Instrumentos de medición volumétrica.	74
Imagen 6. Micropipeta.	74
Imagen 7. Rastrillo.	75
Imagen 8. Incubadora.	75
Imagen 9. Agitador.	76

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Ecuación logística para crecimiento microbiano	34
Ecuación 2. Crecimiento de biomasa en función del tiempo.	34
Ecuación 3. Ecuación de Monod para el crecimiento de biomasa.	35
Ecuación 4. Ecuación de Monod para el consumo de sustrato.	35
Ecuación 5. Ecuación integrada del modelo de Monod	35
Ecuación 6. Ecuación de Moser.	36
Ecuación 7. Modelo de Moser para crecimiento microbiano	36
Ecuación 8. Modelo de Teissier.	37
Ecuación 9. Modelo de Teissier para crecimiento microbiano.	37
Ecuación 10. Modelo de Haldane.	38
Ecuación 11. Modelo de Haldane para crecimiento microbiano.	38
Ecuación 12. Expresión integrada del modelo de Haldane.	38
Ecuación 13. Modelo de Contois.	39
Ecuación 14. Modelo de Contois para crecimiento microbiano.	39
Ecuación 15. Expresión integrada del modelo de Contois.	39
Ecuación 16. Ecuación de Amrare y Prigent.	40
Ecuación 17. Modelo de Amrare y Prigent para crecimiento microbiano.	40
Ecuación 18. Expresión integrada de la ecuación de Amrare y Prigent.	40
Ecuación 19. Modelo de Gompertz para crecimiento microbiano.	41
Ecuación 20. Expresión matemática para obtener tasa de crecimiento específica.	41
Ecuación 21. Expresión matemática para obtener la duración de la fase de latencia.	41
Ecuación 22. Expresión matemática para obtener la máxima densidad de población microbiana.	41
Ecuación 23. Ecuación de Powell.	42
Ecuación 24. Modelo de Powell para crecimiento microbiano.	42
Ecuación 25. Expresión integrada del modelo de Powell.	42
Ecuación 26. Porcentaje de error de mínimos cuadrados.	43
Ecuación 27. Ecuación para la determinación de unidades formadoras de colonia por unidad de volumen.	46

SÍMBOLOS

- AL** : ácido Láctico.
- f_i** : datos calculados para el cálculo de porcentaje de error de mínimos cuadrados.
- K_i** : constante de inhibición del modelo de Haldane.
- K_s** : concentración de sustrato para que la tasa de crecimiento específica alcance la mitad de su valor máximo (g/mL).
- L** : constante de difusión modelo de Powell.
- LDP** : duración de la fase de latencia (h).
- MDP** : máxima densidad de población (UFC/mL).
- MSE** : porcentaje de error de mínimos cuadrados (%).
- n** : parámetro empírico ecuación de Mosser.
- n_T** : número total de datos experimentales recolectados.
- R²** : coeficiente de correlación.
- rpm** : revoluciones por minuto.
- S** : concentración de sustrato (g/mL).
- S₀** : concentración de sustrato inicial (g/mL).
- t** : tiempo (h).
- μ** : tasa de crecimiento específica (h⁻¹).
- UFC** : unidades formadoras de colonia.
- X** : concentración de biomasa (UFC/mL).
- X_m** : concentración máxima de biomasa (UFC/mL)
- X₀** : concentración de biomasa inicial (UFC/mL).
- y_i** : datos experimentales para el cálculo de porcentaje de error de mínimos cuadrados.
- Y_{xs}** : rendimiento de biomasa por sustrato consumido.

GLOSARIO

ÁCIDO LÁCTICO: importante materia prima e intermediario en las industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética.

ÁCIDO POLILÁCTICO: polímero termoplástico biodegradable con propiedades similares al PET.

CEPA MICROBIANA: identificación mediante características determinadas para un grupo particular de microorganismos.

CRECIMIENTO DIAÚXICO: etapa de crecimiento en la cual el microorganismo se adapta a una nueva fuente de carbono presente en el medio de cultivo.

FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL: etapa en la que los microorganismos se reproducen a la mayor velocidad del proceso fermentativo.

FASE DE LATENCIA: etapa en la que el microorganismo se adapta a las condiciones del medio de cultivo.

FASE DE MUERTE: etapa en la que la reproducción de microorganismos no ocurre más y por el contrario empieza a haber lisis celular.

FASE ESTACIONARIA: etapa en la que el microorganismo ha alcanzado su máximo crecimiento.

FERMENTACIÓN MICROBIANA: proceso por el cual los microorganismos presentes en el medio de cultivo metabolizan los azúcares y producir metabolitos de distintos tipos.

MEDIO DE CULTIVO: mezcla de nutrientes que permiten que los microorganismos asimilen sus nutrientes y se reproduzcan.

METABOLITO PRIMARIO: metabolito que se produce asociado al crecimiento del microorganismo.

MICROORGANISMO MESÓFILO: microorganismo cuyo rango óptimo de temperatura para su crecimiento está entre los 35 y 40°C.

MODELOS CINÉTICOS ESTRUCTURADOS: modelos cinéticos que consideran la población microbiana como un todo, con características generales para todos.

MODELOS CINÉTICOS NO ESTRUCTURADOS: modelos cinéticos que consideran las distintas diferencias entre los microorganismos, como la edad de las células, por ejemplo.

RUTA METABÓLICA: proceso bioquímico por el cual los microorganismos metabolizan un sustrato para producir metabolitos, para producir o consumir energía.

SUSTRATO COMPLEJO: mezcla de nutrientes cuya composición química específica es desconocida.

SUSTRATO DEFINIDO: mezcla de nutrientes cuya composición química es conocida en su totalidad.

RESUMEN

El presente estudio llevó a cabo una fermentación microaerofílica durante 96 horas utilizando bacterias de la especie *Lactobacillus* y del género *acidophilus*, con agitación constante a 150 rpm y un rango de temperatura entre los 34-37 °C.

Para la recolección de datos, se realizó un muestreo cada 12 horas, para su posterior siembra y conteo de microorganismos mediante la técnica de recuento en placa. Obteniéndose posteriormente la curva de crecimiento microbiano.

A partir de los datos experimentales recolectados se compararon 8 modelos cinéticos no estructurados cuyos parámetros se estimaron a partir del ajuste de los datos experimentales mediante regresiones no lineales. Se simularon los procesos fermentativos con los parámetros obtenidos y se compararon con los datos experimentales según el coeficiente de correlación y el porcentaje de error de mínimos cuadrados.

Los modelos de Haldane y Amrane y Prigent fueron los que mejor se ajustaron a los datos experimentales, con un R^2 de 0.977 y 0.982, respectivamente.

Dichos parámetros cinéticos obtenidos que describen el crecimiento de los microorganismos involucrados en la fermentación, permiten predecir el desempeño, rendimientos y comportamiento en general de los procesos fermentativos.

Palabras clave: Ácido Láctico, Bacterias Ácido Lácticas, Fermentación, Parámetros Cinéticos, Crecimiento microbiano, Modelos Cinéticos.

INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es el precursor de uno de los polímeros termoplásticos biodegradables más importantes empleados industrialmente, el ácido poliláctico. Alrededor del 15% de la producción mundial que ronda las 40.000 toneladas al año de ácido láctico para el 2005¹, se destina para aplicaciones industriales como la producción de desinfectantes, emulsificantes, conservantes o hidratantes en la industria cosmética; mientras que el 85% restante, se destina a la industria alimenticia, para ser utilizado como acidulante, saborizante, neutralizador de pH e inhibidor bacteriano².

Su producción industrial se ha dado a través del tiempo por dos principales vías: La vía química, a partir de precursores o derivados de compuestos petroquímicos, principalmente a partir de acetaldehído y ácido cianhídrico³. Actualmente, se ha desarrollado la vía biotecnológica para obtener este producto y es a partir de bacterias acidolácticas o distintos tipo de hongos; esta permite mejorar las condiciones de operación, como por ejemplo, la operación a temperaturas cercanas a la de ambiente, presión atmosférica y sustratos de bajo valor comercial y de fácil acceso, lográndose así, la utilización de recursos renovables y el mejoramiento en la eficiencia del proceso en general⁴.

La ingeniería química, juega un papel determinante en el desarrollo de este proyecto, dado que actualmente, es posible representar los procesos microbiológicos con modelos cinéticos que puedan describir el comportamiento de la producción de biomasa, metabolito o consumo de sustrato. Por lo anterior, los bioprocesos están siendo objeto de estudio y desarrollo, para optimizar los requerimientos energéticos, los tiempos de producción (pasando de largos periodos de horas o días a pocas horas), la utilización de recursos de tipo renovables y poder

¹ HERRYMAN MUNILLA, Maribel y BLANCO CARRACEDO, Gladys. Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. En: ICIDCA: sobre los derivados de la caña de azúcar. Enero, 2005, vol. 39, no. 1, p. 49-59.

² K. MADHAVAN, Nampoothiri y ROJAN, John. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview of process developments and future perspectives. En: JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY. Noviembre, 2007, vol. 20, no. 6, p. 2075.

³ SERNA-COCK, L. y RODRÍGUEZ-DE STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54-65.

⁴ ROJAS, Adriana M.; MONTAÑO, Liceth P. y BASTIDAS, Marlon J. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *streptococcus thermophilus*. En: REVISTA COLOMBIANA DE QUÍMICA. Marzo, 2016, vol. 44, no. 3, p. 5-10.

obtener el metabolito de interés a partir de diversos tipos de sustratos, tanto simples como complejos con costos de producción bajos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Ajustar un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una fermentación a partir de un sustrato complejo bajo condiciones establecidas.
- Determinar experimentalmente el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de un sustrato complejo.
- Determinar un modelo cinético que se ajuste al crecimiento microbiano.

1. MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se describirán conceptos concernientes al presente trabajo de grado, en los que se incluyen generalidades del ácido láctico, sus diferentes vías de producción, la fermentación microbiana para la obtención del mismo y por último, los modelos cinéticos que describen el crecimiento microbiano durante una fermentación; con lo anterior, se podrá tener una visión de la importancia del ácido láctico como materia prima a nivel industria.

1.1 ÁCIDO LÁCTICO

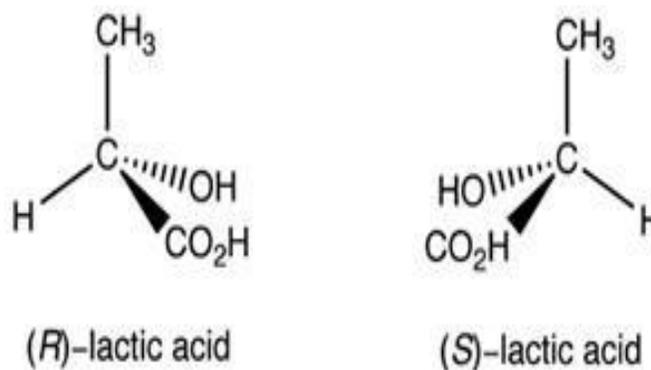
El ácido 2-hidroxi-propanoico o α -hidroxi-propanoico fue descubierto por el químico de origen sueco, Scheele en el año de 1780, cuando pudo aislarlo de la leche agria; pero fue hasta el año de 1847, Blondeaur fue el primero en reconocer que el ácido láctico se daba como producto de la fermentación y un hasta un siglo después de su descubrimiento, en 1881, Littlelon inició la fermentación a escala industrial⁵.

Por tener un carbono asimétrico, el ácido láctico tiene actividad óptica, dando lugar a los ácidos D (-) láctico y L (+) láctico, además de una mezcla equimolar de los dos, denominada racémica, siendo el segundo, el metabolizado en el cuerpo humano. En general es incoloro, inodoro, soluble en agua y se encuentra en estado líquido. En estado puro, se presentan sólidos muy higroscópicos de bajo punto de fusión, que no ha podido ser determinado debido a la dificultad de sintetizar el compuesto en ausencia de agua. Las formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas en polímeros con una gran variedad de propiedades según la composición de los precursores⁶.

⁵ SERNA-COCK, L. y RODRÍGUEZ-DE STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54-65.

⁶ ROJAS, Adriana M.; MONTAÑO, Liceth P. y BASTIDAS, Marlon J. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *streptococcus thermophilus*. En: REVISTA COLOMBIANA DE QUÍMICA. Marzo, 2016, vol. 44, no. 3, p. 5-10.

Figura 1. Estructura del ácido láctico.

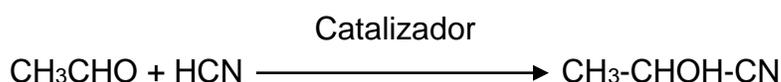


Fuente: VELÁZQUEZ DE LA CRUZ, Gonzalo, BUSTOS VÁZQUEZ, Guadalupe y RANGEL TORRES, Ernesto. Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios II. Plaza y Valdés, S.A. de C.V, 2008. 70p.

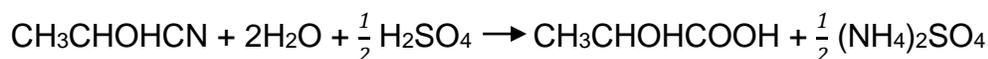
La mayor parte del ácido láctico producido se da a partir de los microorganismos, pero también existe la vía química a partir de compuestos orgánicos. Ambos métodos de producción requieren un posterior tratamiento de separación y purificación.

