

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL CONSUMO DE
SUSTRATO DE PIÑA (*ANANAS COMOSUS MERR.*) POR
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

LADY JOHANNA BURGOS MONTAÑEZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2018

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL CONSUMO DE
SUSTRATO DE PIÑA (*ANANAS COMOSUS MERR.*) POR
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

LADY JOHANNA BURGOS MONTAÑEZ

Proyecto de investigación para optar el título de:
INGENIERO QUÍMICO

Director
JAIME EDUARDO ARTURO CALVACHE
Ingeniero Químico

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2018

Nota de Aceptación (Dirección de Investigaciones)

Firma Docente Investigador



Firma Docente Jurado 1



Firma Docente Jurado 2

Bogotá, D.C., Marzo 2018

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 GARCIA-PEÑA

Vicerrectoría Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCIA-PEÑA

Decano Facultad de Ingeniería

Ing. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa de Ingeniería

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

Las directivas de la Fundación 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.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres.
Gracias a mis padres por el apoyo incondicional en mi proceso como profesional,
como persona y como hija.

Gracias a quienes hicieron posible el desarrollo de este trabajo, gracias a Rodrigo
Calvo por su apoyo, ayuda y motivación constante.

Lady Johanna Burgos Montañez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por darme la oportunidad de estudiar esta carrera que es y será mi pasión durante toda mi vida. Por su compañía y apoyo cuando lo necesitaba.

Al director del presente proyecto Jaime Arturo y al co-director Yovanny Morales, por su exigencia, ayuda y seguimiento durante el periodo de realización del proyecto.

A Ahudrey Leal, directora de los laboratorios de Nanotecnología y biotecnología del Tecnoparque nodo Bogotá, a todo su equipo, por la colaboración en la parte experimental.

Al cuerpo docente de la Universidad de América por compartir sus conocimientos a lo largo de la carrera.

Y a todas aquellas personas que hicieron posible la realización del presente proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS	22
1. GENERALIDADES	23
1.1 ÁCIDO LÁCTICO	23
1.1.1 Características del ácido láctico	24
1.1.2 Aplicaciones	25
1.1.2.1 Materia Prima para la producción de PLA	25
1.1.2.2 Aditivo en alimentos	26
1.1.2.3 Aplicaciones en cosméticos	26
1.1.2.4 Aplicaciones en detergentes	27
1.2 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	27
1.2.1 Demanda Mundial	27
1.2.2 Importación y exportación mundial	29
1.2.3 Demanda Nacional	29
1.3 TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN	31
1.3.1 Síntesis química	31
1.3.2 Fermentación microbiana	32
1.4 FACTORES DE OPERACIÓN DE LA FERMENTACIÓN	33
1.4.1 Cepa bacteriana	34
1.4.2 Fuente de carbono	34
1.4.3 Fuentes de nitrógeno	34
1.4.4 pH	35
1.4.5 Temperatura	35
1.4.6 Duración de la fermentación	35
1.4.7 Tipo de fermentación	36

1.5 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (LAB)	36
1.5.1 Bacteria <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	37
1.6 SUSTRATO	38
1.6.1 Piña como sustrato	39
1.6.1.1 Composición nutricional del fruto de piña	39
1.6.1.2 Residuo de piña	39
1.7 MODELOS CINÉTICOS	41
1.7.1 Suposiciones para construir modelos no estructurados	41
1.7.2 Estimación de parámetros cinéticos	42
1.7.3 Modelos no estructurados	42
1.7.3.1 Modelos para el consumo de sustrato	43
2. MATERIALES Y MÉTODOS	50
2.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO	50
2.2 MATERIA PRIMA	50
2.2.1 Valoración de madurez del sustrato	50
2.2.2 Caracterización del jugo de piña	51
2.2.2.1 Análisis organoléptico	51
2.2.2.2 Determinación del pH	52
2.2.2.3 Determinación de sólidos solubles	52
2.2.3 Obtención y tratamiento del residuo de piña	52
2.2.4 Preparación del medio de cultivo	53
2.3 MICROORGANISMO	54
2.3.1 Activación e inoculación de la bacteria	54
2.4 FERMENTACIÓN	54
2.4.1 Condiciones de operación	54
2.4.2 Tiempo de incubación	55
2.4.3 Muestreo	55
2.5 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO	56
2.5.1 Preparación MRS	56

2.5.2 Diluciones y siembra	58
2.5.3 Recuento en placa	59
2.6 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	60
2.6.1 Preparación ácido 3,5 dinitrosalicílico	60
2.6.2 Elaboración curva de calibración	60
2.6.3 Determinación de la concentración de sustrato	61
2.7 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	62
2.7.1 Validación del modelo	63
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO	65
3.2 FERMENTACIÓN	68
3.3 CRECIMIENTO MICROBIANO	70
3.4 DETERMINACIÓN CONSUMO DE SUSTRATO	71
3.4.1 Curva de calibración de glucosa	71
3.4.2 Determinación de azúcares reductores del sustrato de piña	72
3.5 PARÁMETROS CINÉTICOS	77
4. CONCLUSIONES	82
5. RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS	95

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.	25
Tabla 2. Composición del desecho de piña.	40
Tabla 3. Diferencias de los diferentes tipos de modelos cinéticos.	42
Tabla 4. Modelos cinéticos usados en este estudio.	48
Tabla 5. Tabla de color.	50
Tabla 6. Contenido mínimo de sólidos solubles totales expresado como grados brix de acuerdo con la tabla de color.	51
Tabla 7. Composición agar MRS.	57
Tabla 8. Elaboración muestras para la curva patrón de glucosa.	61
Tabla 9. Características del sustrato de piña.	65
Tabla 10. Cantidad de ácido láctico reportado por diferentes trabajos.	69
Tabla 11. Resultados crecimiento microbiano.	70
Tabla 12. Resultados de Absorbancias y Concentración de sustrato (S).	73
Tabla 13. Valores estimados de los parámetros cinéticos.	77

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Consumo Mundial de Ácido Láctico en el 2015.	28
Gráfica 2. Mercado de Ácido Láctico, Por regiones, 2015-2020 (USD Millones).	29
Gráfica 3. Exportación de LA en Colombia.	30
Gráfica 4. Importación de LA en Colombia.	31
Gráfica 5. Curva de crecimiento microbiano.	70
Gráfica 6. Curva patrón de glucosa.	72
Gráfica 7. Consumo de sustrato vs Tiempo.	74
Gráfica 8. Consumo de sustrato y crecimiento microbiana vs tiempo.	76
Gráfica 9. Comparación de los datos experimentales y los modelos cinéticos.	79

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura química del ácido láctico.	23
Figura 2. Isómeros ópticos del ácido láctico.	24
Figura 3. Síntesis de ácido poli láctico.	26
Figura 4. Esquema tecnológico de producción de LA por síntesis química.	32
Figura 5. Esquema tecnológico de producción de LA por fermentación.	33
Figura 6. Rutas metabólicas de las bacterias ácido-lácticas.	38
Figura 7. Relación del color de la piña con el nivel de madurez.	51
Figura 8. Diagrama para la obtención y tratamiento del jugo de piña.	53
Figura 9. Preparación agar MRS.	67
Figura 10. Técnicas de diluciones sucesivas para siembra de la cepa <i>lactobacillus acidophilus</i> .	58
Figura 11. Método de siembra por profundidad.	59
Figura 12. Metodología curva de calibración.	61
Figura 13. Metodología para la determinación de la concentración de sustrato.	62
Figura 14. Estimación de parámetros cinéticos en Matlab R2012b® por la función lsqcurvefit.	63
Figura 15. Piña utilizada en la fermentación.	66
Figura 16. Determinación grados Brix (°Brix).	67
Figura 17. Muestras con DNS para lectura en espectrofotómetro.	73

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Diluciones y siembras.	96
Anexo B. Determinación UFC/mL.	97
Anexo C. Conversión y rendimiento de sustrato en biomasa.	98

ABREVIATURAS

DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
K_i	Constante de inhibición (g/L)
K_S	Constante de saturación (g/L)
LA	Ácido láctico
LAB	Bacterias ácido lácticas
MRS	Agar de MAN, ROGOSA y SHARPE
nm	Nanómetros
PLA	Ácido poli-láctico
R^2	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
S	Concentración de sustrato (g/L)
S_0	Concentración inicial de sustrato (g/L)
T	Temperatura (°C)
t	Tiempo (horas)
μ	Velocidad específica de crecimiento (1/h)
UFC	Unidades formadoras de colonia
μ_{max}	Velocidad máxima específica de crecimiento (1/h)
X	Concentración de biomasa (g/L)
X_0	Concentración inicial de biomasa (g/L)
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa por glucosa consumida (gX/gS)

GLOSARIO

ÁCIDO LÁCTICO: sustancia orgánica producido por fermentación microbiana de sustratos con alto nivel de nutrientes que sean fuente de energía para las bacterias.

ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA): polímero biodegradable producido mediante recursos renovables como el almidón de maíz con propiedades similares a las de un polímero de origen petrolero. Es posible obtenerlo por medio de la polimerización de dos moléculas de ácido láctico.

AZÚCAR FERMENTABLE: sustancia orgánica que contiene carbonos, oxígenos e hidrógenos que representan la fuente energética de las células vivas. Capaz de ser desintegrado por microorganismos para la obtención de energía.

AZÚCAR NO REDUCTOR: azúcar que no posee su grupo carbonilo libre y por consiguiente no es posible oxidarlo.

AZÚCAR REDUCTOR: cualquier azúcar con la capacidad de actuar como agente reductor el cual posee la característica de llevar su grupo carbonilo libre y a través del mismo puede reaccionar.

BACTERIAS: organismos unicelulares microscópicos, son procariontes es decir que no presentan núcleo definido, capaces de transformar sustancias orgánicas en inorgánicas y viceversa.

BIOMASA: materia orgánica originada en un proceso biológico que puede ser utilizada como fuente de energía.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO: descripción matemática del proceso de fermentación con el fin de cuantificar, modelar y conocer el comportamiento del sistema biomasa, sustrato y metabolito por medio de métodos directos o indirectos.

CRECIMIENTO DIAÚXICO: crecimiento microbiano que posee dos fases exponenciales de crecimiento y se da cuando en un mismo medio hay dos o más sustratos que pueden ser aprovechados por la bacteria.

FERMENTACIÓN: descomposición de una sustancia orgánica mediante enzimas o microorganismos capaces de transformarla en otra sustancia de valor industrial.

INCUBACIÓN DE MICROORGANISMOS: proceso de desarrollo del crecimiento microbiano y producción del metabolito bajo condiciones de operación controladas como temperatura, agitación, pH.

LACTOBACILLUS: son bacterias microaerófilas, es decir requieren niveles de oxígeno inferiores a los que se encuentran en la atmósfera. Son bacterias Gram positivas y presentan una forma de bacilos en cadenas. La glucosa es principalmente fermentada a ácido láctico en el caso homofermentativo, sin embargo, es capaz de fermentar otros azúcares como fructosa, galactosa, lactosa, entre otras.

MATERIAL BIODEGRADABLE: material que es posible de descomponer por un microorganismo.

METABOLITO: sustancia final producida durante o después de la descomposición de un sustrato por microorganismos.

PIÑA (*Ananas comosus Merr*): fruto de color amarillo-naranja de forma cilíndrica irregular, formado por muchas piezas duras en forma de escamas. Contiene 85% de agua, carbohidratos y fibra. Rica en vitaminas C, B1 y B6, en cantidades más pequeñas nitrógeno y trazas de elementos como magnesio, sodio y potasio.

POLIMERIZACIÓN: unión de dos moléculas monómeras mediante reacción química para formar una larga cadena de moléculas denominada polímero.

SUSTRATO: sustancia renovable o no renovable que debe contener nutrientes que sean fuente de energía para que el microorganismo actúe sobre el mismo. Algunos de las materias primas más utilizadas son caña de azúcar, bagazo, granos, sustancias que contengan glucosa, lactosa, sacarosa, entre otros. La elección del sustrato depende de los requerimientos energéticos del microorganismo a utilizar.

RESUMEN

Este proyecto hace parte de un estudio más grande en el que se describen la cinética de crecimiento de biomasa y la cinética para la producción de ácido láctico. Sin embargo, estos son proyectos independientes y cabe resaltar que la elaboración de la fermentación y la toma de todos los datos experimentales para el ajuste de los modelos fue un trabajo conjunto con los compañeros que describen el crecimiento de la biomasa y la producción del metabolito primario, este proyecto no pretende crear un nuevo modelo cinético mediante los datos experimentales puesto que es complejo realizarlo y de largo tiempo de ejecución por este motivo se evaluarán los datos experimentales obtenidos en modelos presentes en bibliografía.

El desecho de piña posee gran cantidad de azúcares, los cuales pueden ser aprovechados por microorganismos que sean capaces de degradarlos y generar metabolitos o productos de fermentación.

En este trabajo se realizó una fermentación experimental para producir ácido láctico por medio de la bacteria *Lactobacillus acidophilus* en residuo de piña, se elaboró una búsqueda de la caracterización del sustrato de piña, su composición en nutrientes, contenido de azúcares y de la bacteria ácido láctica temperatura y pH óptimo de crecimiento, principales características, entre otros. Se estipuló el tiempo, la temperatura y el pH de la fermentación. La fermentación se realizó en un periodo de 108 horas a una temperatura de 36°C y un pH de 4,43 y se produjo una cantidad de ácido láctico de 58,7 g/L.

Luego, se determinó el contenido de azúcares reductores del sustrato en piña (*Ananas comosus*) presentes en el caldo de fermentación mediante un método fotocolorimétrico con ácido 3,5 dinitrosalicílico o DNS, determinando las absorbancias de cada muestra en un espectrofotómetro a 540 nm. En la curva de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación igual a 0,993. Se obtuvieron los valores de las concentraciones de sustrato en un rango entre 4,655 g/L hasta 2,773 g/L.

Se evaluaron cinco modelos cinéticos no estructurados al consumo de sustrato de piña, por medio de los datos experimentales obtenidos en la fermentación por lotes de los azúcares de residuo de piña por *Lactobacillus acidophilus* en la producción de ácido láctico, la estimación de los parámetros cinéticos de los modelos se realizó en Matlab R2012b®, los parámetros cinéticos fueron calculados al ajustar los datos experimentales a los modelos mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados. El modelo de Edwards brindó el debido ajuste con un coeficiente de correlación R^2 de 0,975. Se logró describir los datos experimentales por medio de modelos cinéticos no estructurados.

Palabras clave: Fermentación, Sustratos, Consumo, Cinéticas, Modelos Matemáticos.

INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es un ácido hidroxí-carboxílico de gran importancia a nivel industrial, es utilizado para regular la acidez en alimentos como yogures, quesos, dulces, cárnicos, entre muchos otros. También es empleado en la industria farmacéutica y en la industria del plástico, en la industria química como solvente, agente limpiador y neutralizante, entre otras¹.

La obtención del ácido láctico por vía fermentativa presenta variedad de opciones en el momento de elegir el microorganismo y el sustrato. Los sustratos deben ser una buena fuente de carbono para proporcionar el crecimiento bacteriano. Una amplia variedad de fuentes de carbohidratos, p. melaza, jarabe de maíz, suero de leche, dextrosa y caña o remolacha, se pueden utilizar. El uso de una materia prima específica de carbohidratos depende del precio, disponibilidad, suficiente contenido de azúcares. El tipo de microorganismo a seleccionar depende del hidrato de carbono que se fermentará.²

La sacarosa refinada y glucosa son los más utilizados para la producción de LA pero debido a que el azúcar puro es de alto coste se han venido investigando otras fuentes de carbono renovables que puedan disminuir los costes de producción, tales como granos y frutas dañadas, desechos agrícolas y porciones de granos y tubérculos.³

Los residuos agroindustriales vienen siendo utilizados como sustratos para la producción de metabolitos y productos de fermentación por medio de microorganismos que sean capaces de degradar el sustrato y aprovechar las fuentes de carbono⁴. El estudio presentado emplea residuos de piña como sustrato para la producción de ácido láctico por la bacteria *Lactobacillus acidophilus*. La piña (*Ananas Comosus Merr*) de la variedad “perolera” es una de las piñas más cultivada en Colombia⁵. Sasaki en 1991 determinó la composición de residuo líquido de piña que posee en su mayoría sacarosa, fructosa y glucosa⁶.

¹ GARCIA, Carlos A., Guillermo S. ARRÁZOLA, and Alba M. DURANGO, ‘Producción de Ácido Láctico Por Vía Biotecnológica’, Temas Agrarios, 15 (2010), 9–26.

² SERNA, Liliana, y RODRIGUEZ Aida. Producción Biotecnológica de Acido Láctica: Estado Del Arte. En: Ciencia, Tecnología Y Alimentos. 2005, vol. 5. p. 54–65.

³ *Ibíd.*, p.5.

⁴ Granda D, Mejía A, Jiménez G. Utilización de Residuos de Plátano para la Producción de Metabolitos Secundarios por Fermentación en Estado Solido con el Hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae*. 2005;12(2):13-20.

⁵ NEIRA, A., Martínez, A., & Orduz, J. (2015). Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 17 (2), 149-165.

⁶ SASAKI, K., Noparatnaraphorn, N. and Nagai, S. (1991). Use of Photosynthetic Bacteria for the Production of SCP and Chemicals from Agro Industrial Waste. *Bioconversion of Waste Material to Industrial Product*. Ed. Martin, A. M., J. of Elsevier App. Science. 225-233.

Las bacterias *Lactobacillus acidophilus* son bacterias microaerófilas; es decir requieren niveles de oxígeno inferiores a los que se encuentran en la atmósfera o anaerobias, ácido tolerantes y estrictamente fermentativas. La glucosa es principalmente fermentada a ácido láctico en el caso homofermentativo, pero es capaz de fermentar fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, manosa, sacarosa, entre otras. Crecen en un rango de pH de 5.0 a 6.0 y de 35°C a 40°C.⁷ Se seleccionó la bacteria *Lactobacillus acidophilus* por su fácil adquisición es una bacteria demandada en la industria láctea, además por que tolera un amplio rango de pH y temperatura durante la fermentación y por ser homofermentativa.

Según estudios previos realizados en la línea de investigación, En el trabajo de grado titulado “Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio” de los autores Santiago Cordón Páez y Jorge Alejandro Pérez Martínez publicado en el año 2016 se realizó una fermentación en dos sustratos complejos para determinar cuál de los dos se comportaba mejor, además se evaluaron y ajustaron modelos cinéticos para describir el crecimiento microbiano, consumo de sustrato y producción de metabolito. Para este proyecto, representa un precedente en los modelos matemáticos a evaluar.⁸ CUELLAR⁹ evalúa la separación de Ácido Láctico obtenida a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticos.

En el trabajo de grado titulado “Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas comosus*) y banano (*Musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico de los autores Laura Guillén y Jorge Armando Vega¹⁰ en el año 2013, evaluaron dos sustratos complejos como lo son la piña y el banano para la producción biotecnológica de este metabolito, evaluaron las propiedades metabólicas del microorganismo y realizaron un método de separación y obtención de ácidos carboxílicos que verificó la presencia de ácido láctico en el sistema. En este trabajo de grado se determinó mayor rendimiento para la obtención de ácido láctico con el sustrato de residuos de piña de 61,78% que, con el sustrato de residuos de banano de 25 g por cada 100 g de pulpa de sustrato, por esta razón el

⁷ Gomes AMP, Malcata FX. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci Technol. 1999;10(4-5):139-157.