1.1.1 Obtención del ácido láctico

1.1.1.1 Obtención por vía química. En un medio básico, como catalizador, se obtiene lactonitrilo a partir de ácido cianhídrico y acetaldehído, según la siguiente reacción:



Posteriormente, se da la hidrólisis del lactonitrilo en medio ácido, donde se produce el ácido láctico y una sal de amonio a una temperatura de 100 °C y presión atmosférica, según la siguiente reacción⁷:

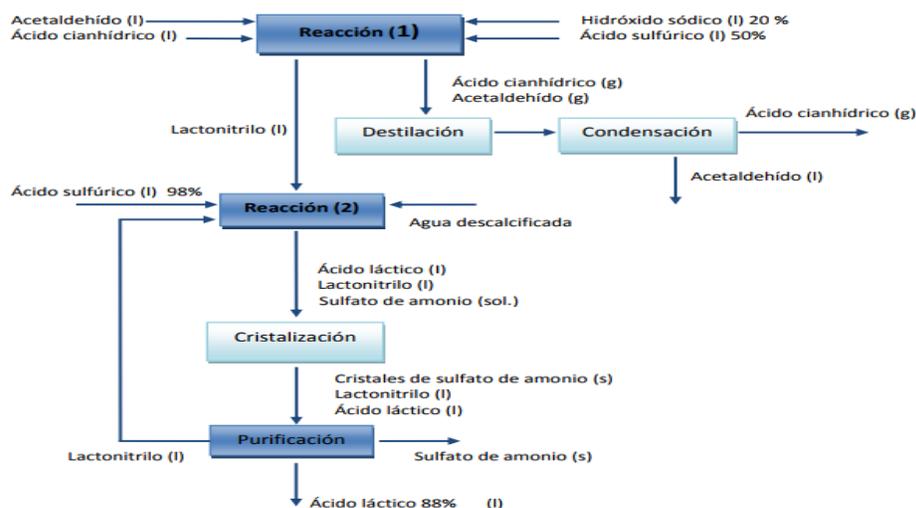


Este proceso obtiene rendimientos cercanos al 60%.

⁷ GARCÍA, María D., et al. Planta de producción de ácido láctico. Trabajo de grado Química industrial. Cerdanyola del Vallés: Universidad Autónoma de Barcelona, 2010. 193p.

Las reacciones anteriores, se encuentran implícitas en el siguiente diagrama de bloques que describe la producción de ácido láctico:

Figura 2. Producción de ácido láctico por vía química.



Fuente: GARCÍA, María D., et al. Planta de producción de ácido láctico. Trabajo de grado Química industrial. Cerdanyola del Vallés: Universidad Autónoma de Barcelona, 2010. 193p.

1.1.1.2 Obtención a partir de microorganismos. La producción biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos (simples y complejos) ricos en carbohidratos por bacterias y hongos.

Esta vía de producción tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) y L (+), activos ópticamente⁸. Dependiendo del microorganismo utilizado, las condiciones de aireación y pH, la temperatura y la fuente de carbono, entre otras variables de proceso, se obtendrán los distintos tipos de ácido láctico.

Existen principalmente dos géneros de bacterias utilizados en la producción de ácido láctico. Los primeros, corresponden al género *Lactobacillus*, que se caracterizan por ser Gram positivas, aflageladas, anaerobios, tener unos requerimientos nutricionales complejos y en general se presentan aisladas; se

⁸ HERRYMAN MUNILLA, Maribel y BLANCO CARRACEDO, Gladys. Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. En: ICIDCA: SOBRE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR. Enero, 2005, vol. 39, no. 1, p. 49-59.

requerimientos nutricionales de los microorganismos fermentadores, entre ellos se encuentran los sustratos definidos que se caracterizan por tener una composición química fija y conocida y los sustratos complejos que se caracterizan por su bajo valor comercial a costa de tener una composición de nutrientes desconocida.

- ✓ Sustratos definidos: Son sustratos de alto valor comercial, y entre ellos se destacan la glucosa, melaza y maltosa¹¹.
- ✓ Sustratos complejos: Son los más utilizados en las investigaciones más recientes para la producción de ácido láctico debido a sus buenos rendimientos y bajo costo. Entre estos se encuentran melazas, lactosuero, almidón de yuca, almidón de papa, jugo de cítricos, etc.¹².

Por otro lado, al utilizarse también la vía microbiológica como proceso industrial, debe entonces, como todo proceso de ingeniería, tener un básico de condiciones de operación para controlarse y de esta manera garantizar la eficiencia y rentabilidad del proceso a realizar.

Las condiciones de operación susceptibles a control son las siguientes:

- Tiempo: Debido a la gran disponibilidad de sustratos susceptibles de fermentación, los tiempos del proceso varían también sustancialmente. Estos pueden encontrarse en rangos que van desde los 4 días hasta las 3 semanas de tiempo de fermentación. Además, ha sido posible obtener mayores rendimientos y concentraciones de ácido láctico en procesos continuos, frente a los procesos en discontinuo¹³.
- pH: Esta variable es de suma importancia a la hora de realizar un proceso de fermentación, debido a que el producto del mismo son ácidos y debe tenerse en

¹¹ OROZCO MURILLO, M. P., & SOLARTE, J. A. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Trabajo de grado Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, 2003. 115p.

¹² SERNA-COCK, L. y RODRÍGUEZ-DE STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: Ciencia y Tecnología Alimentaria. Octubre, 2009. vol. 5, no. 1, p. 54-65.

¹³ SERNA-COCK, L. y RODRÍGUEZ-DE STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: Ciencia y Tecnología Alimentaria. Octubre, 2009. vol. 5, no. 1, p. 54-65.

cuenta la tolerancia de los microorganismos a los diferentes ambientes. Generalmente, el rango en el cual pueden crecer se encuentra entre 4.5 y 6.5¹⁴.

- **Temperatura:** Los microorganismos que realizan fermentación láctica son considerados mesófilos, es decir, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 15 y los 35°C. En particular, se ha encontrado que los *Lactobacillus* crecen óptimamente a temperaturas entre los 30 y 42°C, encontrándose la temperatura más óptima con ciertos sustratos los 37°C¹⁵. Es primordial que durante el proceso de fermentación se tenga un control minucioso de la temperatura, ya que cualquier variación brusca podría terminar en la muerte de los microorganismos fermentadores¹⁶.

1.1.2 Aplicación industrial. El ácido láctico es ampliamente usado en la industria a nivel mundial. En la industria alimentaria, es utilizado ampliamente en los alimentos procesados, como acidulante, neutralizador de pH, conservante e inhibidor de bacterias.

Los ésteres de ácido láctico son utilizados como emulsificantes y disolventes “limpios”. En la industria farmacéutica, es utilizado en la fabricación de productos contra el acné y humectantes, también se utiliza en la industria cosmética en la fabricación de lociones.

1.1.3 Métodos de Separación. En general, la separación y purificación del ácido láctico obtenido por vía microbiológica o fermentativa se torna complicada debido a la afinidad que tiene con el agua, además de presentar baja volatilidad. En los procesos industriales de la actualidad, el ácido láctico es recuperado en forma de lactato de calcio y según el grado de pureza que se requiera del mismo, existen diferentes procesos de separación y purificación.

¹⁴ CASTRILLÓN, Olivia, BEDOYA, Oswaldo y MONTROYA, Diana. Efecto del pH sobre el crecimiento de microorganismos durante la etapa de maduración en pilas estáticas de compost. En: Producción + Limpia. Diciembre, 2006, vol. 2, no. 1, p. 87-98.

¹⁵ WANG, Y.; CORRIEU, G. y BÉAL, C. Fermentation pH and Temperature Influence the Cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. En: Journal of Dairy Science. Enero, 2005, vol. 88, no. 1, p. 21-29.

¹⁶ HARLEY, John P., PRESCOTT, Lansing M. y KLEIN, Donald A. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana, 2004.

1.1.3.1 Clarificación de medios de fermentación por microfiltración con flujo cruzado. Este método consiste en hacer una clarificación del caldo obtenido por medio de una microfiltración en flujo cruzado, método que se está convirtiendo en el más utilizado industrialmente debido a la reducción en los residuos del proceso¹⁷. Dicha microfiltración, consiste en la separación de algún(os) compuesto(s) de interés a partir de membranas cuyo diámetro de corte oscila entre los 0.1 y 10 micrómetros¹⁸.

1.1.3.2 Extracción Reactiva. Este tipo de extracción está siendo utilizada en la recuperación de distintos ácidos carboxílicos producidos por vía microbiológica ya que no afecta la estabilidad térmica de los bioproductos y el requerimiento de energía es, comparativamente con otros métodos de purificación, bajo.

Este proceso de separación no convencional, hace que al irse formando los bioproductos deseados, reaccionen con un agente determinado (solvente) y sean extraídos. Este tipo de método, a pesar de no estar investigado a fondo conceptual ni experimentalmente en la actualidad, ofrece ventajas frente a otro tipo de procesos, entre las que se encuentran: el requerimiento de equipos pequeños, aumento en la conversión de las reacciones y disminución en los procesos de inhibición¹⁹.

¹⁷ CARRÈRE, Hélène y BLASZKOW, Frédéric. Comparison of operating modes for clarifying lactic acid fermentation broths by batch cross-flow microfiltration. En: Process Biochemistry. Marzo, 2001, vol. 36, no. 8, p. 751-756.

¹⁸ BECERRA OSPINA, Nubia Liliana. Clarificación de vinazas de caña de azúcar por tratamiento fisicoquímico y filtración con membranas. Tesis de Magíster en Ingeniería Química. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, 2014. 134p.

¹⁹ GUTIÉRREZ MOSQUERA, L. F. (2008). Estudio y diseño de procesos reacción extracción simultáneos. Trabajo de investigación Doctorado en Ingeniería. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. 2008. 92p.

1.1.3.3 Electrodiálisis. La electrodiálisis es un método que se ha desarrollado para la separación de sales provenientes de ácidos productos de fermentación. Bajo la influencia de una fuente de poder (potencial eléctrico) los iones se transportan a través de membranas de intercambio iónico de una solución inicial hasta otra (producto de la separación)²⁰. Esta técnica es llamativa ya que puede separarse el ácido láctico a medida que se va produciendo en el fermentador, lo cual evita la utilización de agentes de extracción o neutralizantes en el proceso²¹.

1.1.4 Mercado del Ácido Láctico. El ácido láctico, es una materia prima importante en las industrias de alimentos principalmente, así como también en la industria farmacéutica, textil y cosmética. Actualmente, su demanda está aumentando entre un 12 y 15% anual²² debido a su uso como materia prima en la producción de ácido poliláctico (PLA), un polímero biodegradable de amplia aplicación industrial²³.

La producción fermentativa del ácido láctico representa como principal ventaja frente a la producción por vía química, la obtención de isómeros (L o D) ópticamente puros según la aplicación a la que sea destinado. Es por ello que se está avanzando en la investigación para la producción de ácido láctico a partir de sustratos de bajo costo, en un proceso donde el costo de las materias primas representa el 68% del costo total²⁴; ya que los sustratos empleados actualmente para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas son de alto costo según el rendimiento que se quiera obtener²⁵.

1.2 FERMENTACIÓN

Las fermentaciones son procesos metabólicos llevados a cabo por microorganismos como bacterias, levaduras, etc., que permiten obtener productos simples como

²⁰ ÁVILA, Rita M., CÁRDENAS, Antonio y MEDINA, Ana. Tratamiento del lactosuero utilizando la técnica de electrodiálisis. En: INTERCIENCIA. Marzo-abril, 2000, vol. 25, no. 2, p.80-84.

²¹ SERNA-COCK, L. y RODRÍGUEZ-DE STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: Ciencia y Tecnología Alimentaria. Octubre, 2009. vol. 5, no. 1, p. 54-65.

²² ARIAS ZABALA, Mario; HENAO NAVARRETE, Lina y CASTRILLÓN GUTIÉRREZ, Yulieth. Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con *Lactobacillus bulgaricus nrrl-b548*. En: DYNA. Junio 2009, vol. 76, no. 158, p. 147-153.

²³ DING, Shaofeng y TAN, Tianwei. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. En: Process Biochemistry. Junio, 2006, vol. 41, no. 6, p. 1451-1454.

²⁴ OH, Hurok, et al. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. Septiembre, 1996, vol. 96, no. 13, p. 1492-1498.

²⁵ BUSTOS, G., et al. Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. En: Food Microbiology. Abril, 2004, vol. 21, no. 2, p. 143-148.

ácidos orgánicos (etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido propiónico) a partir de compuestos químicos orgánicos, como los azúcares.

Estos, son unos procesos anabólicos, es decir, tiene requerimiento energético, contrario a los procesos catabólicos. Son llevadas a cabo principalmente por bacterias y levaduras que utilizan carbohidratos como sustratos, fermentando principalmente azúcares como la fructosa, maltosa, glucosa y sacarosa²⁶.

Particularmente, el tipo de fermentación láctica es llevado a cabo por bacterias en su mayoría de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*, además de los músculos esqueléticos humanos, donde por acción de la enzima lactato-deshidrogenasa en la glicólisis es obtenido el ácido láctico²⁷.

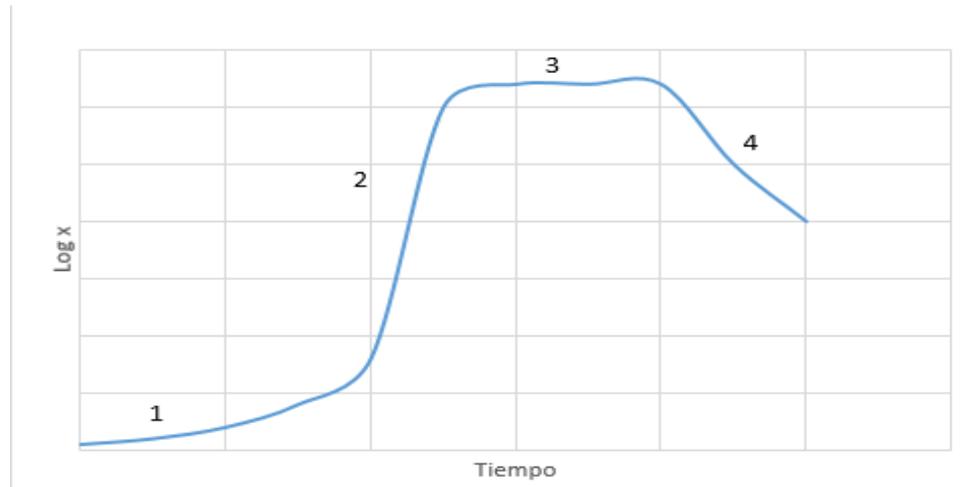
1.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

En un cultivo por lotes, como generalmente son realizadas las investigaciones en producción de diferentes metabolitos de interés, es inoculado un microorganismo en un medio de cultivo determinado y el crecimiento de la biomasa es constantemente medido. A partir de esta medida, es posible notar distintas fases en el crecimiento de los microorganismos:

²⁶ PUERTA QUINTERO, Gloria Inés. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. En: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Diciembre, 2010, vol. 1, no. 42, p. 1-12.

²⁷ GIL-HORÁN, Ricardo H., DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, María y PACHO-CARRILLO, Juan Daniel. Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. En: Tecnología, Ciencia, Educación. Julio, 2008, vol. 23, no. 2, p.79-90.

Figura 4. Crecimiento microbiano a través del tiempo.



- Fase de latencia (1): Durante esta fase, los microorganismos se adaptan al medio en el que se encuentran, empezando a metabolizar la fuente de carbono disponible para empezar el proceso de división celular. Cuando los microorganismos son sembrados en un medio con diversas fuentes de carbono, es posible que en la fase de latencia se identifique un proceso conocido como crecimiento diaúxico, es decir, el microorganismo agotará primero la fuente de carbono que pueda metabolizar más fácilmente, para después empezar a metabolizar las demás.
- Fase de crecimiento (2): Se conoce también como fase exponencial; durante este período ocurre la división celular mediante una progresión geométrica $2^0, 2^1, 2^2 \dots 2^{m28}$. Durante este período se espera observar un crecimiento constante en la población celular en caso de no contar con procesos de inhibición.
- Fase estacionaria (3): Cuando se termina el período de crecimiento, inicia la fase estacionaria, donde las fuentes de carbono para la población se han agotado y las células continúan con vida hasta alcanzar la madurez, sin posibilidad de división celular.

²⁸ OROZCO MURILLO, M. P., & SOLARTE, J. A. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Trabajo de grado Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, 2003. 115p.

- Fase de muerte (4): Durante esta fase, las células no pueden liberar sustancias que permitan alimentar y mantener a la población, por lo tanto el número de células decrece y se presenta la lisis celular.

Durante una fermentación se dan tres principales fenómenos: consumo de sustrato, producción de metabolito y formación de biomasa. En esta última está centrada el presente trabajo, el cual es representado mediante modelos matemáticos que permiten describir y reproducir su comportamiento.

1.4 MODELOS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Como definición, los modelos matemáticos son hipótesis existentes entre las relaciones matemáticas de las variables medibles y no medibles en sistema, procesos o experimentación.

Los modelos matemáticos para el estudio de los procesos de fermentación tienen, entre sus principales aplicaciones o utilidades el poder correlacionar datos experimentales y así tener una visión más acertada acerca del proceso en cuestión, hacer una predicción cuantitativa del proceso, reducir costos en diseño experimental y de proceso, considerar o no variables que puedan o no afectar el desarrollo experimental y utilizar el modelamiento matemático para escalar procesos realizados a nivel de banco o laboratorio²⁹, entre otras.

En general, un modelo matemático de crecimiento está compuesto por 3 partes: la primera corresponde a los principios químicos, físicos y biológicos involucrados en el proceso en cuestión, la segunda son las inferencias que se puedan hacer a partir de los datos existentes previamente y la tercera corresponde a las suposiciones que se deban hacer, con bases y criterios válidos. En las fermentaciones, es una constante que los modelos matemáticos tengan uno o parámetros que los describan y que su valor numérico sea desconocido antes de aplicarlo y no sea medible.

Respecto a la última parte, las suposiciones que se realizan son necesarias debido a la complejidad de los procesos microbiológicos, estas suposiciones aunque introducen inexactitud a los modelos respecto a ciertas variables, no inciden considerablemente, por ejemplo, en la descripción de las etapas de crecimiento microbiano u otras variables importantes en los procesos microbiológicos. Las

²⁹ DUARTE TORRES, Alberto. Introducción a la ingeniería bioquímica. 1995. 355 p.

suposiciones básicas que se hacen a la hora del desarrollo de un modelo matemático son la no consideración de la distribución de estados, es decir, no considerando las diferentes formas, edades y tamaños de las células y asumiendo todo el conjunto como homogéneo; otra suposición es la segregación, donde toda la población microbiana se asume como discreta; además, la suposición con la cual se asume que el crecimiento microbiano sigue un modelo determinístico, aun cuando se ha demostrado que a través de las generaciones de células, la tasa de crecimiento microbiano varía gradualmente; por último, se hace la suposición que la estructura celular interna es la misma para todo el conjunto celular, despreciando las diferencias tanto en composición como en distribución a lo largo del espacio y tiempo de la fermentación.

Según lo anterior, pueden describirse dos tipos principales de modelos matemáticos de crecimiento de una población de microorganismos:

- Estructurados: Estos consideran los aspectos básicos de la célula y su especie química en cuestión, despreciando o agrupando los demás componentes en grupos generalizados que pueden llamarse lípidos, proteínas, etc.
- No estructurados: Para la mayoría de casos de fermentaciones, este tipo de modelos puede describir adecuadamente el desarrollo del proceso, considerando que los microorganismos y/o células poseen una composición fija y simple. Este tipo de modelos desprecia los cambios en el medio de cultivo producto de la concentración de biomasa³⁰.

Además, los dos tipos anteriores de modelos, pueden clasificarse también en modelos de tipo segregados y no segregados. Los primeros hacen referencia a una población de microorganismos heterogénea, donde se distinguen en la población diferentes entidades con edades, formas, tamaños y composiciones internas variables; mientras que los no segregados, consideran que el comportamiento celular se aproxima al de una sola célula promedio que permita agrupar el desempeño de ciertas variables durante la fermentación³¹.

³⁰ ESENER, A. A., ROELS, J. A. y KOSSEN, N. W. Theory and applications of unstructured growth models: Kinetic and energetic aspects. En: Biotechnology and Bioengineering. Diciembre, 1983, vol. 25, no. 12, p. 2803-2841.

³¹ FREDRICKSON, A. G., MEGEE, R. D. y TSUCHIYA, H. M. Mathematical Models for Fermentation Processes En: Anonymous Advances in Applied Microbiology. 1970, vol. 13, p. 419-465.

Actualmente, la microbiología predictiva es un campo de estudio de gran interés. Por medio de esta, es posible describir, predecir, evaluar, optimizar y desarrollar procesos biológicos sin la necesidad de pasar por el ámbito experimental³². Para ello, son necesarias correlaciones y parámetros que puedan asociarse a los procesos; es donde los modelos cinéticos de crecimiento juegan un papel fundamental en las investigaciones.

Entre los modelos cinéticos de crecimiento microbiano, se encuentran los siguientes:

1.4.1 Ecuación Logística. Esta ecuación, describe el comportamiento de la biomasa en distintos procesos de fermentación, se representa mediante la **Ecuación 1**.

Ecuación 1. Ecuación logística para crecimiento microbiano

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

Donde X_m hace referencia a la concentración máxima de biomasa en el proceso fermentativo, μ es la tasa de crecimiento específica (h^{-1}) y X la concentración de biomasa (UFC/mL)³³.

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

Ecuación 2. Crecimiento de biomasa en función del tiempo.

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

³² MCMEKIN, Tom, et al. Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates? En: Food Control. Febrero 2013, vol. 29, no. 2, p. 290.

³³ CORDÓN PÁEZ, Santiago y PÉREZ MARTÍNEZ, Jorge Alejandro. Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá: Universidad de América. Facultad de Ingeniería, 2016. 132p.

1.4.2 Modelo de Monod. Modelo desarrollado en 1942, que describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento sin ningún tipo de proceso de inhibición durante la fermentación³⁴. Este modelo toma solamente en consideración las fases positivas de crecimiento y se asume la población microbiana como homogénea³⁵. Este modelo se puede describir mediante la **Ecuación 3 y 4**³⁶.

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

$$\frac{dX}{dt} = X\mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S}$$

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

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

Este modelo en general, se caracteriza por alcanzar un grado de ajuste cercano a los datos experimentales, aun siendo un modelo sencillo.

Mediante tratamiento matemático integral, de las **Ecuaciones 3 y 4**, puede obtenerse una **Ecuación 5** que permite relacionar la producción de biomasa y crecimiento de sustrato simultáneamente.

Ecuación 5. Ecuación integrada del modelo de Monod

$$\mu_{m\acute{a}x} t = \frac{Y_{X/S}S_0 + Y_{X/S}K_s + X_0}{Y_{X/S}S_0 + X_0} \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) + \frac{Y_{X/S}K_s}{Y_{X/S}S_0 + X_0} \ln\left(\frac{Y_{X/S}S_0}{Y_{X/S}S_0 + X_0 - X}\right)$$

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$, $Y_{X/S}$, S_0 , K_s , X y t corresponden a la tasa de crecimiento específica máxima (h^{-1}), rendimiento del sustrato (UFC/g Sustrato), sustrato inicial (g/mL), constante de saturación (g/mL), biomasa (UFC/mL) y tiempo (h).

³⁴ DUARTE TORRES, Alberto. Introducción a la ingeniería bioquímica. 1995. 355 p.

³⁵ MONOD, Jacques. The Growth of Bacterial Cultures. En: Annual Review of Microbiology. Octubre, 1949, vol. 3, p. 371-394.

³⁶ DUARTE TORRES, Alberto. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. En: Ingeniería e Investigación. Enero, 2011, no. 33, p.123-138.

1.4.3 Modelo de Moser. Este modelo nació como una modificación al modelo de Monod también en 1958, y se considera como una buena aproximación cuando la composición celular es independiente del tiempo de proceso³⁷. Se caracteriza porque en su formulación, está implícita la consideración del efecto de la propagación de especies mutantes en la población bacteriana³⁸. Este modelo se representa mediante la **Ecuación 6**.

Ecuación 6. Ecuación de Moser.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S^n}{K_s + S^n}$$

Cuyo acople a un balance de masa y de sustrato para obtener todas las variables en función de la biomasa, se deduce la **Ecuación 7**.

Ecuación 7. Modelo de Moser para crecimiento microbiano

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{\left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}\right)^n}{K_m + \left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}\right)^n} X$$

Este modelo considera las mismas variables que el modelo de Monod y su única variación es la introducción del parámetro n , cuyo valor es empírico para cada proceso fermentativo.

³⁷ TREJOS, Víctor Manuel, FONTALVO ALZATE, Javier y GÓMEZ GARCÍA, Miguel Ángel. Descripción Matemática y Análisis de Estabilidad de Procesos Fermentativos. En: DYNA. Enero, 2009, vol. 76, no. 158, p. 111-121.

³⁸ MOSER, Hermann. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. Washington. Carnegie Institution of Washington, 1958. p.82-100

1.4.4 Modelo de Teissier. Modelo propuesto en 1936, previo al modelo de Monod y fundamentado en un punto de partida diferente al mismo, explicando el efecto de las hormonas en el crecimiento de ciertos cultivos³⁹. Este introdujo el concepto de deficiencia de crecimiento, hipótesis que resultó mostrando la relación semilogarítmica entre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa⁴⁰. Este modelo se describe mediante la **Ecuación 8**.

Ecuación 8. Modelo de Teissier.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{\left(\frac{-S}{K_s} \right)} \right)$$

De igual manera, el modelo de Teissier acoplado a un balance de materia y sustrato, da paso a la ecuación diferencial que describe la **Ecuación 9**.

Ecuación 9. Modelo de Teissier para crecimiento microbiano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{\left(\frac{-S_0 - \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}}{K_m} \right)} \right) X$$

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$, S y K_m representan tasa de crecimiento específico (h^{-1}), concentración de sustrato (g/mL) y constante de saturación (g/mL), respectivamente.

³⁹ TEISSIER, G. Quantitive laws of growth. En: Annales de Physiologie et de Phisicochimie Biologique. Febrero, 1936, vol. 12, p. 527-586.

⁴⁰ ATKINSON, B. Biochemical reactors. Londres. Pion Limited, 1974. 267p.

1.4.5 Modelo de Haldane. Este modelo desarrollado en 1930, y utilizado ampliamente en sistemas en discontinuo, estudia entre otras cosas, las capacidades de adaptación de microorganismos al medio⁴¹. Además de esto, es matemáticamente simple para su desarrollo y es una buena representación de la presencia de sustratos inhibitorios en el medio⁴². El modelo de Haldane, se representa por medio de la **Ecuación 10**.

Ecuación 10. Modelo de Haldane.

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{k_m + S + k_I S^2}$$

Despejando S, en un balance de sustrato para acoplarlo a un balance de masa, da paso a la **Ecuación 11**.

Ecuación 11. Modelo de Haldane para crecimiento microbiano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} \frac{S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}}{K_s + S_0 + K_I \left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}} \right)^2} X$$

Cuya expresión integrada, es una función independiente de la biomasa descrita mediante la **Ecuación 12**.

Ecuación 12. Expresión integrada del modelo de Haldane.

$$t = \frac{(S_0^2 K_I + S_0 + K_s) Y_{XS}^2 + ((2S_0 K_I + 1) X_0 Y_{XS} + K_I X_0^2) \ln \left(\frac{X}{X_0} \right)}{\frac{S_0 Y_{XS}^2 + X_0 Y_{XS}}{\mu_{\text{máx}}}} + \frac{K_s Y_{XS} \ln(X - S_0 Y_{XS} - X_0)}{\frac{S_0 Y_{XS} + X_0}{\mu_{\text{máx}}}} - \frac{K_I X}{\frac{Y_{XS}}{\mu_{\text{máx}}}}$$

⁴¹ HALDANE, J. B. S. A mathematical theory of natural and artificial selection. (Part VI, Isolation.). En: Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. Abril 1930, vol. 26, no. 2, p. 220-230.

⁴² KUMAR, Shashi; KUMAR, Surendra y KUMAR, Arinjay. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using Pseudomonas putida MTCC 1194. En: Biochemical Engineering Journal. Enero, 2005, vol. 22, no. 2, p. 151-159.

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$, S , K_s , K_i corresponden a tasa de crecimiento específico (h^{-1}), concentración de sustrato (g/mL), constante de saturación (g/mL) y constante de inhibición por sustrato (g/mL).