⁸ Cordón Páez, Santiago., Pérez Martínez, Jorge A. (2016). *Ajuste de un modelo matemático de Streptococcus pyogenes* en el mejor de los 2 sustratos complejos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio. (Tesis de pregrado). Universidad de América, Bogotá.

⁹ CUELLAR OVIEDO, Juan Camilo. Evaluación de la Separación de Ácido Láctico obtenida a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticos. Trabajo de Grado Ingeniería Química. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. 2014. p. 132.

¹⁰ GUILLÉN, Laura., y VEGA J. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas comosus* Merr.) Y banano (*Musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado. Universidad de América. Bogotá. 2013.

sustrato de residuos de piña será el que se empleará en el presente proyecto de investigación.

En este estudio se utiliza desechos de piña (*Ananas comosus*) como sustrato, por su contenido de azúcares que pueden ser aprovechados por la bacteria *Lactobacillus acidophilus* como fuente de carbono para la producción de ácido láctico. Así mismo, se realiza la elaboración de las curvas de fermentación y su modelamiento mediante modelos cinéticos teóricos, los cuales servirán como soporte al debido ajuste del modelo para el sustrato y el microorganismo seleccionado, que es el propósito de este estudio

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Ajustar un modelo cinético para el consumo de sustrato de piña (*Ananas comosus*) en la fermentación por *Lactobacillus acidophilus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar experimentalmente la fermentación del sustrato de piña (*Ananas comosus*) por el microorganismo *Lactobacillus acidophilus*.
- Determinar el consumo de sustrato de piña (*Ananas comosus*) por parte del microorganismo *Lactobacillus acidophilus* mediante un método experimental.
- Seleccionar un modelo cinético que se ajuste al consumo del sustrato de piña (*Ananas comosus*) por parte del microorganismo *Lactobacillus acidophilus*.

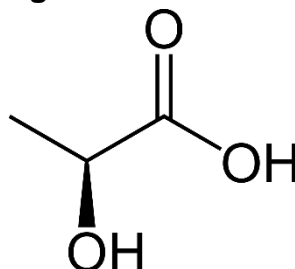
1. GENERALIDADES

1.1 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es un ácido hidroxí-carboxílico de gran importancia a nivel industrial, es utilizado para regular la acidez en alimentos como yogures, quesos, dulces, cárnicos, entre muchos otros. También es empleado en la industria farmacéutica y en la industria del plástico, en la industria química como solvente, agente limpiador y neutralizante, entre otras.¹¹

Su nombre químico es ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido α -hidroxipropiónico, se representa por la fórmula molecular $C_3H_6O_3$ y su estructura molecular se muestra en la Figura 1. La orientación del grupo hidroxilo permite la formación de los isómeros ópticamente activos, en la obtención de este ácido se producen dos isómeros ópticos el ácido L (+) y D (-) láctico (Figura 2) y una mezcla racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L (+) y D (-). El isómero L (+) se produce en el cuerpo humano, específicamente en los músculos por la descomposición del glucógeno cuando se realizan esfuerzos excesivos, el isómero D (-) y la forma racémica se consigue por fermentación de azúcares como la sacarosa y la lactosa.¹²

Figura 1. Estructura química del ácido láctico.



Fuente: GONZÁLEZ, Natalia y SERRANO, Raquel. Ácidos orgánicos como higienizantes del agua de bebida animal. {En línea}. 2 de julio de 2017. Disponible en: < <http://seleccionesavicolas.com/avicultura/2013/08/acidos-organicos-como-higienizantes-del-agua-de-bebida-animal> >.

El ácido láctico fue descubierto y aislado en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheeler en leche agria¹³. Fue el primer ácido orgánico producido comercialmente

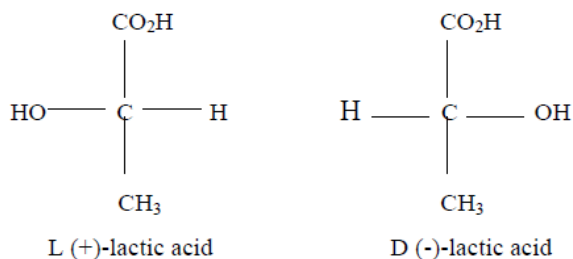
¹¹ GARCIA, Carlos A., ARRÁZOLA, Guillermo S., and DURANGO, Alba M. Producción de Ácido Láctico Por Vía Biotecnológica. En: Temas Agrarios, 2010, vol. 15, p. 9–26.

¹² SERNA, Liliana, y RODRIGUEZ Aida. Producción Biotecnológica de Acido Láctica: Estado Del Arte. En: Ciencia, Tecnología Y Alimentos. 2005, vol. 5. p. 54–65.

¹³ Data, Rathin, Shih-perng Tsai, Patrick Bonsignore, Seung-hyeon Moon, and James R Frank, 'And Lactic Acid Derivatives', 16 (1995), 221–31

por fermentación, cuya producción comenzó en 1881¹⁴. Está presente en muchos alimentos tanto naturalmente como como producto de la fermentación microbiana. También es un intermediario metabólico principal en la mayoría de los organismos vivos de procariontes anaerobios a los seres humanos¹⁵.

Figura 2. Isómeros ópticos del ácido láctico.



Fuente: KRISHNA, S. Production of polylactic acid (pla) from renewable feedstocks. {En línea}. 2 de julio de 2017. Disponible en: <<https://www.google.com/patents/EP1753869B1?cl=en>>

1.1.1 Características del ácido láctico. El ácido láctico se encuentra en forma líquida, es viscoso, incoloro e inodoro y es un ácido débil de baja volatilidad. Es soluble en todas las proporciones en el agua, alcohol y en el éter, insoluble en benceno y en cloroformo, posee una densidad de 1,249 g/mL y su punto de ebullición está entre 125-140°C. En la tabla 1 se encuentran algunas propiedades del ácido láctico. El ácido láctico que se obtiene por fermentación posee un color amarillento y tiene impurezas como ácidos orgánicos (acético, butírico, tartárico, cítrico), sales minerales azúcares glicerina etc.¹⁶

La presencia del grupo hidroxilo y carboxilo permite una variedad de reacciones como oxidación, reducción, condensación y sustitución, de la misma manera permite la posibilidad de formación de dímeros, trímeros y oligómeros ya que las moléculas se inter-esterifican. Un dímero se produce cuando dos moléculas de ácido láctico se inter-esterifican en ambas posiciones, dando lugar a un anillo heterocíclico de seis miembros. Es decir, el grupo hidroxilo de la molécula 'a' se esterifica con el grupo carboxílico de la molécula 'b' y el grupo hidroxilo de 'b' se esterifica con el grupo carboxílico de 'a'. La polimerización de apertura del anillo de lactada da como resultado polímeros de alto peso molecular de ácido poli-láctico (PLA). En la síntesis química para la producción de ácido láctico se obtiene la

¹⁴ RUTER, P. (1975). Molasses Utilization Food and Agricultural. Rome: Organization of The United Nations Press. (Citado por RASHID, 2008)

¹⁵ RASHID, Roslina, 'Optimization and Modeling of Lactic Acid Production from Pineapple Waste', 2008, 238

¹⁶ Orozco, M. Solarte, J., 'Búsqueda Del Mejor Medio De Cultivo Y Modelamiento Cinético Para La Obtención Del Ácido Láctico a Partir De Glucosa Por Vía Fermentativa', Tesis de Pregrado En Ingeniería Química, 32 (2003), 54-55.

mezcla racémica del ácido láctico mientras que las vías biotecnológicas se obtienen por lo general el isómero L (+).¹⁷

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico

Propiedad	Descripción/Valor
Formula	C ₃ H ₆ O ₃
Peso Molecular	90,08
Punto de fusión	L (+) y D (-): 52,8-54°C DL (según composición): 16,8-33°C
Punto de ebullición	125-140°C
Gravedad específica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40,33 mNsm ⁻²
Densidad	1,249

Fuente: SERNA, Liliana, y RODRIGUEZ Aida. Producción Biotecnológica de Acido Láctica: Estado Del Arte. En: Ciencia, Tecnología Y Alimentos. 2005, vol. 5. p. 54–65.

1.1.2 Aplicaciones. La importancia del ácido láctico radica en su variedad de usos en distintas industrias, algunas de sus principales aplicaciones se muestran a continuación.

1.1.2.1 Materia Prima para la producción de PLA. Uno de los más importantes usos radica en la síntesis de ácido poli láctico, polímero biodegradable que ha tenido alta demanda puesto que gracias a sus similares propiedades físicas y químicas a las de un polímero de naturaleza petrolera, lo han convertido en un competidor en la industria de los plásticos. Dos moléculas de ácido láctico pueden ser deshidratadas para formar lactina, una lactina cíclica. La polimerización de la lactina cíclica con catalizadores da como resultado polímeros como el PLA¹⁸ (figura 3).

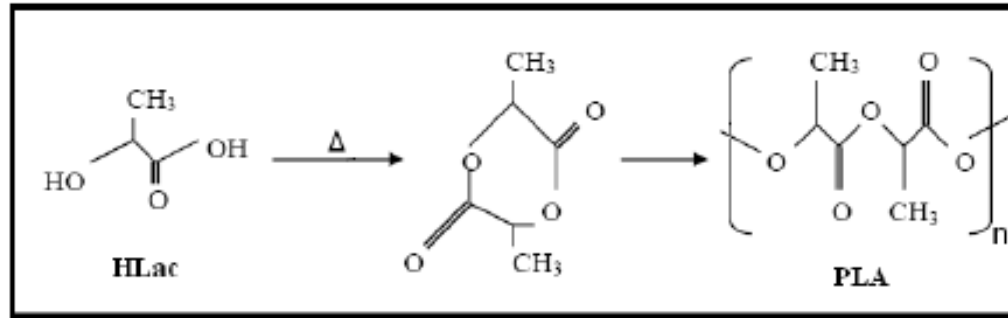
Una de las empresas más importantes productoras de ácido poli láctico es Nature Works la cual desarrolla este polímero para aplicaciones en plásticos, o embalaje, así como para resinas aplicadas en alimentos, desarrollo de textiles y fibras, entre otras.¹⁹

¹⁷ Miller, C., A. Fosmer, B. Rush, T. McMullin, D. Beacom, and P. Suominen, Industrial Production of Lactic Acid, Comprehensive Biotechnology, Second Edition, Second Edi (Elsevier B.V., 2011).

¹⁸ VINK, E., GLASSNER, D., KOLSTAD, J., WOOLEY, R., y CONNOR R. The eco-profiles for current and near-future NatureWorks ® polylactide (PLA) production. 2006:58-81.

¹⁹ JOHN, Rojan P., K. MADHAVAN, Nampootheri, and ASHOK, Pandey, 'Fermentative Production of Lactic Acid from Biomass: An Overview on Process Developments and Future Perspectives', Applied Microbiology and Biotechnology, 74 (2007), 524-34.

Figura 3. Síntesis de ácido poli láctico.



Fuente: MEHTA R, KUMAR V, BHUNIA H, UPADHYAY SN. Synthesis of poly (lactic acid): A review. J Macromol Sci - Polym Rev. 2005;45(4):325-349.

1.1.2.2 Aditivo en alimentos. Se usa como acidulante, regulando el pH de los alimentos procesados y como conservante, ya sea como antioxidante o para el control de microorganismos patógenos. Las sales neutralizadas del ácido láctico, también se usan como preservantes. Por ejemplo, el lactato de potasio se emplea en los productos cárnicos para controlar su vida útil, preservar el color y reducir el contenido de sodio, el lactato de sodio posee un sabor suave y mejora el sabor en productos que contienen carne, el lactato de sodio es popular para la fortificación y textura mejorada de los embutidos.²⁰

Para el control de microorganismos, el ácido láctico está presente en las cervezas de trigo, debido a la actividad de *pediococcus damnosus*, en carnes listas para el consumo se controla la bacteria *Listeria monocytogenes* se encuentran como lactato sódico o potásico. LA se utiliza ampliamente para reducir el número de bacterias patógenas como E. coli, Salmonella, Campylobacter y Listeria en cadáveres de animales como carne de res, cerdo y aves de corral durante el proceso de sacrificio. El ácido láctico se puede encontrar en productos de leche agria, tales como kumis, yogures y algunos quesos cottage.²¹

1.1.2.3 Aplicaciones en cosméticos. Los isómeros D-láctico y la forma racémica del ácido láctico no poseen aplicaciones en la industria cosmética sin embargo el isómero de la forma L si se emplea, ya que se encuentra en el cuerpo humano (por ejemplo, en la piel, cabello y músculos). Cada día el cuerpo humano produce cerca de 120 g de LA, LA también es parte del factor hidratante natural que retiene la humedad en la piel. Al ser un ingrediente natural y un constituyente natural del cuerpo humano el ácido láctico y los lactatos encajan perfectamente en la tendencia actual hacia formulaciones naturales y más seguras con su

²⁰ Ren J. Lactic Acid. Biodegrad poly (lactic acid) Synth Modif Process Appl. 2010:4-14.

²¹ *Ibíd.*, p.13.

multifuncionalidad (humectante, reguladora del pH y antimicrobiana) además de aplicaciones especiales como por ejemplo el aclaramiento de la piel.²²

1.1.2.4 Aplicaciones en detergentes. El ácido láctico ha adquirido importancia en la industria de los detergentes porque mezclado con otros químicos brinda varias aplicaciones mostradas a continuación²³.

El ácido láctico en solución puede perder un protón del grupo ácido, produciendo el ion lactato. Se utiliza como agente descalcificador y posee es capaz de eliminar carbonatos metálicos (incrustaciones). Los descalcificadores eliminan el calcio a través de una reacción química entre el ácido y metales alcalinos, produciendo una sal.²⁴ También se utiliza como removedor de espuma de jabón y agente antibacteriano.²⁵

1.2 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

La producción de ácido láctico (LA) ha adquirido alta importancia en los últimos años, desde que aumentó la producción de ácido poli láctico (PLA) utilizado como principal materia prima el ácido láctico, así como por sus diversos usos en las industrias de alimentos, farmacéutica, entre otras.

1.2.1 Demanda Mundial. La demanda mundial de ácido láctico en 2007 se estimó entre 130.000 y 150.000 toneladas al año²⁶, con precios comerciales de ácido láctico de calidad alimentaria que oscilaban entre 1,38 dólares/kg o 2583,36 COP/kg (50% de pureza) y 1,54 dólares/kg o 2882,88 COP/kg (88% de pureza).²⁷ Según estimaciones, la producción de ácido poli láctico aumentará en los próximos años, por consiguiente, debería aumentar la producción de ácido láctico como principal materia prima para la síntesis de PLA.

En el año 2015, Estados Unidos fue el principal consumidor de ácido láctico utilizado en la fabricación de PLA, industria de alimentos y bebidas. Los países Europa de Occidente y China fueron el segundo y tercer puesto respectivamente como se muestra en la gráfica 1. Europa de occidente aplicado especialmente a las industrias

²² *Ibíd.*, p. 13.

²³ DATTA, Rathin; TSAI, Shih-perng; BONSIGNORE, Patrick; MOON, Seung-hyeon and FRANK, James R. Technological and Economic Potential of Poly(Lactic Acid) and Lactic Acid Derivatives. En: FEMS Microbiology Reviews. 1995. Vol. 16. p. 221–31.

²⁴ BRACKEN J, GUST N, ROSS J, COUTTS A. An assessment of the efficacy of chemical descalers for managing non-indigenous marine species within vessel internal seawater systems and niche areas. *Manag Biol Invasions*. 2016; 7(3): 241-256.

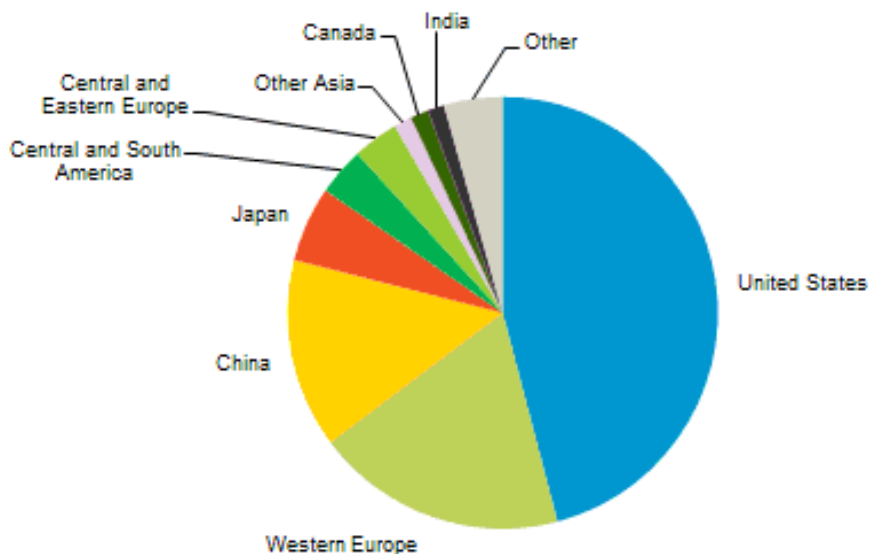
²⁵ Ren, Jie, 'Lactic Acid', *Biodegradable Poly (Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications*, 2010, 4–14.

²⁶ Wee, Young-jung, Jin-nam Kim, and Hwa-won Ryu, 'Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications', *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2006), 163–72.

²⁷ ICIS Chemical Business [en línea], 15 de septiembre de 2017. Disponible en Internet: <https://www.icis.com/chemicals/channel-info-chemicals-a-z/>

de alimentos y bebidas y en una proporción menor a la síntesis de PLA ya que dependen de las importaciones de materia prima para satisfacer la demanda que según IHS Markit.²⁸

Gráfica 1. Consumo Mundial de Ácido Láctico en el 2015.



Fuente: IHS Markit, [en línea], 20 de septiembre, 2017 Disponible en: <https://www.ihs.com/products/lactic-acid-its-salts-chemical-economics-handbook.html>

En Asia, China aplica el ácido láctico y sus sales en la industria de alimentos y bebidas como acidulante y preservante respectivamente. Además, China es un exportador importante de ácido láctico. Países como Japón dependen de las importaciones desde China, para aplicaciones en alimentos, farmacéuticas y cuidado personal. Se espera que el mercado global del ácido láctico crezca 6% cada año desde el 2015 al 2020.²⁹

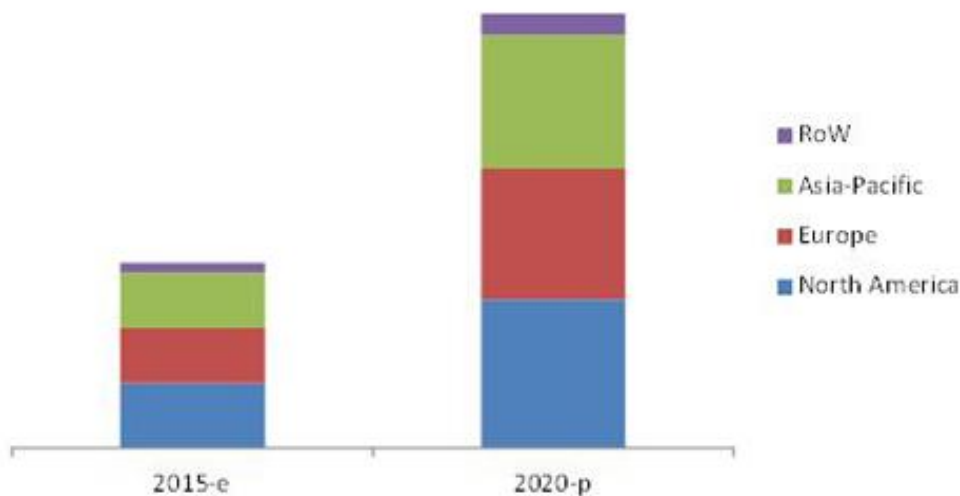
Asimismo, un reporte realizado de Markets and Markets analizó la proyección del mercado del ácido láctico en el 2020 (gráfica 2), el reporte indica movimientos de USD 1.628 billones por la Región de Norte América, y seguido por Europa. No obstante, la proyección para el año 2020 se proyecta a USD 3,82 billones con alta demanda en la región Asia-Pacífico.³⁰

²⁸ IHS Markit, [en línea], 20 de septiembre, 2017 Disponible en: <https://www.ihs.com/products/lactic-acid-its-salts-chemical-economics-handbook.html>

²⁹ IHS Markit, [en línea], 20 de septiembre, 2017 Disponible en: <https://www.ihs.com/products/lactic-acid-its-salts-chemical-economics-handbook.html>

³⁰ Markets and Markts, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/polylacticacid-387.html>

Gráfica 2. Mercado de Ácido Láctico, Por regiones, 2015-2020 (USD Millones)



E - Estimated, P - Projected

Fuente: Markets and Markets Analysis. Disponible en: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/polylacticacid-387.html>

1.2.2. Importación y Exportación Mundial. La base de datos estadísticos sobre el comercio de Commodities de las Naciones Unidas, reporta las importaciones y exportaciones de ácido láctico realizadas por los países cada año, el país que lidera la exportación de LA es China y en importación se encuentra Holanda. Se resalta una exportación total de China al mundo de 43'200.285 kg en el año 2014, con un valor comercial de US\$ 53'801.420, comparado con la importación de 8'133.754 kg³¹. Por otro lado, Holanda en ese mismo año importó 103'613.636 kg de otros países equivalente a US\$145'212.164 por encima de otros países como Estados Unidos, Japón y Brasil.

En Latinoamérica se encuentran pequeños exportadores e importadores a nivel mundial, entre 2013 y 2016 en este grupo se destaca Brasil como exportador de aproximadamente 15'000.000 kg anual e importador de 3'000.000 kg anual con un valor comercial de US\$23'930.020 en el 2014, seguido de México el cual en el 2016 importó 7'135.431 kg y en menores proporciones Argentina, Colombia y Chile.³²

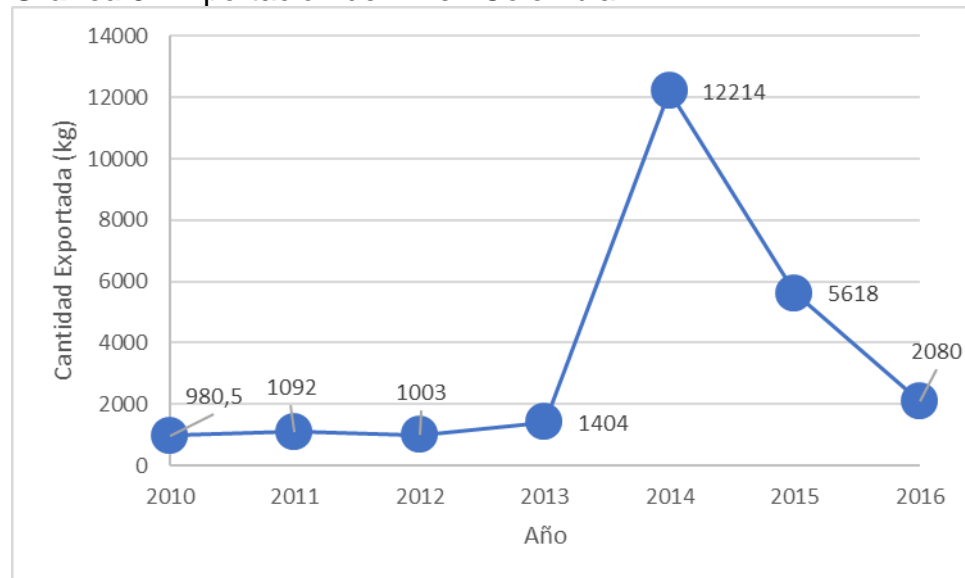
1.2.3 Demanda Nacional. Según los datos obtenidos en el banco de datos de comercio exterior BACEX del Ministerio de Industria y Comercio, Colombia importa y exporta cantidades muy pequeñas de este ácido, en el inicio del 2016 se registró una exportación total de 2.080 kg, la gráfica 3 muestra la cantidad exportada los

³¹ COMTRADE, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <https://comtrade.un.org/db/dqBasicQueryResults.aspx?px=H1&cc=291811&r=156&y=2014>

³² COMTRADE, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <https://comtrade.un.org/db/mr/daCommoditiesResults.aspx?px=H1&cc=291811>

últimos años, se observa que la mayor cantidad exportada en este tiempo fue de 12.214 kg en el 2014 y se exportaron cantidades aproximadamente constantes entre el 2010 y 2013. Las exportaciones están a cargo de empresas como Protecnic Ingeniería SA, Productos Familia SA, Unilever, entre otras y la mayor cantidad se exporta a Ecuador.³³

Gráfica 3. Exportación de LA en Colombia.



Fuente: COMTRADE, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <https://comtrade.un.org/db/dqBasicQueryResults.aspx?px=H1&cc=291811&r=156&y=2014>

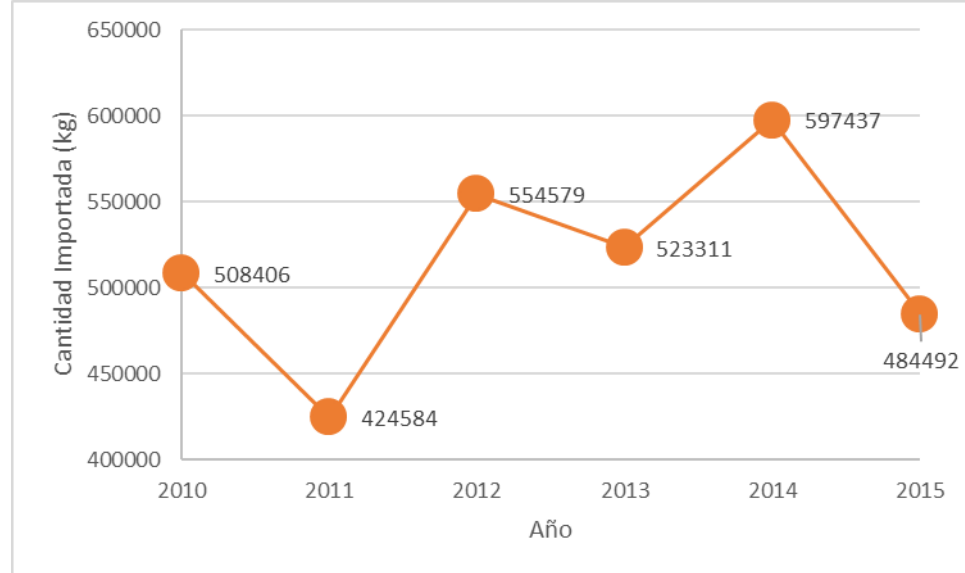
Las importaciones en Colombia son requeridas en cantidades mayores a las exportadas (grafica 4) y se realiza de empresas como Corbion y Galactic a empresas como Colgate y Palmolive³⁴.

Se puede concluir que en un panorama mundial que Colombia exporta e importa muy poca cantidad de este producto, que cada vez está adquiriendo más fuerza en el mercado, por esta razón es necesario impulsar la producción de este producto que posee cada vez más un aumento en la demanda.

³³ Ministerio de industria y comercio, 21 de septiembre 2017 – BACEX.

³⁴ Torres, D., Del Valle, G., Mora, S., y Henao, J. Producción de ácido láctico, Universidad nacional de Colombia – sede Bogotá. Agosto 2016; <https://www.slideshare.net/mariaguzman75/trabajo-final-de-produccion-de-acido-lactico>

Gráfica 4. Importación de LA en Colombia.



Fuente: COMTRADE, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <https://comtrade.un.org/db/dqBasicQueryResults.aspx?px=H1&cc=291811&r=156&y=2014>

1.3 TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN

El ácido láctico puede obtenerse por síntesis química o por vía biotecnológica mediante carbohidratos que puedan ser fermentados por microorganismos. El 90% de la producción de ácido láctico en el mundo se realiza por vía biotecnológica.³⁵ La producción química y fermentativa se explica a continuación.

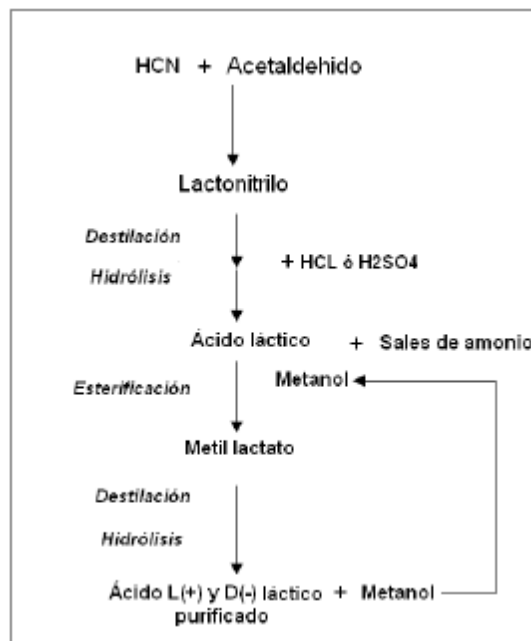
1.3.1 Síntesis Química. Consiste en hacer reaccionar acetaldehído con ácido cianhídrico catalizada para producir lacto nitrilo, ocurre a presión atmosférica como se muestra en la figura 4.

El lactonitrilo es purificado y obtenido por destilación para luego hidrolizarlo con ácido sulfúrico produciendo el ácido láctico crudo y sales de amonio. El ácido láctico crudo se hace reaccionar con metanol produciendo lactato de metilo, el cual es purificado y obtenido por destilación y luego hidrolizado con agua bajo un catalizador ácido para producir ácido láctico³⁶.

³⁵ HOFVENDAHL, Karin, and HAHN-Hägerdal, Bärbel. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable resources. En: *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, vol. 67. p. 87–107.

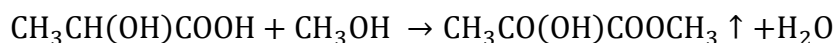
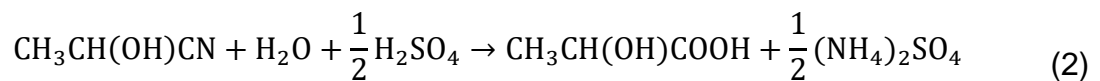
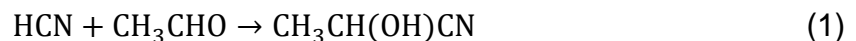
³⁶ Data, Rathin, Shih-perng Tsai, Patrick Bonsignore, Seung-hyeon Moon, and James R Frank, 'Technological and economic potential of poly(lactc acid) And Lactic Acid Derivatives', 16 (1995), 221–231

Figura 4. Esquema tecnológico de producción de LA por síntesis química.



Fuente: Adaptado por RASHID, Roslina. Optimization and modelling of lactic acid production from pineapple waste. Reporte final. Malasia. Universidad tecnológica de malasia. 2008. De datta y tsai.

La secuencia de reacciones se muestra de la siguiente manera:



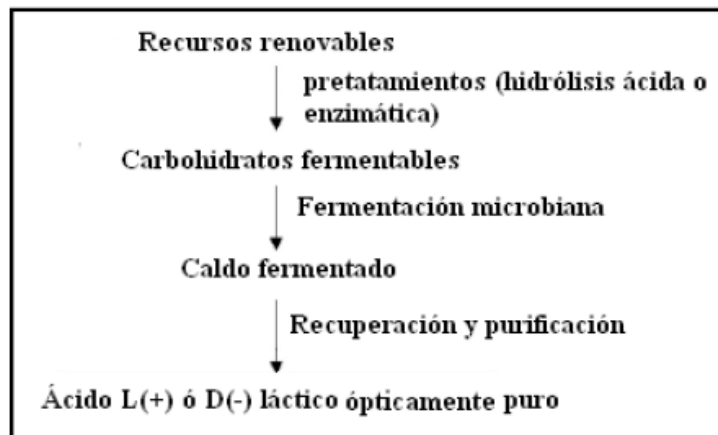
La síntesis química únicamente produce la mezcla racémica DL del ácido láctico³⁷, esto limita mucho la producción por esta ruta puesto que la demanda de ácido láctico está enfocada en obtener la forma D- o L- de ácido para aplicaciones en la industria de los plásticos.

1.3.2 Fermentación microbiana. Consiste en la degradación de sustratos (fuentes de carbono, glucosa) mediante microorganismos (biomasa) para producir

³⁷ *Ibíd.*, p 224.

metabolitos como productos de interés industrial, la figura 5 muestra el esquema tecnológico de producción por fermentación. Dependiendo el microorganismo es posible obtener los estereoisómeros D-ácido láctico, L-ácido láctico o a su mezcla racémica DL-ácido láctico.³⁸

Figura 5. Esquema tecnológico de producción de LA por fermentación.



Fuente: Wee, Young-jung, Jin-nam Kim, and Hwa-won Ryu, 'Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications', *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2006), 163–72.

Se conocen dos grupos de microorganismos capaces de producir ácido láctico, las bacterias ácido-lácticas (BLA) y los hongos. Los hongos no son muy utilizados porque requieren aireación, producen bajos rendimientos y formación de productos secundarios.³⁹

1.4 FACTORES DE OPERACIÓN DE LA FERMENTACIÓN

La fermentación del ácido láctico se ha venido estudiando, empleando diferentes fuentes renovables, tipos de microorganismos y condiciones de operación de la fermentación tales como pH, temperatura, tamaño del inóculo, fuentes de carbono y de nitrógeno. En este proceso las condiciones varían dependiendo de la cepa bacteriana a emplear, en este caso bacterias ácido lácticas, ya que las condiciones del cultivo varían respecto a su temperatura de crecimiento óptima, su pH óptimo y sus requerimientos nutricionales para la selección del sustrato. Con el propósito de obtener una producción eficiente y altos rendimientos. Varios parámetros y condiciones de funcionamiento afectan la producción óptima de ácido láctico que incluyen:

³⁸ Wee, Young-jung, Jin-nam Kim, and Hwa-won Ryu, 'Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications', *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2006), 163–172

³⁹ *Ibíd.*, p 164.

1.4.1 Cepa Bacteriana. La selección de la cepa bacteriana se realiza con base a la que brinde mayores rendimientos y productividades, pero aún más importante que sea de fácil adquisición y su capacidad de degradar varios sustratos para la producción de ácido láctico. Se ha analizado el género *Lactobacillus* en varias investigaciones, algunas especies utilizadas son *Lb. Delcrueckii* por John et al⁴⁰, *Lb. casei* por Hujanen et al⁴¹ y Rojan et al⁴², *Lb. amylophilus* por Naveena et al⁴³, entre otros. El 90% de la información acerca de la producción de ácido láctico está enfocada al microorganismo a usar, las más utilizadas pertenecen al género *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*.⁴⁴

1.4.2 Fuente de carbono. Las principales fuentes de carbono que se han estudiado y que pueden ser aprovechadas por las bacterias ácido lácticas son los monosacáridos como glucosa, fructosa, lactosa y otros azúcares como la sacarosa, xilosa, manosa, galactosa, azúcares presentes en fuentes renovables como desechos agroindustriales, residuos de frutas, materiales lignocelulósicos, entre otros. Las fuentes de carbono que proporcionan mayores concentraciones de LA son la glucosa, maltosa y fructosa.

Por otra parte, la concentración del sustrato es irrelevante para el rendimiento y la productividad.⁴⁵

1.4.3 Fuentes de nitrógeno. Las bacterias ácido lácticas necesitan sustratos no solo ricos en fuentes de carbono si no también ricos en fuentes de nitrógeno como nutrientes o vitaminas, por ejemplo, peptona o extracto de levadura. Las fuentes de nitrógeno generalmente ayudan al microorganismo positivamente para obtener mayores rendimientos. Se desarrolló un medio por Man, Rogosa y Sharpe⁴⁶ el cual contiene algunos nutrientes que evidencia el buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas, el medio MRS contiene peptona, extracto de levadura

⁴⁰ John, Rojan P., K. Madhavan Nampoothiri, and Ashok Pandey. Solid-State Fermentation for L-Lactic Acid Production from Agro Wastes Using *Lactobacillus Delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41 (2006). 759–63.

⁴¹ Hujanen, M., S. Linko, Y. Y. Linko, and M. Leisola, 'Optimisation of Media and Cultivation Conditions for L(+)(S)-Lactic Acid Production by *Lactobacillus Casei* NRRL B-441', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (2001), 126–30.

⁴² Rojan, Pappy John, Kesavan Madhavan Nampoothiri, Athira Syamaprasad Nair, and Ashok Pandey, 'L(+)-Lactic Acid Production Using *Lactobacillus Casei* in Solid-State Fermentation', *Biotechnology Letters*, 27 (2005), 1685–88.

⁴³ Naveena, B. J., Md Altaf, K. Bhadriah, and G. Reddy, 'Selection of Medium Components by Plackett-Burman Design for Production of L(+) Lactic Acid by *Lactobacillus Amylophilus* GV6 in SSF Using Wheat Bran', *Bioresource Technology*, 96 (2005), 485–90.

⁴⁴ John, Rojan P., K. Madhavan Nampoothiri, and Ashok Pandey, 'Fermentative Production of Lactic Acid from Biomass: An Overview on Process Developments and Future Perspectives', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (2007), 524–34.

⁴⁵ Hofvendahl K. Fermentation of wheat starch hydrolysate by *Lactococcus lactis*: factors affecting product formation. Lund, Sweden: Lund University, 1998. PhD Thesis.

⁴⁶ Handbook of Culture Media for Food Microbiology, J.E.L. Corry et al. (Eds.)

y de carne. Las bacterias ácido lácticas demandan nutrientes complejos, lo cual limita la capacidad de biosíntesis.