1.4.6 Modelo de Contois. Modelo desarrollado en 1959, y que ha sido ampliamente utilizado en la literatura para describir procesos de tipo anaeróbicos, para los casos principalmente donde la etapa de hidrólisis controla en mayor medida la velocidad del proceso fermentativo⁴³. Además, este considera que la tasa de crecimiento específica depende de la densidad de población en el medio⁴⁴. Este modelo puede describirse mediante la Ecuación 13.

Ecuación 13. Modelo de Contois.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s X + S}$$

Que al igual que los modelos descritos anteriormente, acoplado a un balance de biomasa y sustrato toma la forma de la **Ecuación 14**.

Ecuación 14. Modelo de Contois para crecimiento microbiano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}}{K_s X + S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}} X$$

Cuya expresión integrada es también una función independiente de la concentración de biomasa en el medio, descrito mediante la **Ecuación 15**.

Ecuación 15. Expresión integrada del modelo de Contois.

$$t = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) - K_s Y_{XS} \ln(X - S_0 Y_{XS} - X_0)}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

⁴³ RED ESPAÑOLA DE COMPOSTAJE. Ingeniería y aspectos técnicos de la digestión anaeróbica II.4. Madrid: Mundi-Prensa, 2016.

⁴⁴ CONTOIS, D. E. Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. En: Journal of General Microbiology. Agosto, 1959, vol. 21, no. 1, p. 40-50.

Donde $\mu_{m\acute{a}x}$, S , K_s , corresponden respectivamente a la tasa de crecimiento espec\u00edfico (h^{-1}), concentraci\u00f3n de sustrato (g/mL), constante de saturaci\u00f3n (g/mL).

1.4.7 Modelo de Amrane y Prigent. Estos autores, en 1994, plantearon un modelo cin\u00e9tico no estructurado para describir la producci\u00f3n de \u00e1cido l\u00e1ctico a partir de lactosa. Este modelo se caracteriza por su simplicidad y f\u00e1cil convergencia de los datos experimentales con los par\u00e1metros calculados cuando los valores iniciales de iteraci\u00f3n son los acertados⁴⁵. Este modelo se representa por medio de la **Ecuaci\u00f3n 16**.

Ecuaci\u00f3n 16. Ecuaci\u00f3n de Amrane y Prigent.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{1}{1 + \frac{c e^{dt}}{\mu_{m\acute{a}x} - c}} \right)$$

Esta expresi\u00f3n, basta con acoplarla con un balance de materia, ya que este modelo es independiente de la concentraci\u00f3n de sustrato en el medio de cultivo. La expresi\u00f3n resultante se describe mediante la **Ecuaci\u00f3n 17**.

Ecuaci\u00f3n 17. Modelo de Amrane y Prigent para crecimiento microbiano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{1}{1 + \frac{c e^{dt}}{\mu_{m\acute{a}x} - c}} X$$

Luego de realizar un m\u00e9todo integral de an\u00e1lisis, se obtiene una ecuaci\u00f3n integrada del modelo de Amrane y Prigent que se representa mediante la **Ecuaci\u00f3n 18**.

Ecuaci\u00f3n 18. Expresi\u00f3n integrada de la ecuaci\u00f3n de Amrane y Prigent.

$$X = X_0 \exp \left\{ \mu_{m\acute{a}x} \left[t - \frac{1}{d} \ln \left(1 + \frac{c}{\mu_{m\acute{a}x}} (e^{dt} - 1) \right) \right] \right\}$$

Donde X , $\mu_{m\acute{a}x}$, t , d y c representan biomasa (UFC/mL), tasa de crecimiento espec\u00edfica (h^{-1}), tiempo (h) y constantes propias del modelo cin\u00e9tico y el proceso fermentativo.

⁴⁵ AMRANE, Abdeltif y PRIGENT, Yves. Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: Model development and simulation. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Julio, 1994, vol. 60, no. 3, p. 241-246.

1.4.8 Modelo de Gompertz. El modelo de Gompertz fue desarrollado inicialmente para describir los procesos de mortalidad en poblaciones humanas⁴⁶. Posteriormente, se desarrolló como un modelo cinético de tipo primarios, es decir, capaz de describir la concentración de biomasa a lo largo del tiempo⁴⁷. Este modelo es descrito mediante la **Ecuación 19**.

Ecuación 19. Modelo de Gompertz para crecimiento microbiano.

$$X = X_0 + C e^{-e^{-B(t-M)}}$$

Donde C, M y B corresponden a recuentos microbianos cuando el tiempo crece indefinidamente (UFC/mL), tiempo para alcanzar la tasa de crecimiento específica máxima (h) y la velocidad de crecimiento relativo (UFCmL⁻¹h⁻¹).

VARIABLES que a su vez, representan expresiones matemáticas que permiten encontrar parámetros cinéticos de interés, como se muestra en las Ecuaciones **20**, **21** y **22**.

Ecuación 20. Expresión matemática para obtener tasa de crecimiento específica.

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{BC}{e}$$

Ecuación 21. Expresión matemática para obtener la duración de la fase de latencia.

$$LDP = \frac{M - 1}{B}$$

Ecuación 22. Expresión matemática para obtener la máxima densidad de población microbiana.

$$MDP = A + C$$

⁴⁶ CEDRÓN CASTRO, Javier. El modelo de Gompertz y su aplicación en seguridad alimentaria. Trabajo de grado Nutrición Humana y Dietética. Valladolid: Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina, 2016. 43p.

⁴⁷ FAKRUDDIN, Md., MOHAMMAD MAZUMDER, RAEZ y SHANEWAJ BIN MANNAN, Khanjada. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. En: Ceylon Journal of Science. Noviembre, 2011, vol. 40, no. 2, p. 121-131.

1.4.9 Modelo de Powell. La principal característica de este modelo cinético, es que acopla la transferencia de masa de sustrato a través de la célula a la ecuación de Monod⁴⁸ pues contiene la difusividad del sustrato y la permeabilidad del mismo en la membrana. Este modelo está descrito mediante la **Ecuación 23**.

Ecuación 23. Ecuación de Powell.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{(K_m + L) + S}$$

Que acoplada a un balance de materia y sustrato, da paso a la ecuación diferencial descrita en la **Ecuación 24**.

Ecuación 24. Modelo de Powell para crecimiento microbiano.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}}{(K_S + L) + S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}} X$$

Cuya forma integrada en función de la biomasa, se representa mediante la **Ecuación 25**.

Ecuación 25. Expresión integrada del modelo de Powell.

$$t = \frac{\left(\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) (X_0 + Y_{XS}(K_S + L + S_0)) - Y_{XS}(K_S + L) \ln(-X_0 - S_0 Y_{XS} + X) \right)}{\frac{X_0 + S_0 Y_{XS}}{\mu_{m\acute{a}x}}}$$

Donde X, t, $\mu_{m\acute{a}x}$, S, K_s y L representan biomasa (UFC/mL), tiempo (h), tasas de crecimiento específica máxima (h^{-1}), concentración de sustrato (g/mL), constante de saturación (g/mL) y constante de difusión.

⁴⁸ POWELL, E.O. Microbial physiology and continuous culture. Londres: Her Majesty's Stationery, 1967.

1.5 VALIDACIÓN DE MODELOS CINÉTICOS

La validación de los modelos es uno de los pasos necesarios para realizar una comparación entre los mismos, siendo de gran importancia en este tipo de investigaciones⁴⁹.

Para ello, se utilizaron los parámetros obtenidos con cada uno de los modelos estudiados, para simular el crecimiento microbiano a través del tiempo y comparar dicho comportamiento con los puntos experimentales obtenidos⁵⁰.

Estos datos obtenidos, se evalúan a partir del coeficiente de correlación obtenido (R²) y el porcentaje de error de mínimos cuadrados (MSE), calculándose este último a partir de la siguiente ecuación:

Ecuación 26. Porcentaje de error de mínimos cuadrados.

$$MSE (\%) = \left(\frac{\sum (y_i - f_i)^2}{n_t} \right)$$

Donde y_i , f_i y n_t corresponden a los datos experimentales obtenidos, datos calculados con el modelo y número total de datos, respectivamente.

⁴⁹ SARGENT, Robert G. y KLEIJNEN, Jack P. C. A methodology for fitting and validating metamodels in simulation. En: European Journal of Operational Research. Enero, 2000, vol. 120, no. 1, p. 14-29.

⁵⁰ DON, Mashitah Mat y SHOPARWE, Noor Fazliani. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. En: Biochemical Engineering Journal. Marzo, 2010, vol. 49, no. 1, p. 95-103.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo, se describe el proceso experimental que se realizó para llevar a cabo la fermentación de piña madurada, utilizando el microorganismo *Lactobacillus acidophilus*. Además, se describirán los procedimientos llevados a cabo para obtener los resultados de la cuantificación de los microorganismos durante la fermentación. Materiales y equipos utilizados en la investigación, se encuentran en los anexos.

2.1 CEPA BACTERIANA

Para la fermentación, se utiliza un inóculo comercial de concentración 1×10^8 células/mL, de la cepa bacteriana *Lactobacillus acidophilus*, Lyofast LA3, de marca Sacco. Es obtenido en tiendas agroindustriales de la ciudad Bogotá.

Es utilizada esta cepa debido a que se sabe con seguridad que fermenta los azúcares presentes en la piña.

2.2 PIÑA (*ANANAS COMOSUS MER*)

Se utiliza piña, de la variedad perolera debido a que es la más cultivada en el territorio colombiano⁵¹. Es obtenida en un almacén de cadena de la ciudad de Bogotá, para entrar en un periodo de maduración de entre 15-16 días.

El período de maduración de la piña es determinado con base a la NTC 4102, donde se decide trabajar con el grado de maduración correspondiente al color 6, cuando el color de la fruta es anaranjado intenso y como procedimiento anexo, se realiza la medición de grados Brix, el cual corresponde a valores que oscilan entre 12.2 y 11.3. Es en este grado de maduración, donde la cantidad de azúcares disponibles para la fermentación es mayor.

⁵¹ NEIRA GARCÍA, Ana María; MARTÍNEZ REINA, Antonio María y ORDUZ RODRÍGUEZ, Javier Orlando. Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. En: Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Julio, 2016, vol. 17, no. 2, p. 149.

2.3 REACTIVOS

Los reactivos presentes en la **Tabla 1**, son los que se emplean en la realización de la investigación.

Tabla 1. Reactivos.

Reactivo	Uso
Solución salina al 0.85% p/v	Es utilizado como solvente, al momento de realizar las diluciones para la siembra de los microorganismos.
Etanol 70% v/v	Es utilizado como bactericida

2.4 TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN

Durante la experimentación del proyecto, se utilizó la técnica de recuento en placa para el conteo de los microorganismos en las diferentes siembras, y con esto, poder elaborar la curva de crecimiento microbiano para su posterior análisis y modelado matemático.

- **Recuento en Placa:** Esta técnica de cuantificación se caracteriza por ser, además de la más usada en procesos microbiológicos, la más exacta y confiable frente a otros métodos de cuantificación de microorganismos.

Se basa en la capacidad de las “células viables”, las cuáles son las que pueden generar una descendencia, dando lugar a una colonia de bacterias⁵². Dichas colonias son las que se cuentan en las distintas siembras diluidas, hasta encontrar la que tenga entre 30 y 300 UFC.

Para obtener el número real de UFC en la siembra que se esté analizando, se utiliza la **Ecuación 27**, donde además debe entonces considerarse la dilución a la que se encuentra; siendo estas progresivas de 1/10, 1/100, 1/100, etc.

⁵² ALONSO NORE, Lina Ximena y POVEDA SÁNCHEZ, Jeimy Alexandra. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm™ 3MTM para el análisis de alimentos. Tesis de grado Microbiología Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2008. 213p.

Ecuación 27. Ecuación para la determinación de unidades formadoras de colonia por unidad de volumen.

$$\frac{UFC}{mL} = (\text{Número de colonias entre 30 y 300}) * (\text{inverso de la dilución}) * 10$$

2.5 FERMENTACIÓN MICROBIANA

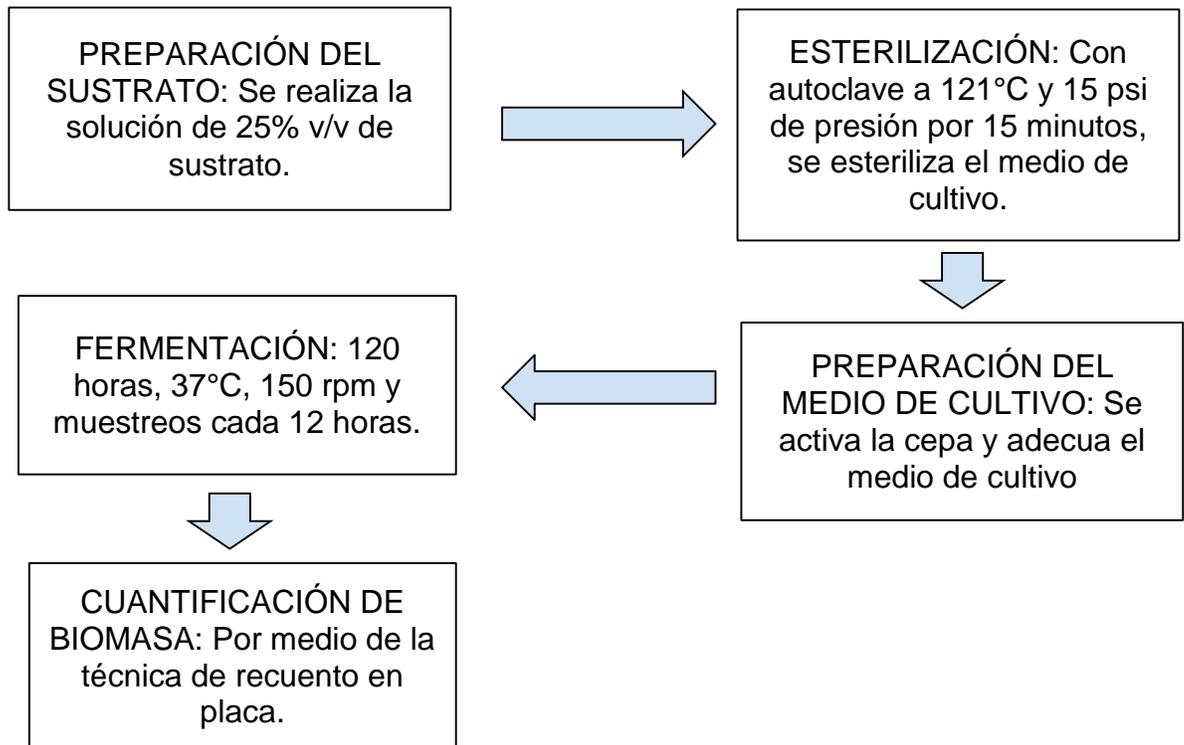
La fermentación se llevó a cabo en un frasco Schott con un volumen de 1L, utilizando un inóculo comercial de *Lactobacillus acidophilus*.