1.4.4 pH. El pH depende del microorganismo a utilizar y durante una fermentación tiende a disminuir debido a la producción de ácido. El efecto del pH ha sido estudiado en varias investigaciones con valores entre 4,0 y 7,0. Por ejemplo Mercier et al⁴⁷ utilizaron *Lactobacillus amylophilus* para la producción de LA a un pH de 5,4, Ye y Jin y Shimizu⁴⁸ usaron *Lactobacillus delbrueckii* a un pH de 4,2, Gonçalves et al⁴⁹ emplearon *Lactobacillus rhamnosus* a un pH de 6,3 y 7,5, Juárez et al⁵⁰ utiliza *Lactobacillus acidophilus* a un pH de 5,0.

En el presente trabajo se investigó el pH óptimo de acuerdo con la bacteria empleada y se discute en secciones posteriores.

1.4.5 Temperatura. La influencia de la temperatura en la producción de ácido láctico es muy importante y se debe llevar a cabo a temperaturas relativamente altas, se ha encontrado en varios estudios que las temperaturas entre 35°C y 45°C son las más utilizadas para las bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas se clasifican según la temperatura por ser mesófilas y termófilas.⁵¹

1.4.6 Duración de la fermentación. El periodo de fermentación depende del tiempo en el que la bacteria logra multiplicarse y generar el metabolito, generalmente de 1 a 6 días. Luedeking y Piret⁵² y Rooj, Kimura y Buddington⁵³ realizaron una fermentación con un tiempo de incubación de 80 h utilizando *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus acidophilus* respectivamente para la producción de LA, Karbasi, Saeed y Mousavi⁵⁴ reportan un tiempo de 50 horas

⁴⁷ Mercier P, Yerushalmi L, Rouleau D, Dochain D. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. J Chem Technol Biotechnol 1992;55:111–21.

⁴⁸ Ye K, Jin S, Shimizu K. Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. J Ferment Bioeng 1996; 81:240–6.

⁴⁹ Gonçalves LMD, Barreto MTO, Xavier AMBR, Carrondo MJT, Klein J. Inert supports for lactic acid fermentation—a technological assessment. Appl Microbiol Biotechnol 1992; 38:305–11.

⁵⁰ Tomás, María Silvina Juárez, Virginia S. Ocaña, Birgitt Wiese, and María E. Nader-Macías, 'Growth and Lactic Acid Production by Vaginal *Lactobacillus Acidophilus* CRL 1259, and Inhibition of Uropathogenic *Escherichia Coli*', Journal of Medical Microbiology, 52 (2003), 1117–24.

⁵¹ Parra Huertas RA. Review. Bacterias Ácido-Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. Rev la Fac Ciencias Agropecu. 2010;8(1):93-105.

⁵² Luedeking R, Piret EL. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. J Biochem Microbiol Technol Eng. 1959;1(4):393-412.

⁵³ Rooj AK, Kimura Y, Buddington RK. Metabolites produced by probiotic *Lactobacilli* rapidly increase glucose uptake by Caco-2 cells. BMC Microbiol. 2010; 10:16.

⁵⁴ Karbasi M, Yarmand MS, Mousavi M. Fermentation Potential of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* in Date Syrup to Develop a Functional Fermented Beverage: A Comparative Study. J Food Process Preserv. 2015;39(6):863-870.

utilizando *Lactobacillus acidophilus*, en el trabajo de grado por Guillén y Vega⁵⁵ reportan un tiempo de fermentación de 180 h utilizando *Lactobacillus acidophilus*.

1.4.7 Tipo de fermentación. El ácido láctico se produce comúnmente por lotes ya que se obtienen rendimientos en el rango de 85-90%, dependiendo el sustrato y bacteria empleado. Sin embargo, existen varios ejemplos de fermentaciones continuas, pero con menores rendimientos. Esto se debe principalmente a que todo el sustrato se utiliza en el modo por lotes, mientras que una concentración residual permanece en el continuo.⁵⁶

1.5 BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (LAB)

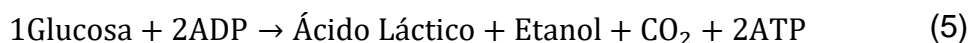
Las bacterias de ácido láctico (LAB) son un grupo de bacterias microaerófilas, Grampositivas, no forman esporas y excretan el ácido láctico como principal producto de fermentación (homofermentativas) en el medio si se suministran con hidratos de carbono adecuados. Las bacterias productoras de ácido láctico pertenecen a géneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*.⁵⁷

Existen dos vías de fermentación para estas bacterias ácido lácticas, homofermentativa y heterofermentativa.

- La vía homofermentativa produce solamente como producto final al ácido láctico y se da por la ruta metabólica de la glucólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas) (figura 6), la glucosa se transforma en ácido pirúvico, y luego esto se reduce a ácido láctico por el poder reductor previamente producido en forma de NADH⁵⁸, y la reacción se muestra a continuación:



- La vía heterofermentativa produce además de ácido láctico otros productos como etanol, acetato y CO₂ por la ruta de las pentosas fosfato⁵⁹ y la reacción se muestra a continuación:



⁵⁵ GUILLÉN, Laura., y VEGA J. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (ananas comosus merr.) Y banano (musa sapientum) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. 2013.

⁵⁶ HOFVENDAHL, Karin, and HAHN-Hägerdal, Bärbel. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable resources. En: Enzyme and Microbial Technology, 2000, vol. 67. p. 87-107.

⁵⁷ Heping Zhang and Yimin Cai (eds.), Lactic Acid Bacteria, 2014, Fundamentals and Practice.

⁵⁸ CASTILLO, Fabian. Lactic acid properties, applications and productions: A review. En: Trends in food science & technology. Vol. 30. Pag, 70-83. 2003.

⁵⁹ *Ibid.*, p 74.

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas al no poseer piruvato-d Descarboxilasa, transfieren el hidrogeno formado por acción de la fosfotriosa-deshidrogenasa a ácido pirúvico y con ayuda de la nicotinamida-adenina-dinucleotido (NAD) lo transforman en ácido láctico. Las especies heterofermentativas metabolizan hexosas a través de la ruta de las pentosas fosfato. Estas especies usan la fosfoacetolasa dependiendo de la vía para el metabolismo del azúcar y además de ácido láctico, producen cantidades significantes de ácido acético o etanol y dióxido de carbono.⁶⁰

1.5.1 Bacteria *Lactobacillus acidophilus*. Son bacterias microaerófilas; es decir requieren niveles de oxígeno inferiores a los que se encuentran en la atmosfera o anaerobias, ácido tolerantes y estrictamente homofermentativas. Poseen un tamaño de partícula de 0,6 a 0-9 micrómetros de ancho y 1,5 a 6,0 micrómetros de largo.⁶¹

La glucosa es principalmente fermentada a ácido láctico en el caso homofermentativo, pero es capaz de fermentar fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, manosa, sacarosa, entre otras. Kulp y Rettger⁶² encontraron que la maltosa, sacarosa y levulosa fueron fermentados por *L. acidophilus*, esto mismo lo afirmaron Sherman y Hodge⁶³. Asimismo, en el artículo *Lactocacilus acidophilus: Utilization of sugars and production of a fermented soybean product*, Stern et al⁶⁴ afirmó que la bacteria *Lactobacillus acidophilus* es capaz de fermentar glucosa y sacarosa.

El género *Lactobacillus* posee requerimientos de crecimiento complejos. Requieren baja tensión de oxígeno, hidratos de carbono fermentables, proteínas, un número de vitaminas del complejo B, derivados del ácido nucleico, ácidos grasos libres insaturados y minerales como magnesio, manganeso y hierro para su crecimiento. La peptona y la tripsina estimulan su producción de ácido. Estos nutrientes esenciales deberían, por lo tanto, ser disponible en el medio para el crecimiento. La bacteria crece en un rango de pH de 5.0 a 6.0 y de 35°C a 40°C⁶⁵. En un estudio sobre el efecto de la temperatura y el pH en un cultivo con *L. acidophilus* Wang,

⁶⁰ Parra Huertas RA. Review. Bacterias Ácido-Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. Rev la Fac Ciencias Agropecu. 2010;8(1):93-105.

⁶¹ CASTILLO. Op. cit., p.74.

⁶² KULP, W & RETTGER, M. A comparative study of lactobacillus acidophilus and lactobacillus bulgaricus, citado por WHEATER DM. The Characteristics of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. J Gen Microbiol. 1955;12(1):123-132.

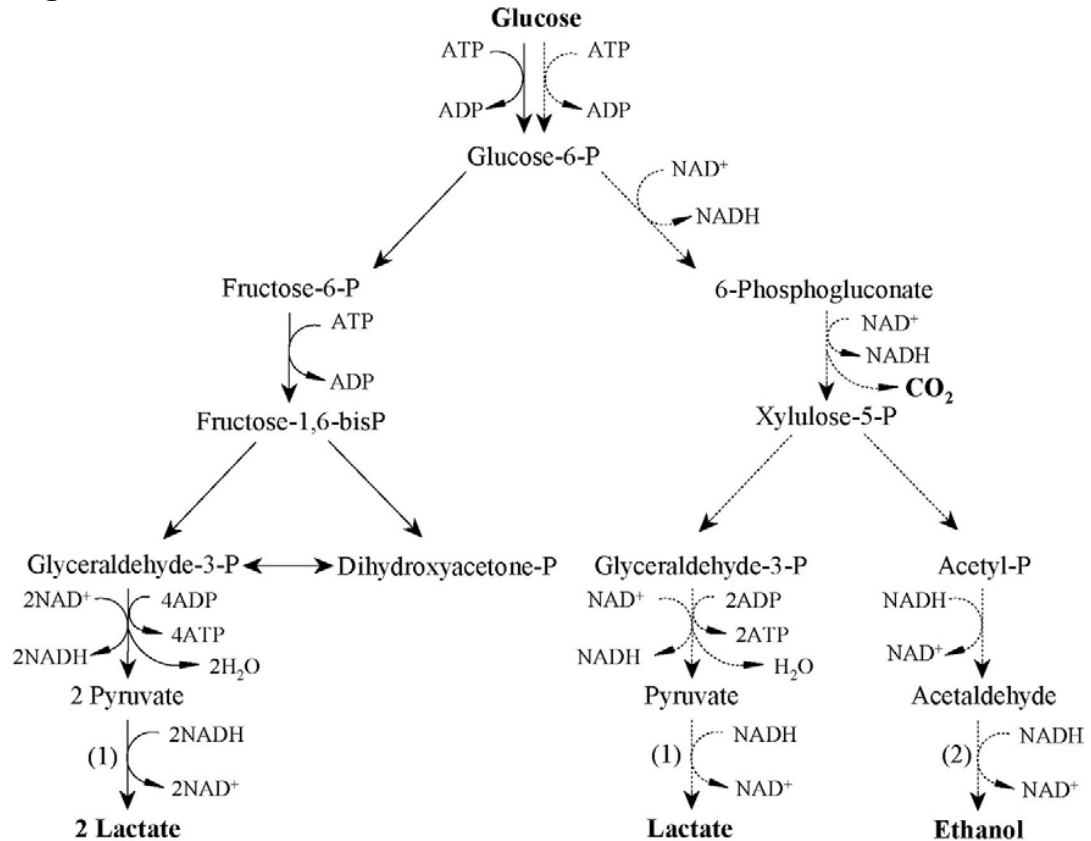
⁶³ SHERMAN, J. M. & HODGE, H. M. The value of certain tests in the differentiation of Lactobacillus bulgaricus from Lactobacillus acidophilus, citado por WHEATER DM. The Characteristics of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. J Gen Microbiol. 1955;12(1):123-132.

⁶⁴ STERN, N., HESSELTINE, C., WANG, H., & KONISHI, F. Lactobacillus acidophilus: Utilization of sugars and production of a fermented soybean product. Journal, Brazilian. 2011;42(21):330-339.

⁶⁵ Gomes AMP, Malcata FX. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci Technol. 1999;10(4-5):139-157.

Corrieu y Béal, concluyeron que las condiciones óptimas de crecimiento de temperatura y pH son 37°C y 6.0 respectivamente⁶⁶.

Figura 6. Rutas metabólicas de las bacterias ácido-lácticas.



Fuente: Y.-J. WEE et al: Biotechnological Production of Lactic Acid, Food Technol. Biotechnol. 44 (2) 163–172 (2006).

1.6 SUSTRATO

Una amplia variedad de fuentes de carbohidratos, p. melaza, jarabe de maíz, suero, dextrosa y caña o remolacha, se pueden utilizar. El uso de una materia prima específica de carbohidratos depende del precio, disponibilidad, suficiente contenido de azúcares. El tipo de microorganismo a seleccionar depende del hidrato de carbono que se fermentará.⁶⁷

⁶⁶ Wang Y, Corrieu G, Béal C. Fermentation pH and Temperature Influence the Cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *J Dairy Sci.* 2005;88(1):21-29.

⁶⁷ SERNA, Liliana, y RODRIGUEZ Aida. Producción Biotecnológica de Ácido Láctico: Estado Del Arte. En: *Ciencia, Tecnología Y Alimentos.* 2005, vol. 5. p. 54–65.

1.6.1 Piña como sustrato. La piña (*Ananas Comosus Merr*) de la variedad “perolera” es una de las piñas más cultivada en Colombia⁶⁸, se cultiva en el departamento de Santander, Valle, Risaralda y Cauca. Se caracteriza por pesar entre 1,5 y 3 kg, posee un color amarillo-naranja y es de forma cilíndrica irregular.⁶⁹

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción de piña en Colombia en el año 2014 fue de 652.759 toneladas⁷⁰, Santander y Valle del Cauca son los principales departamentos productores de piña, entre 2006 y 2010 produjeron más de 125.000 y 50.000 toneladas respectivamente, seguido por Risaralda y Meta, cuyas producciones están entre las 15.000 y 20.000 toneladas al año⁷¹.

1.6.1.1 Composición nutricional del fruto de piña. La composición de la fruta depende directamente del sitio en el que se cultiva y las condiciones de humedad, temperatura, altura del sitio y de la maduración de la fruta. Por ejemplo, un estudio realizado por Barrera⁷² muestra la composición del fruto de piña nativa la cual posee más del 80% en base seca de hidratos de carbono, asimismo posee calcio, potasio, fósforo, hierro en cantidades pequeñas, un contenido de agua entre 85 y 88% pero contiene bajo contenido en proteína de 0,78 a 3,20%. La acidez total tiende a reducirse durante la maduración de la piña y se encuentra en un rango de pH entre 2,5 a 4,5.

Es posible aprovechar la piña (*Ananas comosus*) como sustrato, por su contenido de azúcares que pueden ser aprovechados por la bacteria *Lactobacillus acidophilus* como fuente de carbono para la producción de ácido láctico.

1.6.1.2 Residuo de piña. Los residuos de piña generados en el mundo son aproximadamente de 1,600,000 toneladas al año, los cuales son 50% desechos líquidos y 50% desechos sólidos⁷³. En Colombia, por ejemplo, algunas empresas

⁶⁸ Neira G, Ana María, Antonio María Martínez R, and Javier Orlando Orduz R, ‘Análisis Del Mercado de Piña Gold Y Perolera En Dos Principales Centrales Mayoristas de Colombia’, Economía Y Desarrollo Rural, 17 (2016), 149–65

⁶⁹ CASTRO, L., ECHEVERRI, G., SALAZAR, R., Y PINON, A. 1993. Efecto de la temperatura en el almacenamiento de dos variedades de piña, cayena lisa y manzana. En: *Memorias primer simposio latinoamericano de piñicultura*. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

⁷⁰ FAOSTAT. (2014). Bases de datos de producción y comercio agrícola mundial. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

⁷¹ Neira G, Ana María, Antonio María Martínez R, and Javier Orlando Orduz R, ‘Análisis Del Mercado de Piña Gold Y Perolera En Dos Principales Centrales Mayoristas de Colombia’, Economía Y Desarrollo Rural, 17 (2016), 149–65

⁷² BARRERA, J.A., HERNÁNDEZ, M., PÁEZ, D., OVIEDO, E. y ROMERO, H. 2004. Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia Colombiana. Universidad de la Amazonía. Florencia- Caquetá. Promedios. p. 64.

⁷³ Sasaki, K., Noparatnaraphorn, N. and Nagai, S. (1991). Use of Photosynthetic Bacteria for the Production of SCP and Chemicals from Agro Industrial Waste. Bioconversion of Waste Material to Industrial Product. Ed. Martin, A. M., J. of Elsevier App. Science. 225-233.

agroindustriales en Medellín y el sur del Valle de Aburrá generaban 136 y 27 ton/día respectivamente de residuos de frutas según una empresa de aseo recolectora. Además, en el año 2002 sólo en Medellín existían aproximadamente 212 ton/día de residuos de frutas que recogía Empresas Varias de Medellín⁷⁴. Esto puede llegar a convertirse en un gran problema por mala disposición generando contaminación y un daño ambiental.

La composición de un desecho líquido de piña se muestra en la tabla 2 se observa en mayor cantidad la sacarosa, seguido de la glucosa y la fructosa. El desecho de piña también posee pequeñas cantidades de nitrógeno y trazas de elementos como magnesio, manganeso, sodio y potasio, que pueden ser aprovechados por la bacteria con el fin de contribuir con el crecimiento bacteriano⁷⁵.

Tabla 2. Composición del desecho de piña.

Desecho de Piña	Líquido Disuelto	Antes de esterilizar	Después de esterilizar
Oxígeno (g/L)		100.8	103.7
Azúcares reductores (g/L)		39.2	41.2
Azúcares totales (g/L)		100.0	100.9
Sacarosa (g/L)		40.1	40.1
Fructosa (g/L)		14.0	15.6
Glucosa (g/L)		23.6	23.6
Proteína (g/L)		0,9	-

Fuente: Sasaki, K., Noparatnaphorn, N. and Nagai, S. (1991). Bioconversion of Waste Material to Industrial Product. Ed. Martin, A. M., J. of Elviesier App. Science. 225-233.

En la tabla 2 se observa que el principal carbohidrato es la sacarosa, sin embargo, las bacterias primero buscan degradar los sacáridos simples (glucosa y fructosa) ya que son de fácil rompimiento y luego que estos se agoten en su totalidad, buscará degradar los azúcares más complejos⁷⁶. Dicho esto, la bacteria consumiría primero la glucosa, fructosa y por último la sacarosa.

⁷⁴ YEPES, Sandra., MONTOYA, Lina., y OROZCO, Fernando. Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del valle del aburrá, Colombia. En: Fac. Nal. Agr. Medellin. 2008, vol. 61, no. 1. P. 4422-4431.

⁷⁵ Rashid, Roslina, 'Optimization and Modeling of Lactic Acid Production from Pineapple Waste', 2008, 238

⁷⁶ Shuler ML, Kargi F. Bioprocess engineering: Basic concepts. J Control Release. 2002:293.

1.7 MODELOS CINÉTICOS

Los modelos cinéticos describen cuantitativamente el comportamiento de un biosistema (biomasa, sustrato y metabolito). Además, se usa como herramienta en el análisis, diseño y control de operación de un fermentador. Los modelos cinéticos se clasifican en dos tipos: los modelos estructurados consideran las rutas metabólicas intracelulares y los modelos no estructurados consideran al microorganismo como un único componente, la biomasa que es descrita por una variable. Para muchos casos los modelos no estructurados han sido suficientes para describir de manera adecuada fermentaciones.⁷⁷

Además, los modelos no estructurados brindan una muy buena aproximación del comportamiento del microorganismo sin una complejidad abrumadora, por lo que su aplicación es recomendable para etapas iniciales de una investigación donde se desee indagar el modelamiento de los procesos realizados por microorganismos. Así mismo, se debe tener en cuenta que al aplicar modelos estructurados es necesario tener evidencia empírica, lo que representa mayor tiempo y mayor número de experimentos.⁷⁸

1.7.1 Suposiciones para construir modelos no estructurados. Se hace necesario la formulación de suposiciones puesto que los sistemas biológicos son de predicción compleja en comportamiento⁷⁹, con el propósito que obtener modelos simples se supone lo siguiente:

- Se debe considerar a la población de microorganismos como un único componente.
- La masa de la población celular está distribuida uniformemente en el cultivo asumiendo que es un cultivo homogéneo.
- No se presenta muerte celular
- No se presenta fase de adaptación

La tabla 3 muestra las diferencias de los diferentes tipos de modelos.

⁷⁷ Suarez, Diego Andres, 'Evaluación Y Simulación de La Producción de Ácido Láctico Con Lactobacillus Casei ATCC 7469', 2007, 117

⁷⁸ MÉNDEZ, Daniel, 'MODELAMIENTO MATEMÁTICO Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EMPLEANDO LA BACTERIA Burkholderia Cepacia B27 A PARTIR DE ÁCIDOS GRASOS.', 2016

⁷⁹ Villadsen J, Nielsen J, Lidén G. Bioreaction Engineering Principles. 3rd ed.; 2011.

Tabla 3. Diferencias de los diferentes tipos de modelos cinéticos

Según la población	Segundo los componentes celulares	
	No estructurado	Estructurado
No segregado	La biomasa es representada como un único componente, el cual está distribuido uniformemente en el cultivo.	Múltiples componentes celulares distribuidos uniformemente en el cultivo, toma en cuenta los componentes intracelulares.
Segregado	Los microorganismos son representados por un único componente, pero esta forma una mezcla heterogénea.	Microorganismos compuestos por diferentes componentes, los cuales forman una mezcla heterogénea.

Fuente: MÉNDEZ, Daniel, 'MODELAMIENTO MATEMÁTICO Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EMPLEANDO LA BACTERIA *Burkholderia Cepacia* B27 A PARTIR DE ÁCIDOS GRASOS.', 2016

1.7.2 Estimación de parámetros cinéticos. Los modelos cinéticos cuentan con varios parámetros, y su estimación debe ser determinada a partir de datos experimentales. La determinación de estos parámetros se puede realizar por regresión. Los modelos pueden ser resueltos por métodos integrales o métodos diferenciales. El método integral está marcado por su naturaleza de prueba y error y el método diferencial generalmente muestra mayores grados de incertidumbre.⁸⁰

1.7.3 Modelos No estructurados. En este estudio se evalúan modelos no estructurados no segregados el proceso se realizó en un reactor tipo batch el cual se caracteriza por no tener entradas ni salidas.

Estos modelos se enfocaron en la relación de biomasa y sustrato mediante la relación de la influencia de la concentración del sustrato limitante sobre el crecimiento microbiano.⁸¹

Este trabajo pretende evaluar solamente cinéticas para el consumo de sustrato, algunas de ellas se muestran a continuación.

⁸⁰ Duarte A. Evaluación de los parámetros Cinéticos de la Ecuación de Monod. Ing e Investig. 1996;(33):123-138.

⁸¹ ALCÓN MARTÍN, Almudela. Desarrollo de Modelos Cinéticos Para Bioprocesos: Aplicación a La Producción de Xantano. Trabajo de grado. Madrid.: Universidad complutense de Madrid. 1999. 471 p.

1.7.3.1 Modelos para el consumo de sustrato. M'Kendrick y Pai⁸² propusieron una cinética de consumo bajo la suposición de que todo el sustrato se utiliza en la conversión de biomasa. La ecuación tiene la siguiente forma:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \times \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

Donde, $Y_{X/S}$: es el coeficiente de rendimiento de biomasa en sustrato, g biomasa/g sustrato;

S: concentración de sustrato, g/L;

t: tiempo, horas;

X: es la concentración de biomasa, g/L;

Para relacionar la cinética de consumo de sustrato con la cinética de crecimiento de biomasa se puede aplicar la ley de Malthus, planteada para describir el crecimiento, es capaz de representar la fase de crecimiento exponencial de una cinética de primer orden descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (7)$$

Donde, X: es la concentración de biomasa, g/L;

μ : es la velocidad específica de crecimiento, 1/h.

Si reemplazamos (7) en (6):

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \times \mu X \quad (8)$$

La relación entre el rendimiento de crecimiento microbiano y el consumo de sustrato es la integral de la ecuación (8):

$$X = X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S) \quad (9)$$

Las velocidades de reacción biológicas han sido investigadas desarrollando relaciones entre la velocidad de reacción y otros parámetros, como lo es la influencia de la composición del medio y el efecto de inhibición del crecimiento.

⁸² Kendrick A.G. y M.K. Pai. citado por ALCÓN MARTÍN, Almudela. Desarrollo de Modelos Cinéticos Para Bioprocesos: Aplicación a La Producción de Xantano. Trabajo de grado. Madrid.: Universidad Complutense de Madrid. 1999. 471 p.

1.7.4 Influencia de la composición del medio. Uno de los modelos que tiene en cuenta la influencia del medio sobre la velocidad específica de crecimiento es el modelo de Monod y se presenta a continuación.

1.7.4.1 Modelo de Monod. Jaques Monod desarrolló una ecuación simple para representar el efecto de la concentración de los sustratos en un medio, basado en el crecimiento de *E. coli* en varios sustratos y varias concentraciones de glucosa⁸³.

Bajo las siguientes suposiciones Monod construyó su modelo matemático:

- Si bien pueden existir muchos sustratos en el medio, uno de ellos será el limitante.
- La producción de biomasa depende exclusivamente de la concentración de este sustrato limitante en este caso glucosa.
- Para una reacción de tipo $\alpha S \rightarrow \gamma X$, se incorpora una cinética enzimática tipo Michaelis-Menten.

La velocidad de crecimiento de biomasa puede representarse como:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{S + K_S} \quad (10)$$

Donde, μ = es la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

μ_{max} = máxima velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

S= concentración de sustrato limitante (g/L)

K_S es la constante de saturación del sustrato en (g/L)

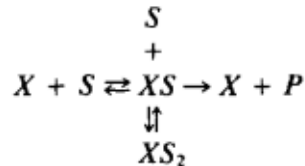
Esta ecuación describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración del sustrato limitante.

La velocidad específica de crecimiento es la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y está dada en 1/h.

1.7.5 Inhibición por sustrato. La inhibición por sustrato se comenzó a estudiar puesto que altas concentraciones de sustrato podrían inhibir el crecimiento del microorganismo lo que detendría la producción del metabolito de interés. Algunos de los modelos cinéticos que tienen en cuenta el efecto de inhibición por sustrato sobre la velocidad específica de crecimiento se presentan a continuación.

⁸³ MONOD, Jacques. The growth of bacterial cultures. En: Annual Reviews in M. 1949, vol.3. p. 371–94.

1.7.5.1 Modelo de Andrews. Andrews⁸⁴ en 1968 aplicó el modelo propuesto por Haldane⁸⁵ que describe la inhibición de enzimas mediante la formación de un complejo inactivo de la enzima con dos moléculas de sustrato por altas concentraciones de sustrato. Andrews empleó el modelo de Haldane para ajustar sus resultados experimentales en batch y en continuo. El siguiente modelo de reacciones se utilizó para el desarrollo de este modelo.



Además, Andrews construyó su modelo matemático bajo las siguientes suposiciones:

- Inicia describiendo la fase exponencial de crecimiento
- No se presenta muerte de los microorganismos
- No hay inhibición por producto
- Existe la formación de múltiples complejos inactivos biomasa-sustrato (XS_2 inactivo)
- La concentración de sustrato es tan alta que forma dos complejos inestables

Del modelo de reacciones puede derivarse mediante un análisis de estado estable resultando lo siguiente:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{(S + K_S)(1 + \frac{S}{K_i})} \quad (11)$$

Donde μ , μ_{max} , S y K_S tienen el mismo significado que los términos de la ecuación de Monod.

K_i : es la constante de inhibición por sustrato (g/L).

1.7.5.2 Modelo de Edwards. Edwards en 1970 estudió varios mecanismos que pudieron resultar en inhibición por sustrato, en su estudio se resaltan los posibles tipos de acción inhibitoria los cuales pueden ser: modificar el potencial químico de sustratos, productos intermedios o productos, alterar la permeabilidad de la célula, cambiar la actividad de una o más enzimas, la disociación de una o más enzimas o agregados metabólicos y la influencia de la actividad funcional de la célula. Asimismo, resalta algunos mecanismos de posible inhibición como:

⁸⁴ ANDREWS, John F. A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates. En: Biotechnology and Bioengineering. 1968. vol. 10. p. 707–23.

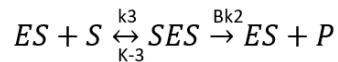
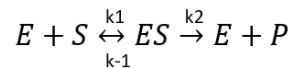
⁸⁵ Haldane, J. Enzymes, Longmans, London, 1930.

Reacción química con uno o más componentes de la célula, Adsorción con enzima, coenzima o sustrato, Entrada de inhibidor en la secuencia de reacción. Disociación de agregados enzimáticos. Modificación de variables fisicoquímicas de la solución externa (por ejemplo, pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, actividad del disolvente), entre otros.⁸⁶

Edwards construyó su modelo matemático bajo las siguientes suposiciones:

- Inhibición alostérica
- Una enzima puede tener más de un centro catalítico activo.
- La presencia o ausencia de una molécula de sustrato en un sitio puede influir en la actividad de los otros sitios.

El caso más simple se presenta por medio de las siguientes reacciones:



La ecuación (12) puede derivarse mediante un análisis de estado estable de las reacciones mostradas anteriormente.

$$\mu = \frac{\mu_{max}S(1 + \frac{S}{K_i})}{S + K_S + (\frac{S^2}{K_i})} \quad (12)$$

Donde μ , μ_{max} , S y K_S tienen el mismo significado que los términos de la ecuación de Monod.

K_i : es la constante de inhibición por sustrato (g/L).

1.7.5.3 Modelo de Inhibición Competitiva. Shuler y Kargi⁸⁷ en 2001 describieron la inhibición competitiva por sustrato como lo es en la cinética enzimática.

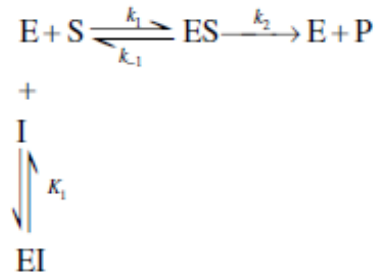
⁸⁶ EDWARDS, Victor H. The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics. En: Biotechnology and Bioengineering. 1970. Vol. 12. p. 679–712.

⁸⁷ Shuler, Michael L., and Fikret Kargi, 'Bioprocess Engineering: Basic Concepts', Journal of Controlled Release, 2002, 293

Shuler y Kargi construyeron su modelo matemático bajo las siguientes suposiciones:

- La reacción es catalizada por enzimas
- Se forma un complejo estable que reduce la actividad enzimática
- El inhibidor y el sustrato compiten por el sitio activo de la enzima.

Se presenta por medio de las siguientes reacciones:



Desarrollaron el siguiente modelo:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S \left(1 + \left(\frac{S}{K_i} \right) \right) + S} \quad (13)$$

Donde, μ = es la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)
 μ_{max} = máxima velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)
 S = concentración de sustrato limitante (g/L)
 K_S es la constante de saturación del sustrato en (g/L)
 K_i : es la constante de inhibición por sustrato (g/L).

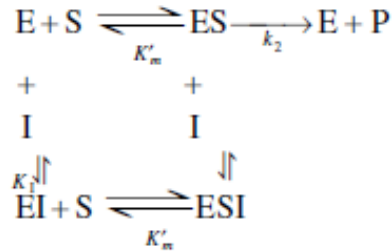
1.7.5.4 Modelo de Inhibición No Competitiva. Shuler y Kargi⁸⁸ en 2001 describieron la inhibición no competitiva por sustrato.

Shuler y Kargi construyeron su modelo matemático bajo las siguientes suposiciones:

- Los inhibidores no competitivos no son análogos de sustrato.
- Los inhibidores se unen en los sitios activos
- Reducen la afinidad de la enzima al sustrato.

⁸⁸ Shuler, Michael L., and Fikret Kargi, 'Bioprocess Engineering: Basic Concepts', Journal of Controlled Release, 2002, 293

Se puede describir de la siguiente manera:



Desarrollaron la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{S + K_S + \left(\frac{S^2}{K_i}\right)} \tag{14}$$

Donde, μ = es la velocidad específica de crecimiento (h-1)
 μ_{max} = máxima velocidad específica de crecimiento (h-1)
 S = concentración de sustrato limitante (g/L)
 K_S es la constante de saturación del sustrato en (g/L)
 K_i : es la constante de inhibición por sustrato (g/L).

Los modelos cinéticos relacionan la velocidad específica de crecimiento (μ) con parámetros cinéticos, en la tabla 4 se resumen los modelos que se aplicaron en la ecuación (8).

Tabla 4. Modelos cinéticos usados en este estudio.

Nombre	Modelo Cinético	Ec.
Monod	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{S + K_S}$	(10)
Andrews	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{(S + K_S)\left(1 + \frac{S}{K_i}\right)}$	(11)
Edwards	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{S + K_S + \left(\frac{S^2}{K_i}\right)\left(1 + \frac{S}{K_S}\right)}$	(12)
Inhibición Competitiva del Sustrato	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S \left(1 + \left(\frac{S}{K_i}\right)\right) + S}$	(13)
Inhibición No Competitiva del Sustrato	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{S + K_S + \left(\frac{S^2}{K_i}\right)}$	(14)

1.7.6 Significado físico de los parámetros cinéticos. Los parámetros cinéticos presentes en los modelos son: la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), la constante de saturación (K_S), el coeficiente de rendimiento ($Y_{X/S}$) y la constante de inhibición por sustrato (K_i), su significado físico se muestra a continuación:

- **Velocidad específica de crecimiento (μ_{max}):** Es la velocidad máxima de multiplicación que puede alcanzar el microorganismo, en las condiciones en las que crece.⁸⁹
- **Constante de saturación (K_S):** Es la concentración de sustrato cuando la velocidad específica de crecimiento es igual a la mitad de la velocidad máxima de crecimiento ($\mu = (\mu_{max}/2)$).⁹⁰
- **Coeficiente de rendimiento ($Y_{X/S}$):** Es el rendimiento de sustrato en biomasa, cantidad de biomasa en el sustrato consumido.⁹¹
- **Constante de inhibición por sustrato (K_i):** K_i indica la potencia de una fuente inhibitoria, y es la concentración requerida de sustrato para producir la mitad de la inhibición máxima.⁹²

⁸⁹ Trinidad-Bello A. Modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por su ajuste. 2014:114.

⁹⁰ Fu W, Mathews AP. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem Eng J.* 1999;3(3):163-170.

⁹¹ Orozco, M. Solarte J. Búsqueda Del Mejor Medio De Cultivo Y Modelamiento Cinético Para La Obtención Del Ácido Láctico a Partir De Glucosa Por Vía Fermentativa. Tesis Pregr en Ing química. 2003;32(1):54-55.

⁹² London's global university. Enzyme inhibitors. [online]. Consultado el 10 de febrero del 2018. Disponible en: <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/inhibition.htm>

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

La experimentación se llevó a cabo en la red tecno parque del Sena nodo Bogotá en los laboratorios de nanotecnología y biotecnología. La fermentación se realizó en el laboratorio de microbiología y las determinaciones analíticas en el laboratorio de fisicoquímica del Tecnoparque.

2.2 MATERIA PRIMA

Se utilizaron piñas de la variedad perolera adquiridas en un supermercado de la ciudad de Bogotá. Se caracteriza por pesar entre 1,5 y 3 kg, posee un color entre amarillo y naranja, con una forma cilíndrica irregular, no tiene espinas⁹³. Se escogió esta variedad ya que la piña perolera es una de las más cultivadas en Colombia⁹⁴ por consiguiente es de fácil adquisición y común en el mercado.

2.2.1 Valoración de madurez del sustrato. Se aplicó la Norma técnica colombiana NTC 4102, esta norma establece los requisitos que debe cumplir la piña (*Ananas comosus L. Merr*)⁹⁵. La norma estipula los requisitos de madurez mediante una apreciación visual, comparando el color externo de la piña con los estados de madurez (figura 7), la relación se describe a continuación:

Tabla 5. Tabla de color.

Color	Descripción
0	Fruto de color morado bien desarrollado
1	Disminuye la intensidad del color
2	Algunos ojos presentan una coloración anaranjada, pero predomina el color morado
3	aumenta el número de ojos de color anaranjado
4	predomina el color anaranjado
5	Aumenta el área de color anaranjado y también aumenta su intensidad
6	El fruto es de color anaranjado intenso

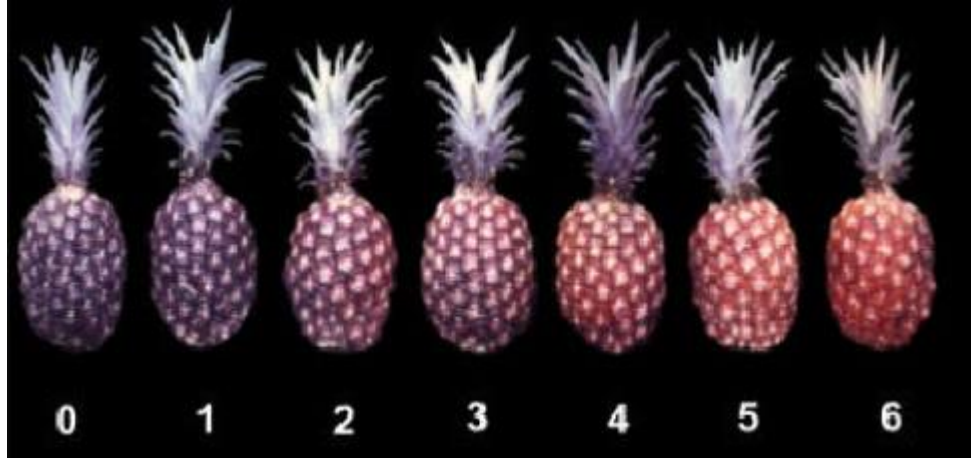
Fuente: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. Frutas frescas. Piña manzana. Especificaciones. NTC 4102. Bogotá D.C.: El Instituto, 1997. p. 1-15.

⁹³ CARVAJAL, L. M. Producción, transformación y comercialización de pulpas de frutas tropicales [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de química farmacéutica. 2000. Disponible en: <http://huitoto.udea.edu.co/FrutasTropicales/pina.html>

⁹⁴ Neira G AM, Martínez R AM, Orduz R JO. Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. Econ y Desarrollo Rural. 2016;17(2):149-165.