Se utilizó una relación de 25% v/v, con el fin de asegurar la homogeneización de la mezcla, condición que facilita el metabolismo y reproducción microbianos.

Para asegurar que se den los fenómenos de transferencia de calor y masa, se utilizó una incubadora tipo Shaker, con control de temperatura y agitación, impidiendo así que se presenten condiciones que favorezcan la inhibición y por el contrario se favorezcan las condiciones para la reproducción y crecimiento de los microorganismos.

En el siguiente diagrama, se muestra el procedimiento para realizar la fermentación microbiana:

Figura 5. Metodología de la fermentación.



2.5.1 Activación de la Cepa. El microorganismo *Lactobacillus acidophilus*, cuya cepa se adquirió mediante un inóculo de tipo comercial, se encuentra en concentración de 1×10^{11} UFC. La mitad del contenido del sobre es agregado al medio de cultivo previamente esterilizado, cerca de un mechero, con guantes y tapabocas esterilizados para evitar la contaminación del inóculo, según María Orozco *et al*⁵³.

2.5.2 Preparación del medio. Después de la maduración requerida de la piña, se tienen entonces una cantidad de azúcares considerable que pueden ser metabolizados por los microorganismos utilizados. Se prepara una solución de 1 L, donde el 25% v/v de sustrato; proporción que facilita la transferencia de calor y la fermentación al obtenerse una mezcla homogénea, según el trabajo realizado por Laura Guillén *et al*⁵⁴.

Figura 6. Fermentador cargado con el caldo de cultivo.



⁵³ OROZCO MURILLO, M. P., & SOLARTE, J. A. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Trabajo de grado Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, 2003. 115p.

⁵⁴ GUILLEN ROMERO, Laura y VEGA LOPEZ, Jorge. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas comosus mer*) y banano (*Musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá: Universidad de América. Facultad de Ingenierías, 2013. 108p.

Teniendo el medio de cultivo, se autoclava a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Esto con el fin de garantizar la esterilización del medio, evitando la posibilidad de que otros microorganismos presentes en el medio interfieran en el desarrollo de la fermentación, produciéndose la competencia por el sustrato presente en el caldo.

2.5.3 Fermentación. La fermentación fue realizada en una incubadora tipo Shaker, con control de temperatura y agitación. Esta última, se fija en 150 rpm, ya que va a permitir una adecuada homogeneización de la mezcla y también la distribución del sustrato para los microorganismos.

Debido al carácter anaeróbico facultativo del microorganismo *Lactobacillus acidophilus* y a que su crecimiento se da en condiciones microaerofílicas, la tapa del fermentador no debe ajustarse totalmente por la producción de gas residual.

Esta especie de microorganismo también se caracteriza por ser mesófilos, es decir, su crecimiento es óptimo en temperaturas que oscilan entre los 15 y 40°C. Según los datos técnicos de la cepa, tiene una temperatura óptima de crecimiento que está entre los 34 y los 40°C, por lo que la temperatura para la fermentación se fija en 37°C. Esto permitirá una condición que garantice mayores rendimientos en el proceso fermentativo.

EL tiempo de fermentación es definido con base a la investigación realizada por Laura Guillén et al⁵⁵, en la cual concluyeron que luego de 108 horas de fermentación, pueden obtenerse los resultados necesarios que conciernen a la presente investigación.

2.6 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA

Para la cuantificación de la biomasa, se sembraron las nueve muestras tomadas a lo largo del proceso fermentativo en cajas de Petri, con medio de cultivo MRS, siendo este un método de conteo directo, ya que es posible observar las unidades formadoras de colonia (UFC) directamente.

⁵⁵ GUILLEN ROMERO, Laura y VEGA LOPEZ, Jorge. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas comosus* mer) y banano (*Musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá: Universidad de América. Facultad de Ingenierías, 2013. 108p.

2.6.1 Diluciones. Debido a que si se siembra directamente la muestra en las cajas de Petri, puede resultar imposible el conteo de las unidades formadoras de colonia, es necesario realizar diluciones sucesivas para poder realizar el proceso de cuantificación.

Para obtener un número de UFC de entre 30 y 300, se tomó 1 mL de muestra y se añadió a 9 mL de solución salina al 0.85% v/v y así obtenerse una dilución de 1×10^{-1} , posteriormente se tomó 1 mL de la solución anterior y se añadió a 9 mL de solución salina y obtenerse la dilución 1×10^{-2} . Se realizó este procedimiento sucesivamente hasta obtener las diluciones debidamente marcadas y seriadas, realizándose el procedimiento cerca de un mechero, con el fin de generar condiciones de asepsia en la zona de trabajo.

2.6.2 Siembra. Luego de tener las diluciones de las muestras recolectadas y teniendo en cuenta que en las primeras horas de la fermentación el número de microorganismos es menor respecto a las últimas etapas del proceso, se eligieron para sembrar primero diluciones más concentradas y finalizando con diluciones menos concentradas.

Durante el proceso de siembra, se trabajó lo más cerca posible al mechero, para garantizar condiciones de esterilidad y prevenir la contaminación de las muestras. Se tomaron 0.1 mL de las muestras a sembrar, partiendo de la más concentrada a la menos concentrada y posteriormente se homogeneizaron en sentido contrario con ayuda de un asa o rastrillo esterilizado para cada una de las muestras.

Finalizado este proceso, las cajas de Petri con las muestras, fueron llevadas a la incubadora a una temperatura de 37°C por espacio de 7 días aproximadamente, hasta que los microorganismos crecieron, haciéndose visibles sobre el medio de cultivo.

2.6.3 Obtención de datos. Luego de transcurrido el tiempo para el crecimiento de los microorganismos, por medio de la **Ecuación 26**, se obtuvieron para cada muestra, el total de unidades formadoras de colonia. Los resultados obtenidos, se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Crecimiento microbiano durante la fermentación.

Tiempo (h)	X (UFC/mL)	Log X
0	3×10^6	6.47
12	4×10^6	6.60
24	5×10^7	7.69
36	1.8×10^9	9.25
48	2×10^{10}	10.30
60	1.4×10^{11}	11.15
72	1.3×10^{12}	12.11
84	1.8×10^{12}	12.25
96	1.1×10^{13}	13.04

Estos datos de tiempo y concentración de biomasa a través del tiempo, se utilizarán para a partir de regresiones no lineales de modelos cinéticos de crecimiento, obtener parámetros propios del proceso fermentativo que permitirán describirlo, analizarlo y compararlo con otros procesos.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se analizarán los resultados obtenidos en el capítulo anterior, interpretando el crecimiento del microorganismo, las condiciones de operación y el modelo cinético ajustado al proceso experimental. Los datos de consumo de sustrato a través del tiempo se obtuvieron gracias a un proyecto de la misma línea de investigación en el grupo de procesos de separación no convencionales (GPS).

3.1 FERMENTACIÓN

Durante el proyecto, se llevaron a cabo dos fermentaciones. La primera de ellas resultó infructuosa debido a un problema de falta de control en la temperatura del proceso y al evitar más rigurosamente la contaminación del caldo de fermentación; el resultado de la misma fue que debido a la contaminación por algún factor o muerte microbiana, no se presentó crecimiento microbiano y por consiguiente no hubo producción de ácido láctico

Para la segunda fermentación experimental, se corrigieron los aspectos necesarios, obteniendo entonces un proceso experimental exitoso. En la gráfica del crecimiento microbiano respecto al tiempo, pueden observarse distintas fases de crecimiento, lo que demuestra que las condiciones de agitación y temperatura determinadas fueron correctas.

Por otro lado, en el conteo de unidades formadoras de colonia por unidad de volumen, no se evidenció contaminación por parte de algún microorganismo diferente al utilizado, lo cual favoreció en el resultado final de la fermentación.

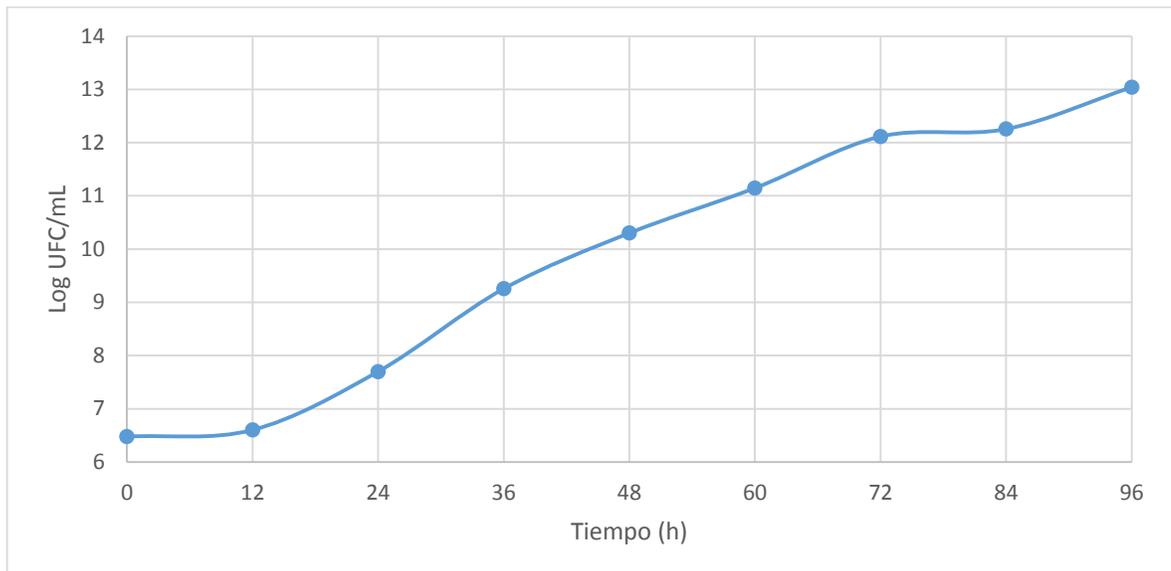
3.2 CINÉTICA MICROBIANA

Después de realizar el método de conteo de las unidades formadoras de colonia para las muestras obtenidas de la fermentación se obtuvieron los resultados mostrados en el capítulo anterior; es posible notar que durante las primeras 12 horas de fermentación, el microorganismo se estuvo adaptando a las condiciones del medio que lo rodeaba y empezó a consumir el sustrato de piña. Estos valores, obedecen al objeto para el cual los modelos cinéticos en mención, representan una mejor aproximación a los datos experimentales.

A partir de los datos obtenidos en la **Tabla 2**, se construye el **Gráfico 1**. En esta, además de verse la etapa de adaptación en las primeras 12 horas, es posible

también notar la etapa de crecimiento exponencial, la cual comprende aproximadamente entre las 12 y las 84 horas de fermentación. Posterior a esta fase, se esperaría que el microorganismo entre en fase estacionaria, pero la concentración de microorganismos en la hora 96 es mayor a la que se encuentra en las horas 72 y 84. Este repunte en el crecimiento microbiano, puede asociarse al fenómeno de crecimiento diaúxico, el cual consiste en que el microorganismo ha agotado su fuente de carbono principal, pero entra en una nueva fase de adaptación para empezar a consumir otro sustrato presente en el caldo de fermentación⁵⁶. Este fenómeno presentado, se asocia al consumo de un sustrato complejo en la fermentación, en el que no es conocida la cantidad de fuentes de carbono disponibles en el mismo.

Gráfico 1. Crecimiento de biomasa a través del tiempo.



En la figura obtenida, no es posible diferenciar las etapas estacionaria y de muerte microbiana, esto debido a que el tiempo de fermentación pudo haberse extendido hasta tomar más valores que permitieran representar todas las fases de crecimiento⁵⁷. Para esta investigación, el no contar con los datos de la etapa de muerte y estacionaria no representa ningún problema, debido a que el inóculo de

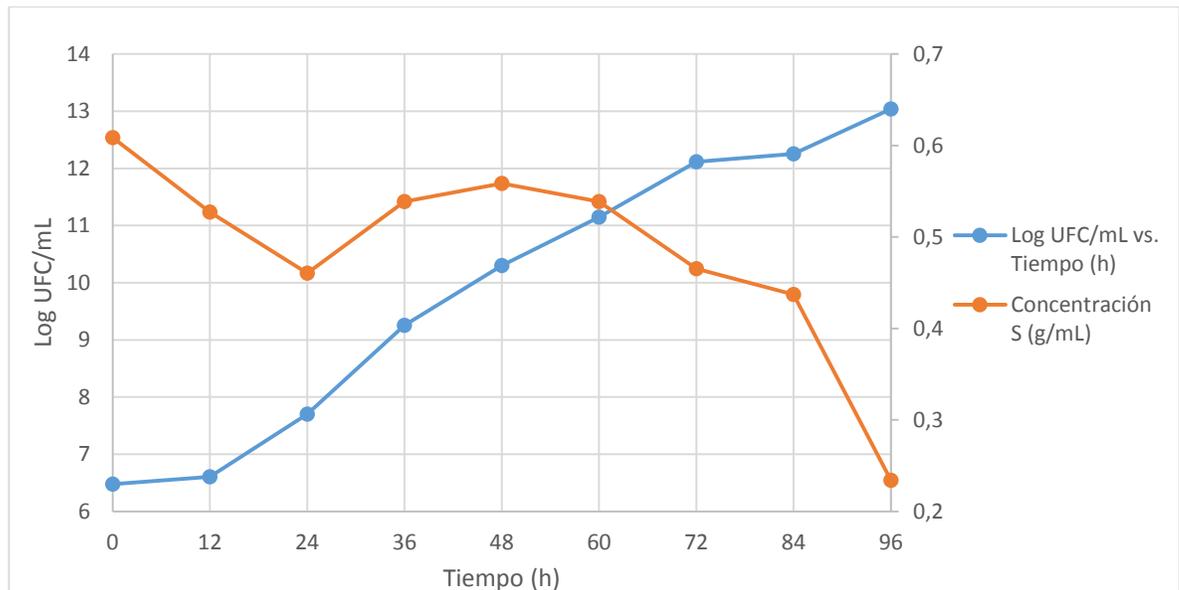
⁵⁶ STRELKAUSKAS, Anthony J., et al. Microbiology. 2da. ed. Nueva York: Garland Science, 2016. ISBN 9780815345442

⁵⁷ ROUSSOS, S. y PERRAUD-GAIME, I. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos Utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido. En: Fronteras de Biotecnología y Bioingeniería. Mayo, 1996, p. 341-348.