⁹⁵ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. Frutas frescas. Piña manzana. Especificaciones. NTC 4102. Bogotá D.C.: El Instituto, 1997. p. 1-15.

Figura 7. Relación del color de la piña con el nivel de madurez



Fuente: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. Frutas frescas. Piña manzana. Especificaciones. NTC 4102. Bogotá D.C.: El Instituto, 1997. p. 1-15.

Según lo obtenido por Arias y Toledo, el grado de madurez puede ser determinado por el color de la cascara del fruto que cambia de verde oscuro o morado a un verde claro y después a un amarillo naranja.⁹⁶ Es posible relacionar la tabla 5 con las diferentes etapas del fruto de la piña siendo 0=verde, 1=verde, 2=un cuarto, 3=media, cara 4=tres cuartos, 5=madura y 6=sobre-madura^{97,98}.

También, se debe determinar el contenido mínimo de sólidos solubles expresado como grados brix de acuerdo con la tabla 5 de color (tabla 6).

Tabla 6. Contenido mínimo de sólidos solubles totales expresado como grados brix de acuerdo con la tabla de color

Color	0	1	2	3	4	5	6
°Brix	9,2	10,5	11,4	12,0	12,0	12,2	11,3

Fuente: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN. Frutas frescas. Piña manzana. Especificaciones. NTC 4102. Bogotá D.C.: El Instituto, 1997. p. 1-15.

2.2.2 Caracterización del jugo de piña. Se realizó con el fin de identificar la composición del residuo de piña utilizado en la fermentación y determinar si este sustrato puede ser aprovechado por la bacteria.

⁹⁶ ARIAS VELÁZQUEZ, Ciro J., Y, and TOLEDO HEVIA. Julio. 'Manual de Manejo Postcosecha de Frutas Tropicales (Papaya, Piña, Plátano, Cítricos). En: Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación (FAO), 1 (2007), 50.

⁹⁷ PRODOCA. Etapas de la maduración de la piña. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018 Disponible en: <http://prodoca.com.mx/home/mapa/pina/>

⁹⁸ Lizcano S. Identificación de las etapas de maduración de la piña perolera empleando técnicas de visión artificial. 2010:4-5.

2.2.2.1 Análisis organoléptico. Consiste en involucrar los órganos de los sentidos para describir cualitativamente una muestra. Los resultados del análisis organoléptico se encuentran en secciones posteriores (Sección 3,1).

2.2.2.2 Determinación del pH. El pH de una muestra se determina usando un pH metro, por el método potenciométrico, estos aparatos miden una diferencia de potencial que se establece entre los electrodos (electrodo de referencia y electrodo de vidrio) y que depende de la concentración de hidrogeniones del medio que se analiza. El electrodo de vidrio consiste en esencia en una membrana selectivamente permeable a los hidrogeniones.⁹⁹

2.2.2.3 Determinación de sólidos solubles (°Brix). Es la medida de una sustancia soluble seca en una líquida lo que arroja un valor aproximado del contenido de sólidos solubles. El principio de medición se basa en la refracción de la luz creada por la naturaleza y la concentración de los solutos (por ejemplo, el azúcar). Es por esto por lo que un refractómetro mide indirectamente la densidad de los líquidos. La unidad de medida °Bx (grados Brix) lleva el nombre de Adolf F. Brix, un científico del siglo XIX. Según esa escala, 1 °Bx correspondería a un índice de refracción de una solución de sacarosa en agua al 1%.¹⁰⁰

La medición se realizó por medio de un refractómetro, un refractómetro es un instrumento óptico tubular con un ocular en una de sus puntas. En el otro extremo posee un prisma de medición que expande el rayo de luz incidente en la escala del prisma a un ángulo determinado. Si en este momento se depositan algunas gotas de la solución de prueba en la superficie del prisma del refractómetro, cambiará ligeramente el ángulo de refracción del rayo incidente.¹⁰¹

Para efectos de medición, se colocaron gotas del líquido de piña en el prisma de medición del refractómetro y se esparció uniformemente, se puede leer directamente en grados Brix. Los resultados se muestran en secciones posteriores.

2.2.3 Obtención y tratamiento del residuo de piña. Se procesa la pulpa de la piña para que las bacterias tengan una mejor accesibilidad a los nutrientes. Se realizó como lo indica la figura 8.

Se eliminó la cascara y la fibra para obtener la pulpa de la fruta, luego se esterilizó en una autoclave a 121°C por 30 minutos a 15 libras de presión para eliminar

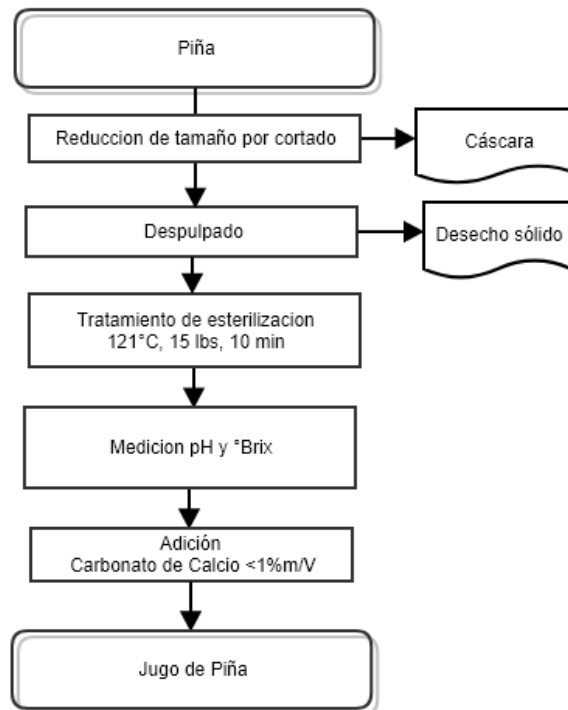
⁹⁹ MACARULLA, José., GOÑI, Félix. Bioquímica humana: curso básico. 2 ed. Reverté. Barcelona. 1994. p. 33

¹⁰⁰ Kruss. Informe de aplicación. Refractometro – Medición Brix en la industria de bebidas y zumos. En línea.
http://www.kruess.com/documents/Applikationsberichte/AP130710_001_Medicion_Brix_en_la_industria_de_bebidas_ES.pdf

¹⁰¹ FELCOBO. Como determinar la madurez de la fruta. [online]. Consultado el 12 de febrero del 2018. Disponible en: <http://www.felcobo.com/Nota.php?er=0&id=5>

microorganismos y tener condiciones asépticas luego se realizó la medición de pH y °Brix, se adicionó carbonato de calcio como buffer menor al 1% m/V.

Figura 8. Diagrama para la obtención y tratamiento del jugo de piña



Los buffers más utilizados son CaCO_3 , NaOH Y NH_4OH ¹⁰². A nivel industrial para la producción de ácido láctico por fermentación se emplea por lo general CaCO_3 , para prevenir la disminución del pH en el caldo. El carbonato de calcio reacciona con el ácido láctico para formar lactato de calcio. Nomura, Iwaha y Hongo en su estudio emplearon CaCO_3 como buffer al inicio de la fermentación en la producción de ácido láctico y durante la fermentación no se controló el pH, con esto obtuvieron 8,6 mg/mL de ácido láctico. Es importante no agregar el carbonato de calcio en una gran cantidad puesto que se puede acumular el lactato de calcio y causar inhibición por producto¹⁰³.

¹⁰² HOFVENDAHL, Karin, and HAHN-Hägerdal, Bärbel. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable resources. En: Enzyme and Microbial Technology, 2000, vol. 67. p. 87–107.

¹⁰³ Nomura Y, Iwahara M, Hongo M. Lactic acid production by electro dialysis fermentation using immobilized growing cells. Biotechnol Bioeng. 1987;30(6):788-793.

Se seleccionó el carbonato de calcio ya que es uno de los más utilizados según revisión bibliográfica y solo se contaba con la adquisición del mismo en los laboratorios del Tecnoparque.

2.2.4 Preparación del medio de cultivo. El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La tabla 2 muestra algunas sustancias presentes en un residuo de jugo de piña, la glucosa constituye la fuente carbono el crecimiento bacteriano. Los elementos como magnesio, manganeso, sodio y potasio aportan cofactores. Además, se adicionó carbonato de calcio como buffer menor al 1% m/V para estabilizar el pH durante la fermentación.

2.3 MICROORGANISMO

Se empleó la cepa bacteriana *Lactobacillus acidophilus* pura y liofilizada de la empresa internacional Sacco system y se adquirió en el centro agro lechero de Bogotá.

2.3.1 Activación e inoculación de la bacteria. La bacteria liofilizada se activó en 90 mL de medio de cultivo de piña por un periodo de 24 horas a 36°C. El inóculo fue de 90 mL que es el 10% del volumen del reactor con el fin realizar la fase de adaptación de la bacteria al nuevo medio por 24 horas, el reactor fue de 900 mL de caldo de cultivo inoculado.¹⁰⁴

2.4 FERMENTACIÓN

La fermentación por lotes se llevó a cabo en un reactor estéril con una capacidad de 1,5 litros de vidrio, en una incubadora con regulador de temperatura y agitación. El proceso de fermentación es sensible a los cambios por esta razón es importante fijar y controlar las condiciones de operación del sistema con el fin de no afectar la producción.

2.4.1 Condiciones de operación. Se realizó una búsqueda bibliográfica de las condiciones que se deben tener en cuenta para dar inicio a la fermentación. Estas condiciones dependen directamente del microorganismo porque si el microorganismo crece en las condiciones adecuadas el proceso tiende a ser más efectivo.

El rango de temperatura en el que crece la bacteria *Lactobacillus acidophilus* es de 35 a 40°C y pH entre 5,0 y 6,0¹⁰⁵. Sin embargo, las bacterias del género

¹⁰⁴ SENGUPTA, D., PIKE, R. Chemicals from Biomass: Integrating Bioprocesses into Chemical Production complexes for sustainable development. CRC Press. London. 2013, p. 122.

¹⁰⁵ Gomes AMP, Malcata FX. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci Technol. 1999;10(4-5):139-157.

Lactobacillus toleran pH más bajos entre 3 y 8¹⁰⁶. Con base a esto se manejó una temperatura de operación de 36°C y el pH se fijó en 4,43 durante la fermentación mediante un buffer de carbonato de calcio para neutralizar el ácido, manteniendo el pH estable y producir una sal de calcio del ácido en el caldo¹⁰⁷. La fermentación se lleva a cabo en un modo discontinuo o alimentado por lotes. Se fijó una agitación constante de 160 rpm¹⁰⁸ de acuerdo con revisión bibliográfica y por recomendación de los microbiólogos del Tecnoparque, con el fin de asegurar uniformidad del medio y el microorganismo por todo el reactor.

2.4.2 Tiempo de Incubación. Se realizó una revisión bibliográfica del tiempo en el que finaliza la fase exponencial de crecimiento de las bacterias *Lactobacillus* en estudios similares y con base en esto fijar el tiempo de incubación.

Por ejemplo, en el trabajo de grado titulado Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas comosus merr.*) y banano (*Musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico obtuvieron la fase exponencial a las 48 horas¹⁰⁹, en el artículo Metabolites produced by probiotic Lactobacilli rapidly increase glucose uptake by CaCO₂ cells la fase exponencial finalizó a las 48 horas¹¹⁰, en el artículo Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria el tiempo fue de 72 horas¹¹¹.

Se fijó entonces un tiempo de incubación de 108 horas con el fin de obtener el dato de la fase exponencial.

2.4.3 Muestreo. A lo largo del proceso de fermentación se tomaron muestras cada 12 horas con el fin de determinar la concentración de biomasa y azúcares en el medio a través del tiempo. Una vez tomadas las muestras se refrigeraron para detener la reacción. Se realizó en cabina de bioseguridad con material estéril para asegurar que el sistema no presentara problemas de contaminación con otro tipo de microorganismo.

¹⁰⁶ HOFVENDAHL, Karin, and HAHN-Hägerdal, Bärbel. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable resources. En: Enzyme and Microbial Technology, 2000, vol. 67. p. 87–107.

¹⁰⁷ DATTA, Rathin; TSAI, Shih-perng; BONSIGNORE, Patrick; MOON, Seung-hyeon. Technological and Economic Potential of Poly(Lactic Acid) and Lactic Acid Derivatives. En: FEMS Microbiology Reviews. 1995. Vol. 16. p. 221–31.

¹⁰⁸ ARIAS, Mario., HENAO, Lina. Lactic Acid Production by Fermentation of Coffee Mucilage with *Lactobacillus Bulgaricus* NRRL-B548. En: DYNA. 2009. Vol. 158. p. 147–53.

¹⁰⁹ Giselle, Laura, and Guillén Romero, Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*ananas comosus merr.*) y banano (*musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico, 2013

¹¹⁰ Rooj, Arun K, Yasuhiro Kimura, and Randal K Buddington, 'Metabolites Produced by Probiotic Lactobacilli Rapidly Increase Glucose Uptake by Caco-2 Cells.', BMC Microbiology, 10 (2010), 16

¹¹¹ Z. E. MousaviS. , M. Mousavi, H., Razavi, Z., Emam-Djmomeh., H. Kiani. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27 (1):123–128

El tratamiento dado a cada muestra tomada durante la fermentación fue el siguiente: se tomó aproximadamente 7 mL del medio de fermentación en tubos de ensayo con tapa rosca con jeringa estéril y se refrigeración hasta llevar a cabo el análisis de biomasa y azúcares.

2.5 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Se llevó a cabo mediante la técnica de recuento bacteriano presentes en las muestras, este método permite el recuento del número de células presentes en ella. Es útil para bacterias mesófilas y termófilas, si se necesita analizar más cantidad de una muestra, los resultados son exactos puesto que la muestra tiene una distribución mejor entre el medio de cultivo MRS.¹¹²

Se determina el número de microorganismos en una muestra en relación con las colonias que forman, las UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Se emplean soluciones diluidas o diluciones de una muestra concentrada para que cada colonia formada provenga de un solo microorganismo, aunque algunas agrupaciones no pueden ser separadas por las diluciones. Se utilizan principalmente para la cuantificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos.¹¹³

2.5.1 Preparación MRS. El Agar MRS es recomendado para el cultivo de todos los lactobacilos, el medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. La tabla 7 muestra la composición del MRS.¹¹⁴

Determinar la cantidad de MRS que se requiere preparar, para 1 litro de agua se requieren 67,15 gramos del agar, luego se debe llevar a ebullición en una plancha con agitación magnética para asegurar dilución total, se realiza un tratamiento de esterilización del medio a 120°C y 0,1 MPa por 20 minutos, dejar enfriar hasta 50 °C, adicionar a las cajas de Petri 10 mL en cabina de bioseguridad asegurándose que el medio no tenga aglomeraciones, burbujas y se encuentre en estado líquido¹¹⁵. El procedimiento se muestra en la figura 9.

¹¹² Cerra H, Aversa N, Carbone N, et al. Manual de Microbiología Aplicada a Las Industrias Farmacéutica, Cosmética Y de Productos Médicos.; 2013.

¹¹³ *Ibid.*, p. 4.

¹¹⁴ BRITANIA. MRS Agar. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02205%20REV%2001-MRS%20AGAR.pdf>

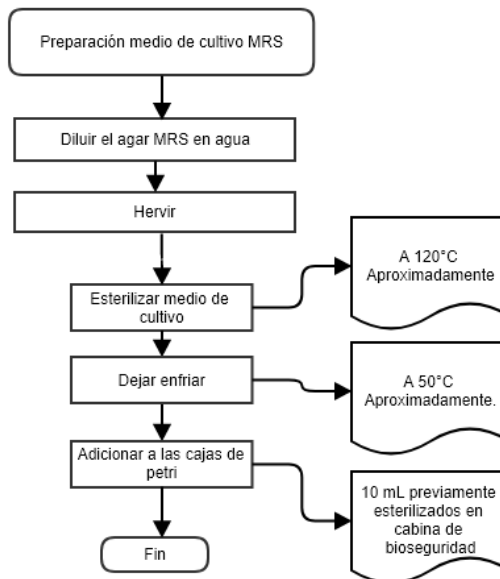
¹¹⁵ MAST. MRS Agar. Procedimiento. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU402_SPA.pdf

Tabla 7. Composición agar MRS.

Ingredientes	g/L
Proteosa peptona	10,0
Extracto de carne	10,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
Polisorbato 80	1,0
Citrato de Amonio	2,0
Acetato de Sodio	5,0
Sulfato de Magnesio	0,2
Sulfato de Manganeso	0,05
Fosfato Dipotásico	2,0
Agar	13,0

Fuente: LABORATORIOS BRITANIA S.A. Ficha técnica MRS Agar.
B0220505. Argentina. 2015. p. 1.

Figura 9. Preparación agar MRS.

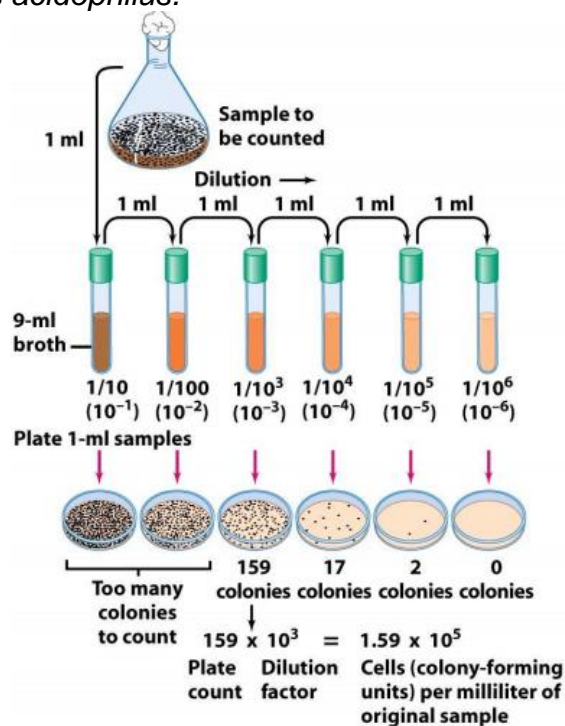


2.5.2 Diluciones y Siembra. Se realizan diluciones cuando la concentración de microorganismos es tan alta que no es posible realizar en conteo de las colonias en las cajas de Petri.¹¹⁶

Las diluciones se realizaron en solución salina NaCl 1% estéril, medio isotónico que no mata las bacterias¹¹⁷ y se hace en base 10, es decir en 10 mL se adiciona 9 mL de medio isotónico y 1 mL de muestra, como se muestra en la figura 10.¹¹⁸

Se realizaron diluciones de 1:100, 1:1000 y 1:10000 de la siguiente manera: Del tubo uno sacar 1 ml y adicionarlo al tubo 2, agitar luego de tubo dos sacar 1 ml y adicionarlo al tubo 3, agitar y así sucesivamente. Luego de cada dilución tomar 1 ml y agregarlos a la caja de Petri, realizando un movimiento circular, homogenizando en sentido de las agujas del reloj para dispersar todo el contenido sobre la caja.¹¹⁹

Figura 10. Técnicas de diluciones sucesivas para siembra de la cepa *Lactobacillus acidophilus*.



Fuente: MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 - 2.