Lactobacillus acidophilus utilizado en la fermentación produce un metabolito primario (ácido láctico) asociado al crecimiento, es decir, se produce metabolito en la medida que la población microbiana aumenta. Por lo tanto, cuando acaba la etapa de crecimiento exponencial, la producción de ácido láctico habrá llegado a su tope y no se lograran concentraciones mayores a las ya obtenidas.

Por otro lado, pudo evidenciarse la fermentación láctica, resultado de la comparación del crecimiento microbiano con el consumo de sustrato. Con ello, fue posible notar que según se daba el crecimiento microbiano, la concentración de sustrato en el medio de cultivo disminuye progresivamente; dicho comportamiento puede notarse en el **Gráfico 2**.

Gráfico 2. Crecimiento Microbiano y Consumo de Sustrato a través del tiempo.

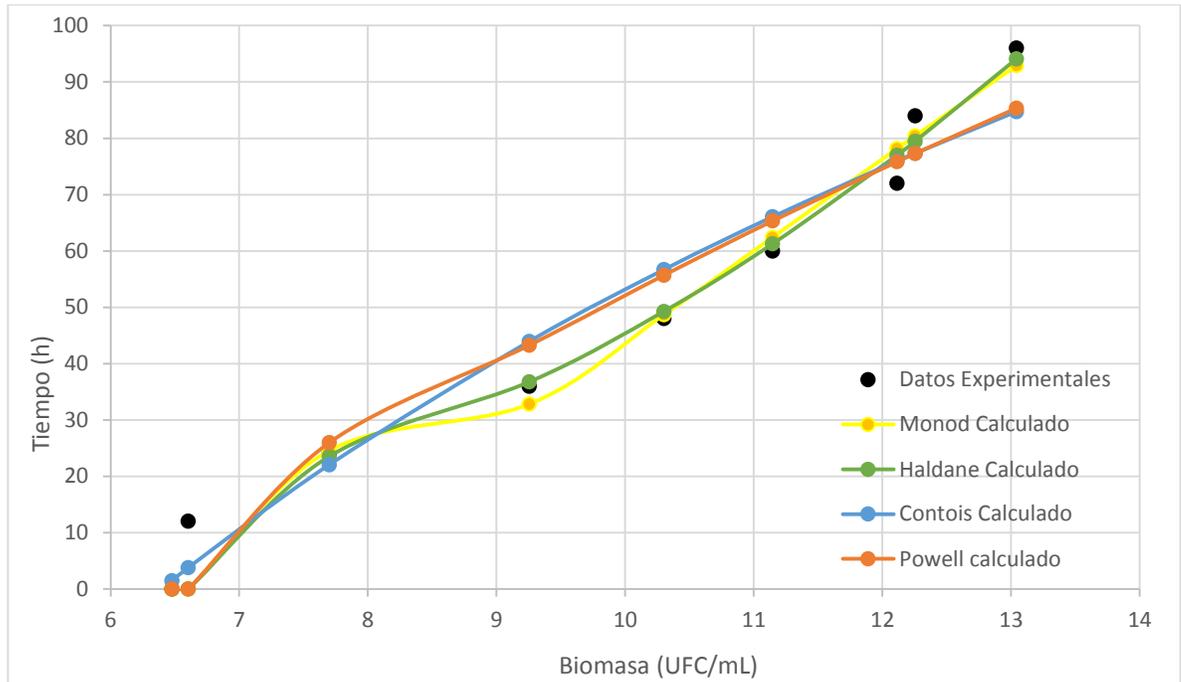


De la anterior figura, es posible notar un aumento súbito en la concentración de azúcares reductores en las muestras tomadas entre las 24 y 36 horas de experimentación, debido a que como ya se dijo, el ácido láctico es un metabolito asociado al crecimiento o primario, lo cual ocasionó un aumento también del pH del medio, siendo este el precursor para que los azúcares no reductores presentes en el medio de cultivo pudieran hidrolizarse y convertirse en azúcares reductores que aumentaron los niveles en la lectura de los mismos.

En los **Gráficos 3 y 4**, se muestran los valores experimentales frente a los valores calculados según cada modelo cinético de crecimiento. En el **Gráfico 3**, se

representan los modelos cuya variable independiente es la biomasa, junto a los puntos experimentales recolectados durante el estudio.

Gráfico 3. Ajuste de datos experimentales a los modelos cinéticos cuya variable independiente es la biomasa.

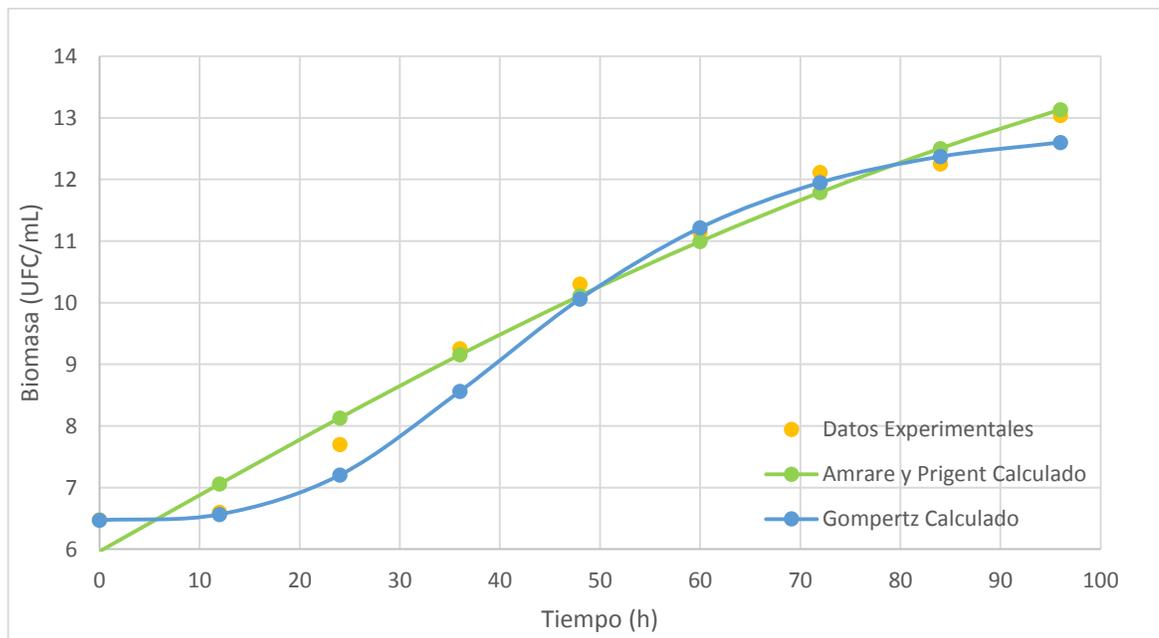


Los modelos descritos anteriormente, son aquellos cuya variable independiente es la biomasa, y la predicción de los datos experimentales corresponden a tiempos calculados. De acuerdo a la anterior gráfica, es posible notar que en la fase de adaptación, es decir para tiempos calculados comprendidos entre las 0 y 12 horas, el modelo que mejor representa los datos experimentales es el de Contois debido a que este modelo es apropiado para describir los procesos donde hay hidrólisis, como es este caso en los azúcares no fermentables; sin embargo, conforme se calculan tiempos comprendidos en la fase de crecimiento exponencial, este modelo tiende a alejarse de los datos experimentales siguiendo una tendencia de línea recta; no se perciben grandes diferencias entre las predicciones hechas con el modelo de Powell, que se comporta muy similar al modelo de Contois, exceptuando la zona en la que los tiempos calculados van hasta las 40 horas. Por otro lado, los modelos de Monod y Haldane describen una mejor representación gráfica de los datos experimentales y particularmente el último, describe satisfactoriamente la fase de crecimiento exponencial del proceso fermentativo. Sin embargo, es posible también notar que ninguno de los modelos estudiados describe el primer dato

recolectado experimentalmente; dicho comportamiento obedece a que los modelos cinéticos no describen la fase de adaptación de los microorganismos al medio, fase que según el crecimiento microbiano, tardó alrededor de 12 horas.

En el **Gráfico 4**, se muestran los modelos cuya variable independiente es el tiempo.

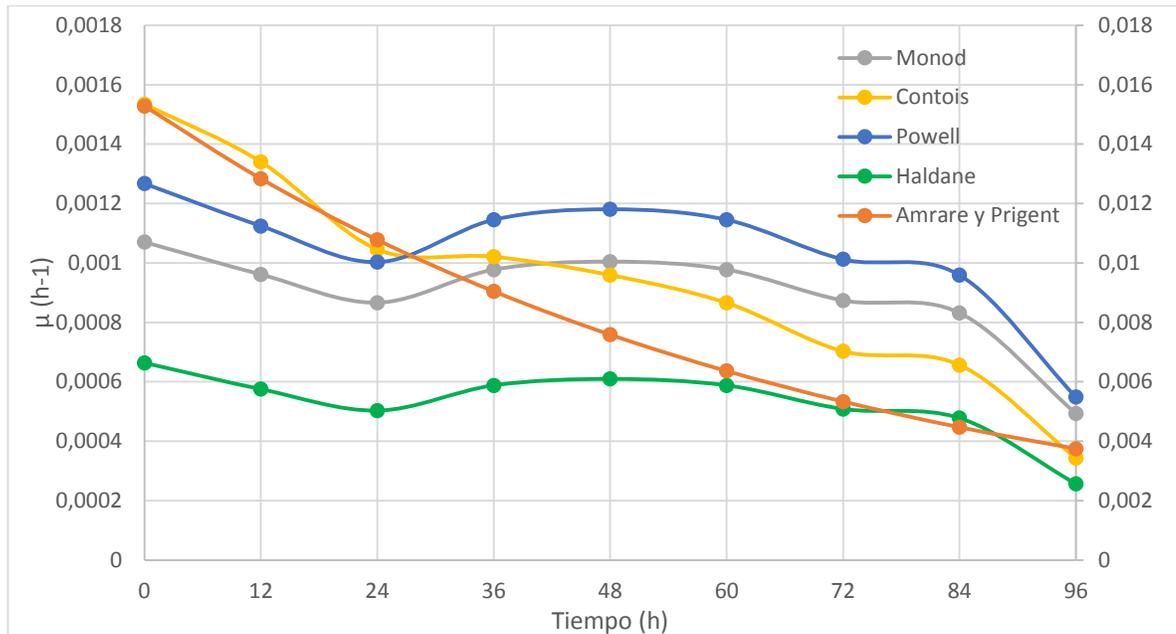
Gráfico 4. Ajuste de datos experimentales a los modelos cinéticos cuya variable independiente es el tiempo.



Estos modelos independientes de la concentración de sustrato a lo largo del proceso fermentativo, muestra que los puntos de datos experimentales, se acercan más al crecimiento predicho con el modelo cinético de Amrare y Prigent. Esto debido a que el modelo de Gompertz, fue desarrollado inicialmente para describir los procesos de muerte celular, etapa que no se encuentra en consideración en el presente estudio; por lo que el modelo de Amrare y Prigent resulta más adecuado para el modelado de las fases de latencia y crecimiento exponencial en un proceso fermentativo, en cuanto a la comparación entre modelos cinéticos de tipo primario.

Otro parámetro importante para el análisis es la tasa de crecimiento específica ($\mu_{\text{máx}}$), el cual es un indicador de que tanto está creciendo el microorganismo y su afinidad por el sustrato empleado en la fermentación. El cálculo de las velocidades específicas de crecimiento puede verse reflejado en el **Gráfico 5**.

Gráfico 5. Tasa de crecimiento específica en función del tiempo.

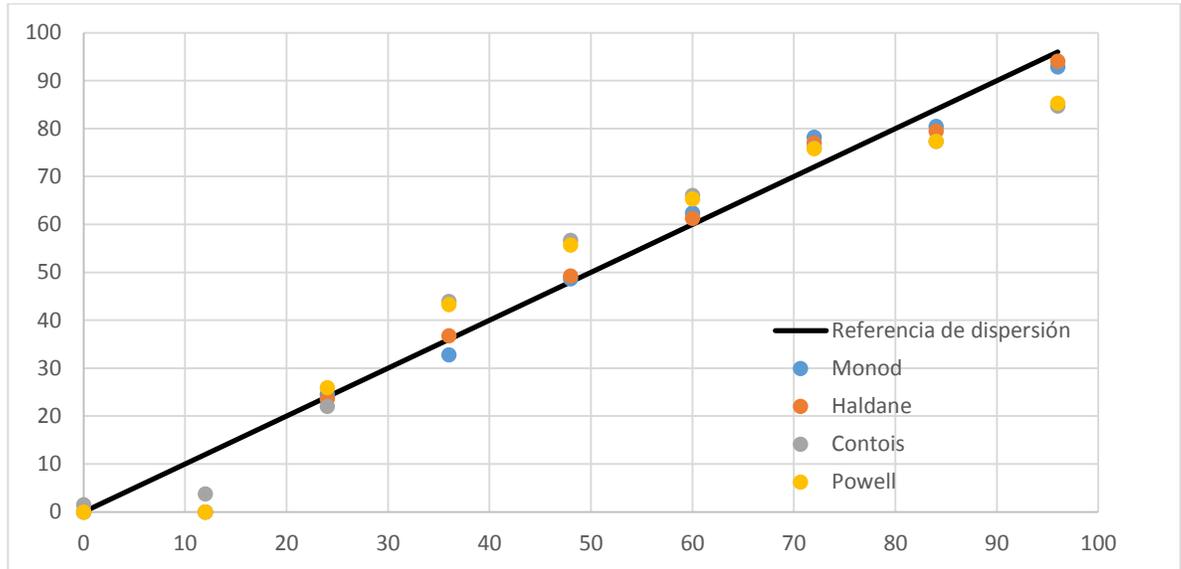


Acotando que los modelos de Haldane y Amrare y Prigent están representados mediante las magnitudes del eje vertical secundario; puede notarse que según el modelo de Amrare y Prigent, la tasa de crecimiento específica corresponde a valores 10 veces mayores que los predichos por los demás modelos. Esta diferencia se origina a que el modelo en cuestión, solamente calcula dicho parámetro con base a la población microbiana en el medio, y no considera la influencia de la concentración de sustrato en la fermentación.