¹¹⁶ MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 - 2.

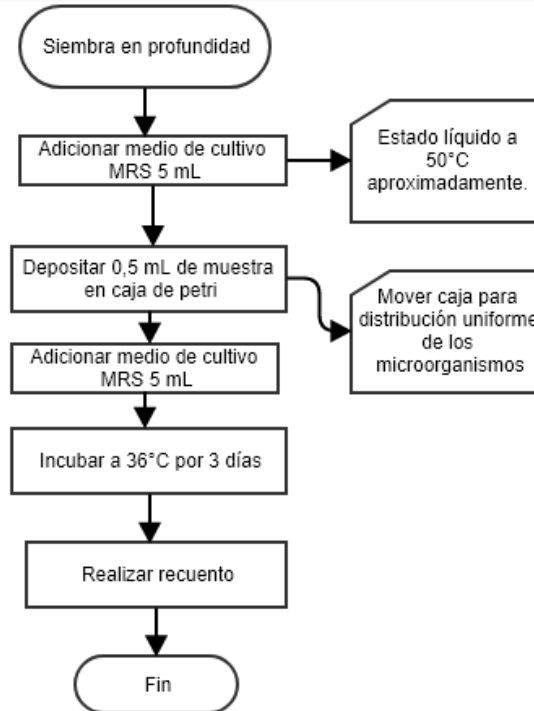
¹¹⁷ WERNER, Esterl. Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Editorial Reverté. Barcelona. 2008. p. 16.

¹¹⁸ ANDERSON, M., CALDERON, V. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial días de santas SA. 2 ed. 1999. p. 12.

¹¹⁹ *Ibíd.*, p. 12.

La técnica de siembra en profundidad consiste en depositar la muestra entre dos capas de agar. Esta técnica se basa en que cada microorganismo forma una colonia visible¹²⁰. Se adiciona 5 mL de agar MRS en caja de Petri, luego 1 mL de muestra, se debe tapar caja mover lentamente la caja en sentido de las manecillas del reloj y contrario para asegurar la distribución de la muestra por toda la caja, adicionar otros 5 mL de agar MRS, cerrar caja e incubar por 3 días a 36°C¹²¹, el procedimiento se logra apreciar en la figura 11.

Figura 11. Método de siembra por profundidad.



2.5.3 Recuento en placa. Se determinó el número de colonias con la ayuda de un contador de colonias, el instrumento cuenta con cuadrantes para hacer más fácil el conteo. Se cuentan hasta 300 colonias en una caja si hay más de 300 se realiza la lectura en la siguiente caja con la muestra diluida.

Las unidades son UFC/mL y se calcula de la siguiente manera¹²²:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{No. de colonias en la placa \times FDD}{mL de la muestra sembrada} \quad (15)$$

¹²⁰ ANDERSON, M., CALDERON, V. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial Díaz de santas SA. 2 ed. 1999. p. 12.

¹²¹ Cerra H, Aversa N, Carbone N, et al. Manual de Microbiología Aplicada a Las Industrias Farmacéutica, Cosmética Y de Productos Médicos.; 2013. p. 16.

¹²² ULPGC. [en línea], 18 de octubre 2017. Disponible en: <http://www.webs.ulpgc.es/hbg/PRACTICAS/PROBLEMAS/CALCULOS-UFC.pdf>

Donde

FDD =Factor decimal de dilución por ejemplo 10, 100, 1000.

2.6 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Miller¹²³ en 1959 desarrolló un método para determinar azúcares reductores, utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico el cual posee la capacidad de reaccionar con los azúcares reductores presentes en una muestra, mediante la acción de calor reduciendo el ácido a 3-amino-5 nitro salicílico y produciendo un cambio en el color de la muestra que se oxida de apariencia amarillo café. La cantidad de azúcares reductores en la muestra se puede determinar aplicando la ley de Lambert-Beer que establece que la absorbancia está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas del analito, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra¹²⁴, mediante espectrofotometría con el fin de hallar la absorbancia de la luz en la muestra a una longitud de onda de 540nm.

Para lo cual, se debe realizar una curva de calibración patrón de glucosa para cuantificar la concentración de azúcares en la cual se logre reemplazar los valores de las absorbancias y así obtener la concentración de azúcares reductores.

2.6.1 Preparación Acido 3,5 dinitrosalicílico. Se pesó 1,6 g de NaOH, 43,8 g de Tartrato de Na-K y 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se agregó a un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada el NaOH hasta disolución completa, luego se agregó el tartrato de Na-K lentamente hasta disolver por completo la solución mediante agitación magnética y se agregó el ácido 3,5-dinitrosalicílico protegiendo el reactivo de la luz con papel aluminio. Luego, se afora la solución hasta 100 mL con agua destilada en un balón aforado de 100 mL y se deja en agitación toda la noche en un frasco ámbar¹²⁵.

2.6.2 Elaboración curva de calibración. Se preparó la solución patrón de glucosa a las siguientes concentraciones: 0, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 1,7 y 2,0 g/L. Se añadió 0,25 mL de cada solución y 0,25 mL del reactivo DNS en tubos tapa rosca cubiertos con papel aluminio para proteger la reacción de la luz. Los tubos se colocaron en un baño termostático a 92°C por 5 minutos. Se detuvo la reacción por enfriamiento en hielo por 5 minutos y se agregó 2,5 ml de agua destilada a cada tubo, se agitó y se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro. La tabla 8, muestra en resumen las cantidades agregadas de glucosa, reactivo y agua destilada para cada muestra.¹²⁶

¹²³ Miller, Gail Lorenz, 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', *Analytical Chemistry*, 31 (1959), 426–28.

¹²⁴ Swinehart DF. The Beer-Lambert Law. *J Chem Educ.* 1962;39(7):333.

¹²⁵ Pontificia Universidad Javeriana. Manual De Laboratorio De Procesos Biotecnológicos. Bogotá D.C. 2007.

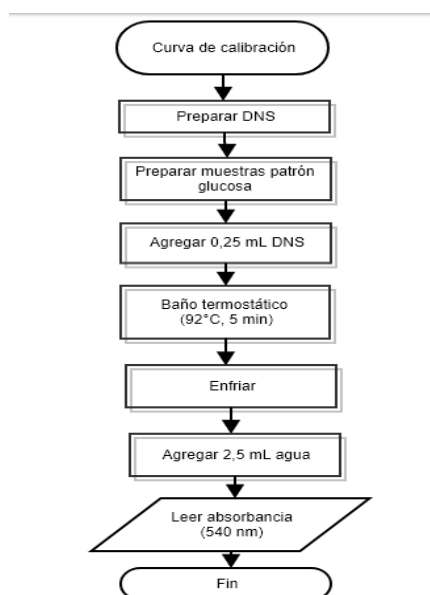
¹²⁶ Cerra H, Aversa N, Carbone N, et al. Manual de Microbiología Aplicada a Las Industrias Farmacéutica, Cosmética Y de Productos Médicos.; 2013.

Tabla 8. Elaboración muestras para la curva patrón de glucosa.

Reactivo	Blanco	Concentración (g/L)					
		0,5	0,7	1,0	1,5	1,7	2,0
Glucosa (mL)	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua (mL)	0,25	-	-	-	-	-	-
Reactivo DNS (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua destilada (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras del caldo cada 12 horas desde 0 horas hasta 108 horas, una vez tomadas las muestras se centrifugaron en tubos falcon a 4000 rpm, 4°C por 20 minutos, para retirar el líquido sobrenadante se microfiltra al vacío con filtros de 0,22 micrómetros para separar el material celular¹²⁷. A continuación, en la figura 12 se muestra la metodología elaborada.

Figura 12. Metodología curva de calibración.



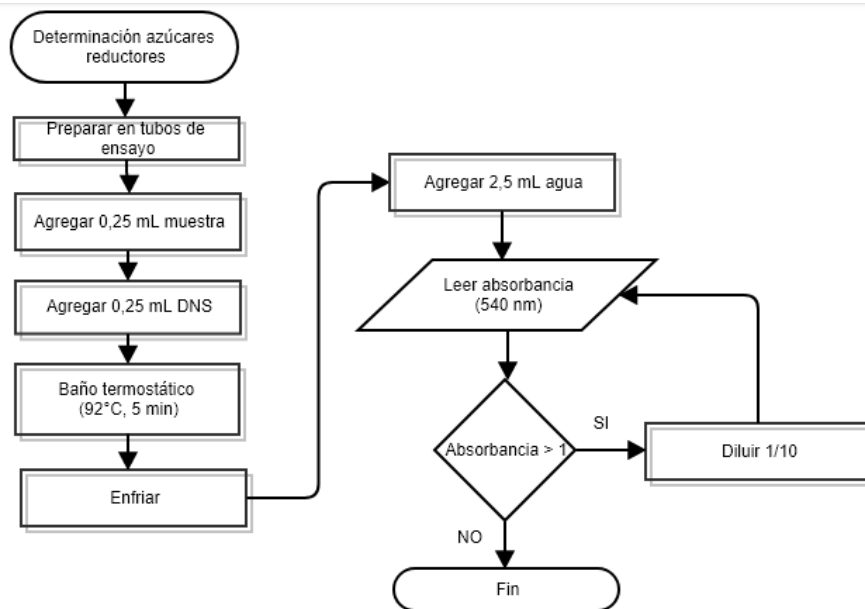
2.6.3 Determinación de la concentración de sustrato. Se centrifugaron las 10 muestras de caldo de fermentación por 20 minutos a 4000 revoluciones por minuto. Se añadió 0,25 mL de muestra y 0,25 mL del reactivo DNS en tubos tapa rosca cubiertos con papel aluminio para proteger la reacción de la luz. Los tubos se colocan en un baño termostático a 92°C por 5 minutos. Se detiene la reacción por enfriamiento en hielo por 5 minutos y se agrega 2,5 ml de agua destilada a cada

¹²⁷ Granda D, Mejía A, Jiménez G. Utilización de Residuos de Plátano para la Producción de Metabolitos Secundarios por Fermentación en Estado Sólido con el Hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae*. 2005;12(2):13-20.

tubo, se agita y se realiza la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.^{128, 129}

Se realizó una regresión lineal a la curva de calibración se despejó la variable concentración en función de la absorbancia medida y se reemplazaron los datos obtenidos. A continuación, en la figura 13 se muestra la metodología elaborada.

Figura 13. Metodología para la determinación de la concentración de sustrato.



2.7 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Se realizó el ajuste de los parámetros en los modelos de Monod, Andrew, Edward, inhibición competitiva e inhibición no competitiva, ecuaciones (10) a (14) en (8) a los datos experimentales para el consumo de sustrato. La regresión iterativa no lineal de mínimos cuadrados se realizó mediante el método de Levenberg-Marquardt¹³⁰.

El ajuste de parámetros para los modelos fue obtenido por medio de la función `lsqcurvefit` de Matlab R2012b®, donde se buscó reducir la suma de la diferencia cuadrática entre los valores predichos y experimentales (ecuación (16)) hasta encontrar los parámetros que satisfagan la condición.

¹²⁸ Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 1959;31(3):426-428.

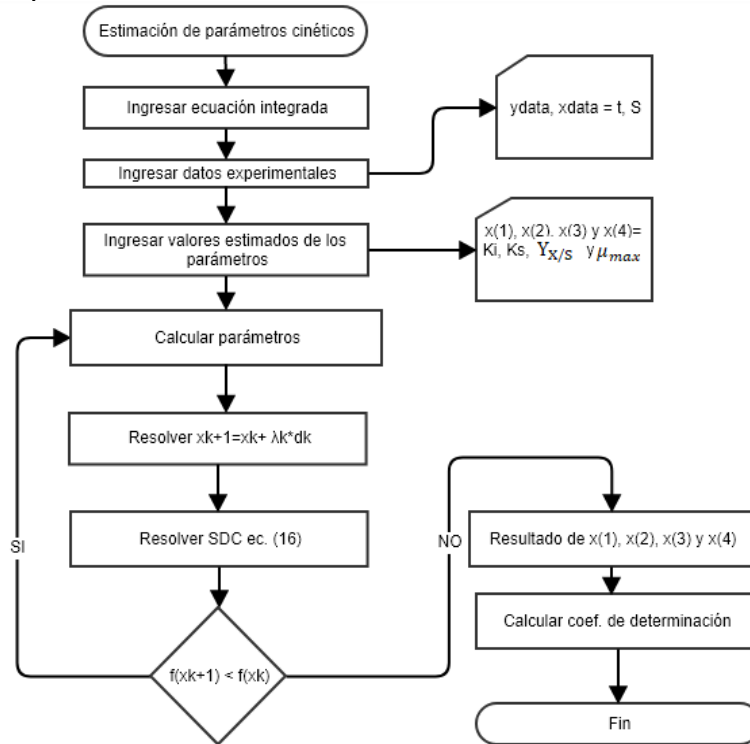
¹²⁹ ÁVILA, Ramona., Bernarda RIVAS, Rómulo y HERNÁNDEZ, and Marluy CHIRINOS. Contenido de Azúcares Totales, Reductores Y No Reductores En Agave Cocui Trelease. En: *Multiciencias.* 2012. Vol. 12, no. 2. 129–35.

¹³⁰ MARQUARDT, Donald. An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameter. En: *J. Soc. Indust. Appl. Math.* 1963. Vol.11. no. 2. P. 431-441.

$$SDC = \min_x \sum_i (F(x, xdata_i) - ydata_i)^2 \quad (16)$$

Donde xdata son datos de entrada, y la salida observada ydata, donde xdata y ydata son matrices o vectores, y F (x, xdata) es una función de valor matricial o vectorial del mismo tamaño que ydata. A continuación, en la figura 14 se muestra la metodología empleada para el uso del programa desarrollado en Matlab.

Figura 14. Estimación de parámetros cinéticos en Matlab R2012b® por la función lsqcurvefit.



Los parámetros de las ecuaciones del modelo matemático fueron estimados por la minimización de la suma de las diferencias cuadráticas (SDC) entre los datos experimentales y los datos suministrados por el modelo (Ecuación (16)). El programa fue desarrollado en Matlab R2012b® y los valores de los parámetros fueron obtenidos mediante la función lsqcurvefit la cual se basa en la optimización no lineal sin restricciones, reduciendo el valor de SDC al mínimo. La búsqueda de los parámetros se realizó por el método integral y la metodología es presentada a continuación.

2.7.1 Validación del modelo. Para evaluar la correlación entre en modelo cinético y los datos experimentales, se aplicó el coeficiente de determinación (R^2) es cual es

un estadístico que representa la proporción de variación explicada por la regresión¹³¹, es una medida relativa del grado de asociación lineal entre x e y:

$$R^2 = \frac{\sum(\hat{Y} - \bar{y})^2}{\sum(Y - \bar{y})^2} = 1 - \left(\frac{\sum e^2}{\sum(Y - \bar{y})^2}\right) \quad (17)$$

Donde e^2 es el error entre y experimental y la y calculada, \bar{y} es el promedio de y experimental y son los datos de y experimentales. Un valor de R^2 cercano a 1 indica correlación es fuerte y directa.

¹³¹ UGR. [en línea], 20 de octubre, 2017. Disponible en:
http://www.ugr.es/~bioestad/_private/cpfund5.pdf

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos con su respectivo análisis.

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO

La tabla 9 presenta las características principales de las piñas utilizadas como sustrato, estas nos ayudan a identificar y describir el estado de la pina, así como el valor determinado de los grados brix y el pH.

Tabla 9. Características del sustrato de piña.

Parámetro	Descripción
Color	Amarillo característico en la base y naranja el resto del cuerpo.
Olor	Olor fuerte a fruta madurada.
Textura	Suave y blanda.
pH inicial	4,43
pH final	4,0
Sólidos Solubles totales (°Brix)	12,2

Teniendo estas principales características, es posible aplicar la NTC 4102 con el fin de valorar la madurez de la piña. Si se compara la figura 7 con la figura 15 la relación del color de la piña se fijó en 5, la tabla 5 indica un color 5 igual a “Aumenta el área de color anaranjado y también aumenta su intensidad”.

Asimismo, se logró comparar la cantidad de sólidos solubles con la tabla 6, se obtuvieron unos grados brix de 12,2 (ver figura 16), en la tabla 6 se presenta para unos grados brix de 12,2 una asignación de color de 5. Según lo obtenido por Arias y Toledo, el grado de madurez puede ser determinado por el color de la cascara del fruto que cambia de verde oscuro o morado a un verde claro y después a un amarillo naranja. Es posible relacionar la tabla 5 con las diferentes etapas del fruto de la piña siendo 0=verde, 1=verde, 2=un cuarto, 3=media, cara 4=tres cuartos, 5=madura y 6=sobre-madura¹³². Como se determinó un color 5 de acuerdo con la NTC 4102, al relacionarlo con las etapas de la piña un valor de 5 indica que es una fruta madura. Asimismo, Lizcano et al.¹³³ presenta un estudio de la madurez de la fruta respecto a los días de almacenamiento un fruto presenta un color amarillo

¹³² PRODOCA. Etapas de la maduración de la piña. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: <http://prodoca.com.mx/home/mapa/pina/>

¹³³ Lizcano S. Identificación de las etapas de maduración de la piña perolera empleando técnicas de visión artificial. 2010:4-5.

naranja a los 18 días de almacenamiento, el fruto adquirido llevaba en almacenamiento 20 días. Se logra identificar el alto grado de maduración la piña.

Con respecto a los grados brix, 1 °Bx correspondería a un índice de refracción de una solución de sacarosa en agua al 1%, es decir contiene 1 gramo de sólidos disueltos por 100 gramos de solución total¹³⁴. En este caso, La piña posee 12,2 gramos de sólidos disueltos por 100 gramos de solución total. El bajo contenido de sólidos es una ventaja porque no se hace necesario su dilución, además su tratamiento es relativamente sencillo en comparación a otros desechos agroindustriales que poseen semillas o son viscosos como las melazas, el bagazo o residuos de trigo¹³⁵.

Figura 15. Piña utilizada en la fermentación.



La primera medición del pH de la piña resultó en un valor de 4,13 se agregó CaCO_3 para aumentar el pH. No se llegó al valor de pH entre el rango óptimo puesto que no se debe agregar CaCO_3 mayor al 1% m/V ya que la acumulación de lactato de calcio puede causar inhibición por producto¹³⁶, se agregó poca cantidad con el fin

¹³⁴ Kruss. Informe de aplicación. Refractómetro – Medición Brix en la industria de bebidas y zumos. En línea.