Los modelos de Powell y Monod, describen una velocidad de crecimiento menor a la predicha por el modelo de Haldane aproximadamente en 0.005 h^{-1} ; por su parte, este último, entre la hora 84 y 96 tuvo una leve disminución en la velocidad de crecimiento, debido al fenómeno de diauxia que se discutió en apartes anteriores.

Se compararon además los tiempos calculados por los modelos cinéticos de Monod, Haldane, Powell y Contois y se describe el **Gráfico 6**.

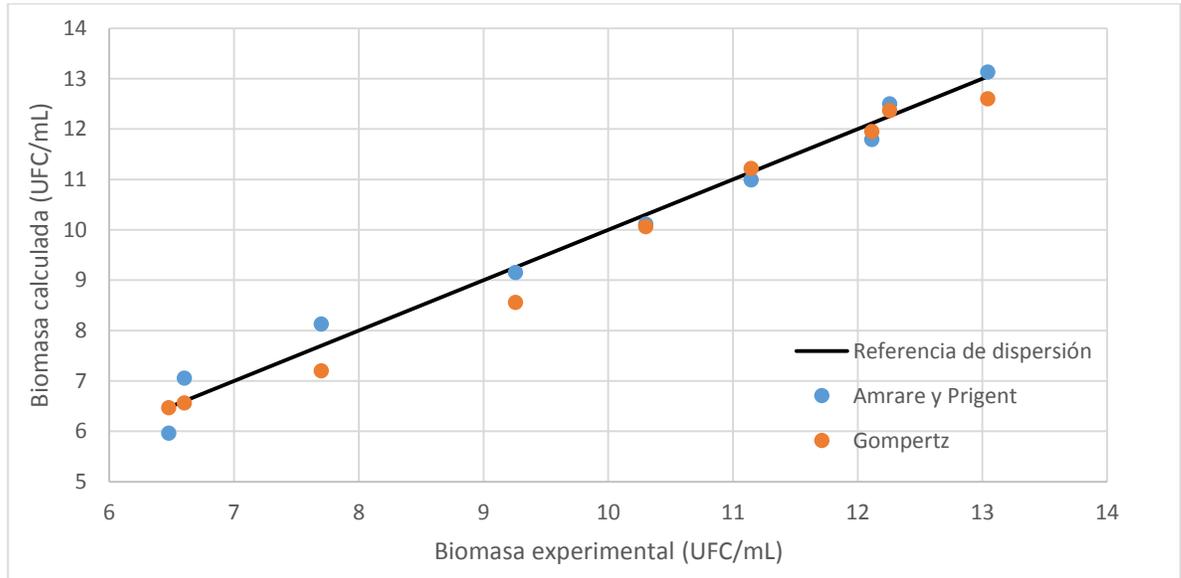
Gráfico 6. Dispersión de tiempos calculados.



A partir del anterior es posible notar que ninguno de los modelos representa los datos obtenidos en el segundo punto experimental debido a la fase de adaptación en que se encontraba el microorganismo, como se discutió anteriormente. Sin embargo, como se confirmará más adelante numéricamente, los datos se ajustaron a los datos experimentales, teniendo en cuenta que se están describiendo procesos biológicos.

Los modelos de Amrere y Prigent y Gompertz, permiten comparar las biombras calculadas frente al conteo microbiano obtenido experimentalmente, como se muestra en **Gráfico 7**.

Gráfico 7. Dispersión de biomasa calculada.



Del gráfico anterior, es posible notar como el modelo de Gompertz ajusta sus dos primeros datos sobre la línea de referencia en el gráfico, mientras que por otro lado, el modelo de Amrare y Prigent describe en mayor medida los datos experimentales a partir del cuarto dato; información que se corrobora según el coeficiente de correlación y el porcentaje de error de mínimos cuadrados.

Para la comparación entre los modelos estudiados, se ajustaron parámetros característicos de 8 modelos cinéticos de tipo no estructurados, cuyos resultados se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Valores de los parámetros estimados de los modelos de crecimiento microbiano a partir del método integral de análisis en la fermentación de un sustrato complejo con *Lactobacillus acidophilus*.

Parámetro/Modelo	Monod	Haldane	Amrare y Prigent	Gompertz	Contois	Powell
$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,00398	1,12085	0,72598	0,12964	0,00846	0,00698
K	1,654	101,999	NA	NA	0,424	0,873
K_i	NA	0,484	NA	NA	NA	NA

Tabla 3. (Continuación)

Parámetro/Modelo	Monod	Haldane	Amrre y Prigent	Gompertz	Contois	Powell
Y_{xs}	0,705	0,705	NA	NA	0,014	0,217
R²	0,974	0,977	0,982	0,981	0,950	0,947
MSE (%)	16,128	12,550	2.39x10 ⁻⁴	0,396	15,368	12,570

Los modelos de Moser y Teissier no aparecen en la tabla anterior, debido a que no se obtuvo la convergencia en los datos requerida para obtener los parámetros que describen el proceso fermentativo. En ambos casos, las variables de salida mostraban que la tasa de crecimiento específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) tendía a cero, lo que describe que el microorganismo no crece en las condiciones evaluadas; la constante de saturación tendiendo a infinito, representa una concentración de sustrato tendiente a infinita necesaria para que el microorganismos alcance la mitad del valor de la tasa de crecimiento específica máxima; y el rendimiento global del proceso biomasa-sustrato tendiendo a uno, describe que toda la población microbiana consumió el sustrato empleado. Esto se debe a que los modelos de Moser y Teissier, fueron concebidos principalmente, con el objetivo de poder representar además de las fases de crecimiento exponencial y latencia, la fase de muerte celular y su injerencia en los procesos fermentativos.

Los modelos de Monod, Haldane, Contois y Powell dependen de la concentración de sustrato presente en el medio de cultivo⁵⁸, y a excepción de Haldane y Powell con 4, cuentan con 3 parámetros a ajustar mediante el análisis diferencial o integral de valores reportados de una experimentación. Los modelos de Monod, Contois y Powell con una tasa de crecimiento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) de 0.00398, 0.00846 y 0.00698, respectivamente, sugieren que se presentó un crecimiento microbiano lento a través del tiempo; teniendo en cuenta que la tasa de crecimiento específica representa una relación entre las concentraciones inicial y final de biomasa, se explica que no se cuenten con puntos experimentales que representen la fase

⁵⁸ TREJOS, Víctor Manuel, FONTALVO ALZATE, Javier y GÓMEZ GARCÍA, Miguel Ángel. Descripción matemática y análisis de estabilidad de procesos fermentativos. En: DYNA. Enero, 2009, vol. 76, no. 158, p. 111-121.

estacionaria y de muerte en el proceso fermentativo a lo largo de las 96 horas de experimentación.

El modelo de Haldane por su parte, brinda información sobre los procesos de inhibición por sustrato en el medio. Con una constante de inhibición despreciable ($K_i=0.484$), es posible deducir que se descartan los posibles procesos inhibitorios por sustrato durante la fermentación experimental.

De los modelos anteriores, el de Haldane tuvo un coeficiente de correlación mayor (R^2) que los modelos de Monod, Contois y Powell: 0.977, 0.974, 0.950 y 0.947, respectivamente. Estos resultados, al representar una relación de la linealidad entre las variables cuantitativas de cada modelo, describen que a un mayor valor de R^2 , los resultados obtenidos se ajustan mejor a los datos experimentales.

Como otro factor de comparación, se presenta el porcentaje de error de mínimos cuadrados (MSE), donde un valor menor representa una mayor convergencia de los datos. El modelo de Haldane obtuvo un resultado de 12.55%, frente al 16.128% de Monod, 15.368% de Contois y 12.57% de Powell. Esto indica una congruencia frente a la gráfica presentada anteriormente, donde es posible notar que la mayor cercanía de un modelo frente a los datos experimentales, es el modelo de Haldane.

Por otro lado, los modelos de Amrere y Prigent y Gompertz, no dependen de la concentración de sustrato en el medio para representar el proceso de crecimiento microbiano. El modelo de Amrere y Prigent sugiere una mayor tasa de crecimiento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) 0.72598 frente al modelo de Gompertz, 0.12964. Además, los coeficientes de correlación (R^2) y MSE corresponden a 0.982, 0.981, 2.3×10^{-4} y 0.396, respectivamente. Esto describe un mejor ajuste de los parámetros utilizando el modelo de Amrere y Prigent, aunque el modelo de Gompertz también se ajusta en similares proporciones que su análogo. Esta leve diferencia obedece a que los parámetros que se ajustan con el modelo de Gompertz son a partir de los cuáles se deducen, mediante expresiones matemáticas, los parámetros que se comparan en este estudio, como la tasa de crecimiento específica.

4. CONCLUSIONES

- El modelo cinético con mayor coeficiente de correlación y menor porcentaje de error de mínimos cuadrados fue el modelo de Amrare y Prigent con 0.982 y 0.00024%, respectivamente.
- Entre los modelos dependientes de otras variables además de la concentración de biomasa, el modelo con mayor coeficiente de correlación y menor porcentaje de error de mínimos cuadrados fue el modelo de Haldane con 0.977 y 12.55%, respectivamente.
- El modelo de Haldane describe que los fenómenos de inhibición por sustrato durante el proceso fermentativo no influyen en el crecimiento de los microorganismos.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una hidrólisis de los azúcares en el sustrato antes del inicio de la fermentación con el objetivo de garantizar que todos los azúcares disponibles para la misma sean fermentables.
- Debido a que un proceso biológico puede ser afectado por más variables además de la temperatura (como el pH, la aireación, la tasa de nitrificación, porosidad de la membrana celular, etc.), se recomienda realizar la evaluación de la influencia de estas en el proceso fermentativo.
- Al obtener los parámetros del proceso fermentativo mediante el ajuste de modelos cinéticos no estructurados, se recomienda realizar la evaluación con modelos cinéticos de tipo estructurados que permitan comparar con los obtenidos en el presente estudio.
- Realizar la toma de muestras cada 6 horas, con el objetivo de tener más puntos experimentales que permitan un mejor ajuste de los modelos cinéticos estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali, TASHIRO, Yukihiro y SONOMOTO, Kenji. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. En: Biotechnology Advances. Noviembre, 2013, vol. 31, no. 6, p. 877-902.

ALONSO NORE, Lina Ximena y POVEDA SÁNCHEZ, Jeimy Alexandra. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas petrifilm™ 3MTM para el análisis de alimentos. Tesis de grado Microbiología Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2008. 213p.

AMRANE, Abdeltif y PRIGENT, Yves. Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: Model development and simulation. En: Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Julio, 1994, vol. 60, no. 3, p. 241-246.

ARIAS ZABALA, Mario; HENAO NAVARRETE, Lina y CASTRILLÓN GUTIÉRREZ, Yulieth. Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con *Lactobacillus bulgaricus* nrrl-b548. En: DYNA. Junio 2009, vol. 76, no. 158, p. 147-153.

ATKINSON, B. Biochemical reactors. Londres. Pion Limited, 1974. 267p.

ÁVILA, Rita M., CÁRDENAS, Antonio y MEDINA, Ana. Tratamiento del lactosuero utilizando la técnica de electrodiálisis. En: Interciencia. Marzo-abril, 2000, vol. 25, no. 2, p.80-84.

BECERRA OSPINA, Nubia Liliana. Clarificación de vinazas de caña de azúcar por tratamiento fisicoquímico y filtración con membranas. Tesis de Magíster en Ingeniería Química. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, 2014. 134p.

BERRY, A., FRANCO, C., ZHANG, W. y MIDDELBERG, A. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. (1999). En: Biotechnology Letters. Vol.: 2, No.: 21, p. 163-167.

BLANCH, HARVEY W. INVITED REVIEW MICROBIAL GROWTH KINETICS. En: Chemical Engineering Communications. Enero, 1981, vol. 8, no. 4-6, p. 181-211.

BUSTOS, G., et al. Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. En: Food Microbiology. Abril, 2004, vol. 21, no. 2, p. 143-148.

CARRÈRE, Hélène y BLASZKOW, Frédéric. Comparison of operating modes for clarifying lactic acid fermentation broths by batch cross-flow microfiltration. En: Process Biochemistry. Marzo, 2001, vol. 36, no. 8, p. 751-756.

CASTRILLÓN, Olivia, BEDOYA, Oswaldo y MONTOYA, Diana. Efecto del pH sobre el crecimiento de microorganismos durante la etapa de maduración en pilas estáticas de compost. En: Producción + Limpia. Diciembre, 2006, vol. 2, no. 1, p. 87-98.

CEDRÓN CASTRO, Javier. El modelo de Gompertz y su aplicación en seguridad alimentaria. Trabajo de grado Nutrición Humana y Dietética. Valladolid: Universidad de Valladolid. Facultad de Medicina, 2016. 43p.

CHEN, Z., QIU, Y. y HUANG, Z. Estimation of growth and mortality parameters of *argyrosomus argentatus* in northern south china sea. En: The Journal of Applied Ecology. Vol. 4, No 16; p712.

CONTOIS, D. E. Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. En: Journal of General Microbiology. Agosto, 1959, vol. 21, no. 1, p. 40-50.

CORDÓN PÁEZ, Santiago y PÉREZ MARTÍNEZ, Jorge Alejandro. Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá: Universidad de América. Facultad de Ingeniería, 2016. 132p.

DABES, J. N., FINN, R. K. y WELKE, C. R. Equations of substrate-limited growth: The case for Blackman kinetics. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 15, No 6 (1973); p1151-1177.

DING, Shaofeng y TAN, Tianwei. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. En: Process Biochemistry. Junio, 2006, vol. 41, no. 6, p. 1451-1454.

DON, Mashitah Mat y SHOPARWE, Noor Fazliani. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. En: Biochemical Engineering Journal. Marzo, 2010, vol. 49, no. 1, p. 95-103.

DUARTE TORRES, Alberto. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. En: Ingeniería e Investigación. Enero, 2011, no. 33, p.123-138.

_____. Introducción a la ingeniería bioquímica. 1995. 355 p.

ESENER, A. A., ROELS, J. A. y KOSSEN, N. W. Theory and applications of unstructured growth models: Kinetic and energetic aspects. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 25, No. 1 (1983); p. 2803-2841.

FAKRUDDIN, Md., MOHAMMAD MAZUMDER, Raez y SHANEWAJ BIN MANNAN, Khanjada. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. En: Ceylon Journal of Science. Noviembre, 2011, vol. 40, no. 2, p. 121-131.

FREDRICKSON, A. G., MEGEE, R. D. y TSUCHIYA, H. M. Mathematical Models for Fermentation Processes En: Anonymous Advances in Applied Microbiology. 1970, vol. 13, p. 419-465.

GALLEGO, D., SUAREZ, F. y TRUJILLO, M. (1998). Fermentación láctica en continuo a partir de suero dulce de leche desproteínizado. En: Revista Colombiana De Biotecnología, Vol. 1, No. 1 (1998); p. 45-50.

GARCÍA, María D., *et al.* Planta de producción de ácido láctico. Trabajo de grado Química industrial. Cerdanyola del Vallés: Universidad Autónoma de Barcelona, 2010. 193p.

GIL-HORÁN, Ricardo H., DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, María y PACHO-CARRILLO, Juan Daniel. Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. En: Tecnología, Ciencia, Educación. Julio, 2008, vol. 23, no. 2, p.79-90.

GUILLEN ROMERO, Laura y VEGA LOPEZ, Jorge. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas comosus mer*) y banano (*Musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bogotá: Universidad de América. Facultad de Ingenierías, 2013. 108p.

GUTIÉRREZ MOSQUERA, L. F. (2008). Estudio y diseño de procesos reacción extracción simultáneos. Trabajo de investigación Doctorado en Ingeniería. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. 2008. 92p.

HALDANE, J. B. S. A mathematical theory of natural and artificial selection. (Part VI, Isolation.). En: Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. Abril 1930, vol. 26, no. 2, p. 220-230.

HAN, K. y LEVENSPIEL, O. Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. En: Biotechnology and Bioengineering. Vol. 32, No. 4 (1988); p. 430-447.

HARLEY, John P., PRESCOTT, Lansing M. y KLEIN, Donald A. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana, 2004.

HEIJNEN, J. J. y ROMEIN, B. Derivation of kinetic equations for growth on single substrates based on general properties of a simple metabolic network. En: Biotechnology Progress. Vol. 11, No. 6 (1995); p. 712-716.

HERRYMAN MUNILLA, Maribel y BLANCO CARRACEDO, Gladys. Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. En: ICIDCA: sobre los derivados de la caña de azúcar. Enero, 2005, vol. 39, no. 1, p. 49-59.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: ICONTEC, 2008.

_____. Referencias bibliográficas para elaboración del documento. Norma Técnica Colombiana NTC 5613. Sexta actualización. Bogotá: ICONTEC, 2008.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. Norma Técnica Colombiana NTC 4490. Última versión. Bogotá: ICONTEC, 1998.

JOHN, R., NAMPOOTHIRI, K. y PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. En: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 74, No. 3 (2007); p. 524-534.

K. MADHAVAN, Nampoothiri y ROJAN, John. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview of process developments and future perspectives. En: Journal of Evolutionary Biology. Noviembre, 2007. vol. 20, no. 6, p. 2075.

KULOV, N. y GORDEEV, L. Mathematical modeling in chemical engineering and biotechnology. En: Theoretical Foundations of Chemical Engineering. Vol. 48, No. 3 (2014); p. 225-229.

KUMAR, Shashi; KUMAR, Surendra y KUMAR, Arinjay. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. En: Biochemical Engineering Journal. Enero, 2005, vol. 22, no. 2, p. 151-159.

MCMEEKIN, Tom, et al. Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates? En: Food Control. Febrero 2013, vol. 29, no. 2, p. 290.

MONOD, Jacques. The Growth of Bacterial Cultures. En: Annual Review of Microbiology. Octubre, 1949, vol. 3, p. 371-394.

MOSER, Hermann. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. Washington. Carnegie Institution of Washington, 1958. 136p.

NAVIN, Chelliah y PHILOMENA. George. Modeling and simulation of a structured model for analysis of hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus* under aerobic and anaerobic batch conditions. En: Int. J. Curr. Sci. Enero, 2012, vol. 3, no. 1, p. 1-10.

NEIRA GARCÍA, Ana María; MARTÍNEZ REINA, Antonio María y ORDUZ RODRÍGUEZ, Javier Orlando. Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. En: Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Julio, 2016, vol. 17, no. 2, p. 149.

NYHOLM, N. A mathematical model for microbial growth under limitation by conservative substrates. En: Biotechnology and Bioengineering. Agosto, 1976, vol. 18, no. 8, p. 1043-1056.

OH, Hurok, et al. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. En: Bioresource Technology. Septiembre, 1996, vol. 96, no. 13, p. 1492-1498.

OROZCO MURILLO, M. P., & SOLARTE, J. A. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Trabajo de grado Ingeniería Química. Manizales: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, 2003. 115p.

POWELL, E.O. Microbial physiology and continuous culture. Londres: Her Majesty's Stationery, 1967.

PUERTA QUINTERO, Gloria Inés. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. En: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Diciembre, 2010, vol. 1, no. 42, p. 1-12.

RAMAN, D. RAJ y ANEX, ROBERT P. Conceptual and mathematical models of batch simultaneous saccharification and fermentation: dimensionless groups for predicting process dynamics. En: Journal of Biological Systems. Junio 2012, vol. 20, no. 2, p. 195-211.

RED ESPAÑOLA DE COMPOSTAJE. Ingeniería y aspectos técnicos de la digestión anaeróbica II.4. Madrid: Mundi-Prensa, 2016.

RODRÍGUEZ MEMBIBRE, M. L. Bacterias productoras de ácido láctico: Efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones. Trabajo de investigación Doctorado en Veterinaria. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Producción Animal, 1994. 211p.

ROJAS, Adriana M.; MONTAÑO, Liceth P. y BASTIDAS, Marlon J. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *streptococcus thermophilus*. En: Revista Colombiana de Química. Marzo, 2016, vol. 44, no. 3, p. 5-10.

ROUSSOS, S. y PERRAUD-GAIME, I. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos Utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido. En: Fronteras de Biotecnología y Bioingeniería. Mayo, 1996, p. 341-348.

SENN, Heinrich, et al. The growth of Escherichia coli in glucose-limited chemostat cultures: a re-examination of the kinetics. En: BBA - General Subjects. Diciembre, 1994, vol. 1201, no. 3, p. 424-436.

SARGENT, Robert G. y KLEIJNEN, Jack P. C. A methodology for fitting and validating metamodels in simulation. En: European Journal of Operational Research. Enero, 2000, vol. 120, no. 1, p. 14-29.

SERNA-COCK, L. y RODRÍGUEZ-DE STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: Ciencia y Tecnología Alimentaria. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54-65.

SIKDER, Jaya, et al. Kinetic of lactic acid production from sugarcane juice using *Lactobacillus plantarum* NCIM 2912. En: Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering. Mayo, 2014, vol. 9, no. 3, p. 374-381.

STRELKAUSKAS, Anthony J., et al. Microbiology. 2da. ed. Nueva York: Garland Science, 2016. ISBN 9780815345442.

TEISSIER, G. Quantitative laws of growth. En: Annales de Physiologie et de Physicochimie Biologique. Febrero, 1936, vol. 12, p. 527-586.

TREJOS, Víctor Manuel, FONTALVO ALZATE, Javier y GÓMEZ GARCÍA, Miguel Ángel. Descripción matemática y análisis de estabilidad de procesos fermentativos. En: DYNA. Enero, 2009, vol. 76, no. 158, p. 111-121.

VELÁZQUEZ DE LA CRUZ, Gonzalo, BUSTOS VÁZQUEZ, Guadalupe y RANGEL TORRES, Ernesto. Aprovechamiento biotecnológico de productos agropecuarios II. Plaza y Valdés, S.A. de C.V, 2008. 70p.

WANG, Y.; CORRIEU, G. y BÉAL, C. Fermentation pH and Temperature Influence the Cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. En: Journal of Dairy Science. Enero, 2005, vol. 88, no. 1, p. 21-29.

ANEXOS

ANEXO A MATERIALES Y EQUIPOS

Para el adecuado desarrollo experimental, es necesaria la utilización de equipos y materiales descritos a continuación.

MATERIALES

Los materiales utilizados durante la experimentación del proyecto son los siguientes:

Tabla 4. Materiales requeridos para el proceso experimental.

Elemento	Característica	Uso	Imagen
Frasco de vidrio tapa azul	Fabricado en borosilicato, conforme a ASTM E438, tipo I, clase A. Cuenta con tapa antigoteo GL45 y es autoclavable. Marca KIMAX	Ideal para almacenar o transportar medios de cultivo, además son adecuados para esterilizaciones.	 <p>Imagen 1. Frasco de tapa azul</p> <p>Fuente: Disponible en internet <http://www.blamis.com.co/product/frasco-tapa-rosca-azul></p>
Tubos de cultivo tapa rosca	Fabricados en borosilicato, conforme a ASTM 438. Espesor de pared uniforme para maximizar la transferencia de calor y resistencia química. Sus	Son utilizados para realizar las diluciones previas a la siembra de los cultivos bacterianos.	 <p>Imagen 2. Tubo de cultivo tapa rosca.</p>

	dimensiones son de 20x125 mm, marca KIMAX.		Fuente: Disponible en internet en < http://www.blamis.com.co/product/tubo-de-cultivo-tapa-rosca >
Cajas de Petri	Recipiente de vidrio, con tapa que permite tapanlo. Se puede encontrar de diferentes diámetros, son de fondo bajo.	Utilizadas para sembrar los microorganismos y posteriormente contar las UFC mediante la técnica de recuento en placa.	 <p>Imagen 3. Caja de Petri.</p> <p>Fuente: Disponible en internet en <http://www.mariefeld-superior.com/index.php/petri-dishes-accessoires-331/articles/cajas-de-petri-de-vidrio.html></p>

<p>Instrumentos de vidrio para medición volumétrica</p>	<p>Son instrumentos de vidrio, los cuales sirven para la medición de cantidades de volumen con gran exactitud. Entre estos se encuentran probetas, pipetas, vasos de precipitados, etc.</p>	<p>Se utilizan para medir volúmenes a la hora de hacer las diluciones.</p>	 <p>Imagen 4. Instrumentos de medición volumétrica.</p> <p>Fuente: Disponible en http://www.ibmetro.gob.bo/web/lab_vol_dens</p>
<p>Micropipeta</p>	<p>Instrumento para la medición de volúmenes de líquidos muy pequeños de manera exacta, generalmente volúmenes menores a 1 mL.</p>	<p>Utilizado para tomar volúmenes de 0.1 mL de las muestras para posteriormente realizar las diluciones sucesivas.</p>	 <p>Imagen 5. Micropipeta.</p> <p>Fuente: Disponible en internet en http://www.blamis.com.co/product/transferpetter-s-tipo-fix-micropipeta-monocanal</p>

Rastrillo	Son generalmente tubos de vidrio desechados de usos previos, cuyas puntas se doblan o curvan.	Este instrumento es utilizado para homogeneizar las siembras de microorganismos en las cajas de Petri, previo al conteo de UFC.	 <p>Imagen 6. Rastrillo.</p> <p>Fuente: Disponible en internet en http://www.mariefeld-superior.com/index.php/petri-dishes-accessoires-331/articles/espatulas-drigalski.html</p>
-----------	---	---	---

EQUIPOS

Para el proceso experimental, son necesarios los siguientes equipos, que permiten que las condiciones que el mismo requiere se puedan alcanzar y controlar:

Tabla 5. Equipos requeridos para la experimentación.

Equipo	Característica	Uso	Imagen
Incubadora	Este equipo, tiene como función generar las condiciones adecuadas de temperatura y humedad que permita el crecimiento de los microorganismos.	Se utiliza para que se generen las condiciones adecuadas para la fermentación experimental.	 <p>Imagen 7. Incubadora.</p>

<p>Agitador</p>	<p>Equipo de laboratorio utilizado para homogeneizar mezclas o agitar medios de cultivo. Modelo: DSR 2100V</p>	<p>Se utiliza para obtener la agitación necesaria en el proceso fermentativo.</p>	 <p>Imagen 8. Agitador.</p>
-----------------	--	---	---

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Yo **Juan Fernando Calderón Vargas** en calidad de titular de la obra **Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo**, elaborada en el año 2016, autorizo al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que me corresponde y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autor manifiesto conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autor establezco las siguientes condiciones de uso de mi obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	X
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a su autor.

De igual forma como autor autorizo la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZO	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	X	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaré, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá, D.C, a los 7 días del mes de noviembre del año 2017.

EL AUTOR:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Juan Fernando	Calderón Vargas
Documento de identificación No	Firma
1.018.4707.776	