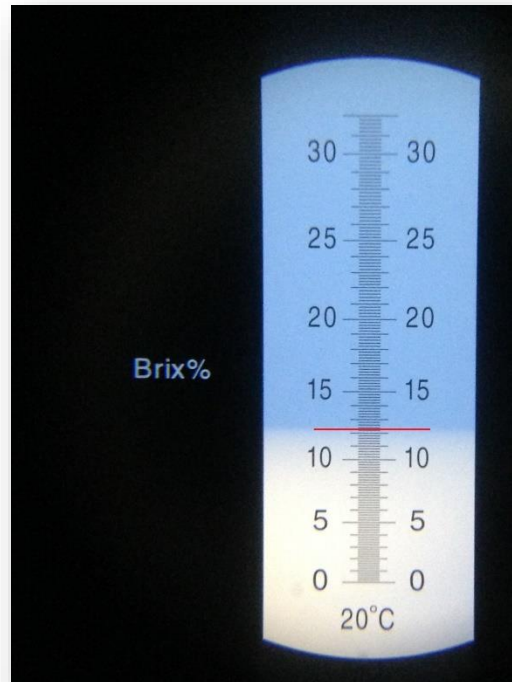
http://www.kruss.com/documents/Applikationsberichte/AP130710_001_Medicion_Brix_en_la_industria_de_bebidas_ES.pdf

¹³⁵ Wee, Young-jung, Jin-nam Kim, and Hwa-won Ryu, 'Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications', *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2006), 163–72.

¹³⁶ Nomura Y, Iwahara M, Hongo M. Lactic acid production by electro dialysis fermentation using immobilized growing cells. *Biotechnol Bioeng.* 1987;30(6):788-793.

de evitar inhibición por altas concentraciones de lactato de calcio y se logró aumentar el pH a un valor de 4,43.

Figura 16. Determinación grados Brix (°Brix).



Con respecto al pH, el valor se encuentra por debajo del pH óptimo de crecimiento de la bacteria ácido láctica entre 5.0 y 6.0, sin embargo, estas bacterias son ácido-tolerantes y pueden crecer hasta un pH de 3.0¹³⁷. Hood y Zottola, estudiaron el efecto del pH en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* a un pH de 2.0, 3.0 y 4.0 determinó que a un pH de 4.0 y 3.0 el número de células no fue reducido significativamente, pero a un pH de 2.0 el número de células disminuyó rápidamente¹³⁸. Según lo anterior, se puede exponer que a pH de 4,43 las células tienen la capacidad de crecer puesto que son ácido-tolerantes desde un pH de 3.0 a 8.0, no se logró subir el pH al rango óptimo de crecimiento con el fin de prevenir la inhibición por lactato de calcio.

La composición del desecho de jugo de piña fue estudiada por Sasaki et al. (1991), en este estudio se determinó un pH de 4, comparando con el obtenido de 4,43 este jugo de piña presentó un pH más próximo a 5 que es el valor óptimo de crecimiento. Con respecto a la determinación de carbohidratos en ese estudio, la piña es rica en

¹³⁷ HOOD, S. K., and E. A. ZOITOLA, 'Effect of Low pH on the Ability of *Lactobacillus Acidophilus* to Survive and Adhere to Human Intestinal Cells', *Journal of Food Science*, 53 (1988), 1514–16.

¹³⁸ *Idib.*, p. 2.

fuentes de carbohidratos, se destaca la sacarosa con una concentración de 40 g/L, glucosa 23,6 g/L y fructosa 14 g/L (ver tabla 2) existe la presencia de otros polisacáridos, pero con concentraciones mínimas. El bajo contenido de otros carbohidratos hace este desecho conveniente en el sentido que no es necesario tratamientos enzimáticos previos para obtener la glucosa libre, en comparación con otros desechos como los residuos de la pulpa de manzana que presenta un alto contenido de polisacáridos para hidrolizar y obtener sus monómeros¹³⁹. Otros desechos amilosos o celulósicos, como el bagazo de yuca, incluso requieren de procesos enzimáticos y tratamientos térmicos previos a la fermentación¹⁴⁰ resultando en mayores costos¹⁴¹.

3.2 FERMENTACIÓN

La fermentación se realizó en 108 horas, con el fin de lograr observar las diferentes fases de crecimiento microbiano de un proceso por lotes. La temperatura fue de 36°C, la cual está entre el rango de temperaturas óptimas de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* de 35 a 40°C. El pH del medio fue de 4,43 y el pH óptimo esta entre 5,5 y 6,0 se puede observar que el pH del medio se encuentra fuera del rango óptimo, lo cual en la mayoría de los bioprocesos afectaría la producción del metabolito por muerte microbiana en valores fuera del rango, y el pH final fue 4,0 el valor del pH disminuye por la producción de ácido láctico en el medio. Sin embargo, los lactobacilos son bacterias ácido-tolerantes y soportan pH menores que otros géneros por ejemplo el microorganismo *Ent. Faecium* crece a un pH de 6,2 mientras que *Lb. Delbrueckii* ó *Lb. Rhamnosus* crecen a un pH de 4,2¹⁴².

En el anexo A se encuentran los cálculos para realizados de la cantidad de agar MRS que se utilizó, para la preparación de una solución de cloruro de sodio al 1% y de las diluciones para la siembra.

La cantidad de ácido láctico producida por *Lactobacillus acidophilus* utilizando residuos de piña como sustrato fue de 58,7 g/L, este valor es similar al obtenido por

¹³⁹ Gullon, Beatriz, Gil Garrote, José Luis Alonso, and J. C. Parajó, 'Production of L-Lactic Acid and Oligomeric Compounds from Apple Pomace by Simultaneous Saccharification and Fermentation: A Response Surface Methodology Assessment', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007), 5580–87

¹⁴⁰ John, Roan P., K. Madhavan Nampoothiri, and Ashok Pandey, 'Solid-State Fermentation for L-Lactic Acid Production from Agro Wastes Using *Lactobacillus Delbrueckii*', *Process Biochemistry*, 41 (2006), 759–63

¹⁴¹ Overberg C, Hofvendahl K, Zacchi G, H. "Gerdal B. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid Concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ATCC 19435 in whole wheat flour. *Apple Microbiol Biotechnol* 49, 90 (1998).

¹⁴² HOFVENDAHL, Karin, and HAHN–Hägerdal, Bärbel. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable resources. En: *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, vol. 67. p. 87–107.

Demirci y Pometto¹⁴³, ellos evaluaron la producción de ácido láctico por *Lb. delbrueckii sp. delbrueckii* ATCC 9649 utilizando glucosa como sustrato se produjo 58 g/L de ácido láctico, Olmos et al¹⁴⁴ obtuvieron 57 g/L de ácido láctico fermentado por *Lactobacillus casei ssp. Rhamnosus* usando glucosa como sustrato con una concentración inicial de glucosa de 10 g/L estos resultados muestran semejanza de resultados obtenidos en el presente estudio, en la tabla 10 se presentan varias referencias similares.

Tabla 10. Cantidad de ácido láctico reportado por diferentes trabajos.

Microorganismo	Sustrato	LA (g/L)	Referencia
<i>Lb. Delbrueckii</i> <i>sp. Lactis 447</i>	Maíz Lignocelulósico hidrolizado	55	Melzoch et al. ¹⁴⁵
<i>Lb. Amylovorus</i> ATCC 33622	Maíz liquido	55	Zhang et al. ¹⁴⁶
<i>Lb. Rhamnosus</i> ATCC 11443	Glucosa	53	Ho et al. ¹⁴⁷
<i>Lb. acidophilus</i>	Glucosa	58,7	En el presente trabajo

En las referencias consultadas la mayoría de las fermentaciones se realizaron a 35-45°C y pH entre 5.0 y 6.0, a diferentes concentraciones de sustrato sin embargo los valores son semejantes al del presente trabajo, no se encontraron trabajos que utilicen la bacteria *Lactobacillus acidophilus* que es lo innovador de este proyecto y se utiliza con frecuencia glucosa como sustrato, sin embargo, se utiliza también suero de leche, maíz y lactosa como sustrato.

¹⁴³ Demirci A, Pometto AL. Enhanced Production of D(-)-Lactic Acid by Mutants of *Lactobacillus-Delbrueckii* Atcc-9649. *J Ind Microbiol.* 1992;11(1):23-28.

¹⁴⁴ Olmos-Dichara a., Ampe F, Uribe Larrea J-L, Pareilleux a., Goma G. Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and Tryptone enrichment. *Biotechnol Lett.* 1997;8(8):709–714.

¹⁴⁵ Melzoch K, Votruba J, Hábová V, Rychtera M. Lactic acid production in a cell retention continuous culture using lignocellulosic hydrolysate as a substrate. *J Biotechnol.* 1997;56(1):25-31.

¹⁴⁶ Zhang DX, Cheryan M. Direct fermentation of starch to lactic acid by *Lactobacillus amylovorus*. *Biotechnol Lett.* 1991;13(10):733-738.

¹⁴⁷ Ho KL, Pometto AL, Hinz PN. Optimization of L-(+)-lactic acid production by ring and disc plastic composite supports through repeated-batch biofilm fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(7):2533-2542.

3.3 CRECIMIENTO MICROBIANO

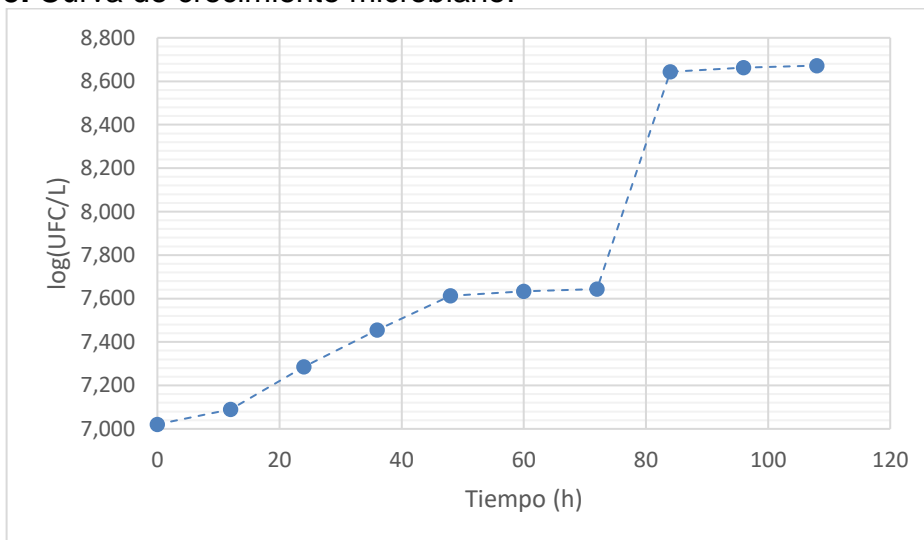
La tabla 11 muestra los resultados del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en piña, se determinaron a partir del recuento en placa del número de colonias y el cálculo de las UFC/mL se encuentra en el anexo B.

Tabla 11. Resultados crecimiento microbiano.

Tiempo (h)	UFC/mL	UFC/L	log(UFC/L)
0	1,05E+04	1,05E+07	7,021
12	1,23E+04	1,23E+07	7,090
24	1,93E+04	1,93E+07	7,286
36	2,85E+04	2,85E+07	7,455
48	4,10E+04	4,10E+07	7,613
60	4,30E+04	4,30E+07	7,633
72	4,40E+04	4,40E+07	7,643
84	4,40E+05	4,40E+08	8,643
96	4,60E+05	4,60E+08	8,663
108	4,70E+05	4,70E+08	8,672

Al graficar los datos de la tabla 11 se logró observar las fases de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*.

Gráfica 5. Curva de crecimiento microbiano.



Se observa una pequeña fase de adaptación entre las 0 y 12 horas donde el crecimiento es lento puesto que el microorganismo se está adaptando al nuevo medio, luego de adaptada la célula empieza la fase exponencial entre las 12 y 48

horas en donde la reproducción de las bacterias se genera, y luego una fase estacionaria de 48 a 72 donde a la población microbiana se le están agotando los azúcares simples y finalmente una diaúxia entre 72 y 84, donde el microorganismo logra romper los azúcares más complejos y aprovecharlos según lo indicado en Shuler et al.¹⁴⁸.

Además, se observa que en la hora 48 el microorganismo ha alcanzado su crecimiento máximo, lo que concuerda con los resultados observados por Rooj et al.¹⁴⁹ y por Guillen y Vega¹⁵⁰ los cuales identificaron el crecimiento máximo en la misma hora y presentan en sus reportes un crecimiento diaúxico para *Lactobacillus acidophilus* en las horas 48 y 84. Se muestran las coincidencias con otros trabajos, y las similitudes con el trabajo por Guillen et al., determinando un comportamiento de crecimiento diaúxico por parte de la biomasa.

3.4 DETERMINACIÓN CONSUMO DE SUSTRATO

Se logró realizar la cuantificación de azúcares reductores presentes en las muestras aplicando el método de Miller¹⁵¹ usando el ácido 3,5 dinitrosalicílico, resultó ser un método fácil y efectivo para la determinación de las concentraciones de azúcares reductores en el sustrato de piña para esto se necesitó realizar una curva de calibración para luego realizar la cuantificación de los azúcares y los resultados se muestran a continuación.

3.4.1 Curva de calibración de glucosa. Luego de preparar las soluciones de glucosa y hacerlas reaccionar con el reactivo DNS, se procedió a medir las absorbancias de las soluciones de glucosa de 0,5, 0,7, 1, 1,5, 1,7 y 2 g/L en un espectrofotómetro y graficar los resultados (Gráfica 6). La curva de calibración se realizó para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras de caldo fermentado y lograr cuantificar y monitorear los azúcares presentes durante el proceso de fermentación.

La medición de la absorbancia se realizó en un rango de 0 a 1, el valor 0 indica que no se absorbe nada de luz y 1 indica que absorbe toda la luz, sin embargo, algunas soluciones daban valores mayores a 1 por lo tanto, se realizaron diluciones de las soluciones de glucosa 1/10 con el fin de que la lectura de la absorbancia estuviera entre el rango de valores.

¹⁴⁸ Shuler ML, Kargi F. Bioprocess engineering: Basic concepts. J Control Release. 2002:293.

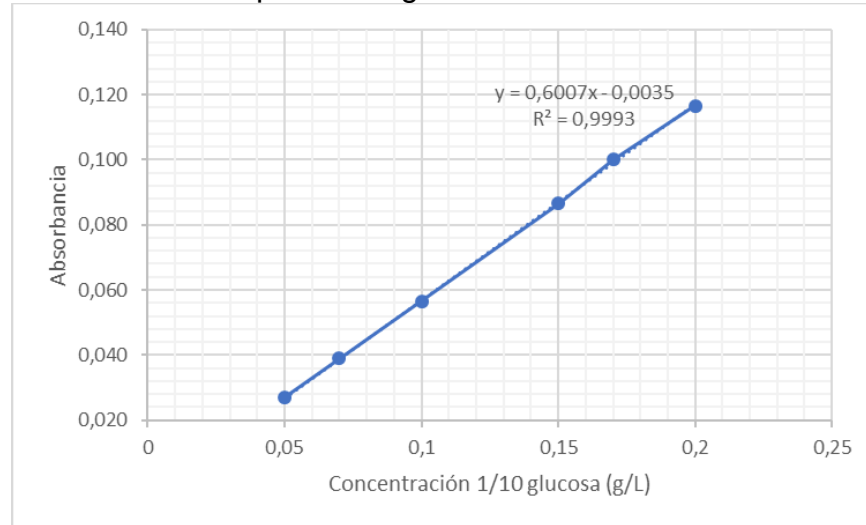
¹⁴⁹ Rooj AK, Kimura Y, Buddington RK. Metabolites produced by probiotic Lactobacilli rapidly increase glucose uptake by Caco-2 cells. BMC Microbiol. 2010; 10:16.

¹⁵⁰ GUILLÉN, Laura., y VEGA J. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (ananas comosus merr.) Y banano (musa sapientum) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. 2013.

¹⁵¹ Miller, Gail Lorenz, 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', Analytical Chemistry, 31 (1959), 426–28

Al graficar los datos y determinar la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación (R^2), se observa un valor igual a 0,9993. Un coeficiente de correlación cercano a 1 indica perfecta correlación de los datos al relacionar la concentración con la absorbancia y alta confiabilidad en los datos obtenidos, así como un procedimiento experimental efectivo al momento en que se prepararon las soluciones de análisis, es decir, en las cantidades estipuladas, protegiendo las muestras de la luz natural y agregando las cantidades estipuladas.

Gráfica 6. Curva patrón de glucosa.

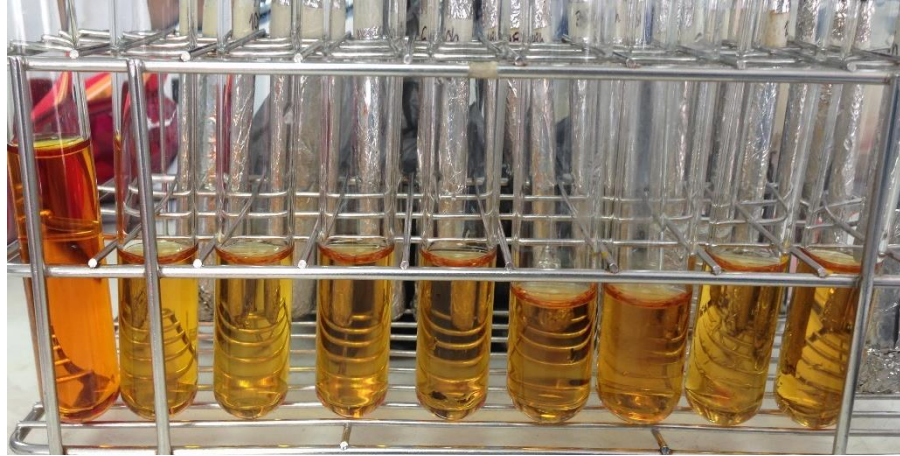


La ecuación de la recta obtenida por regresión lineal de los datos en la gráfica 1 es la herramienta esencial para la determinación de la concentración de azúcares reductores en las muestras de caldo de fermentación, se despejó la variable de concentración en función de la absorbancia, siendo la variable 'x' la concentración y la variable 'y' la absorbancia.

$$x = \frac{y + 0,035}{0,6007} \quad (18)$$

3.4.2 Determinación de azúcares reductores del sustrato de piña. Se procedió a medir las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro (ver figura 17).

Figura 17. Muestras con DNS para lectura en espectrofotómetro.



Los resultados de la determinación de las concentraciones de azúcares reductores para cada muestra respecto al tiempo utilizando el método DNS se obtuvieron aplicando la ecuación de la regresión lineal (1) en la cual se despejó la variable concentración y se reemplazaron los valores de las absorbancias alcanzadas a una longitud de onda de 540 nm¹⁵². Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados de Absorbancias y Concentración de sustrato (S).

Tiempo (h)	Absorbancia	S/10 ⁻¹ (g/L)	S (g/L)
0	0,245	0,465	4,655
12	0,238	0,454	4,538
24	0,224	0,430	4,305
36	0,218	0,421	4,205
48	0,209	0,406	4,055
60	0,201	0,392	3,922
72	0,191	0,376	3,756
84	0,145	0,299	2,990
96	0,134	0,281	2,807
108	0,132	0,277	2,773

En las muestras las concentraciones de azúcares reductores tienen un máximo de 4,655 g/L al inicio de la fermentación y finaliza con una concentración mínima de 2,773 g/L en la hora 108. Asimismo, se puede apreciar que la concentración disminuye al aumentar el tiempo, desde el punto de vista microbiológico, esto indica que las bacterias están consumiendo el sustrato como fuente de energía para

¹⁵² Gusakov A V., Kondratyeva EG, Sinitsyn AP. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. Int J Anal Chem. 2011;2011:1-4.

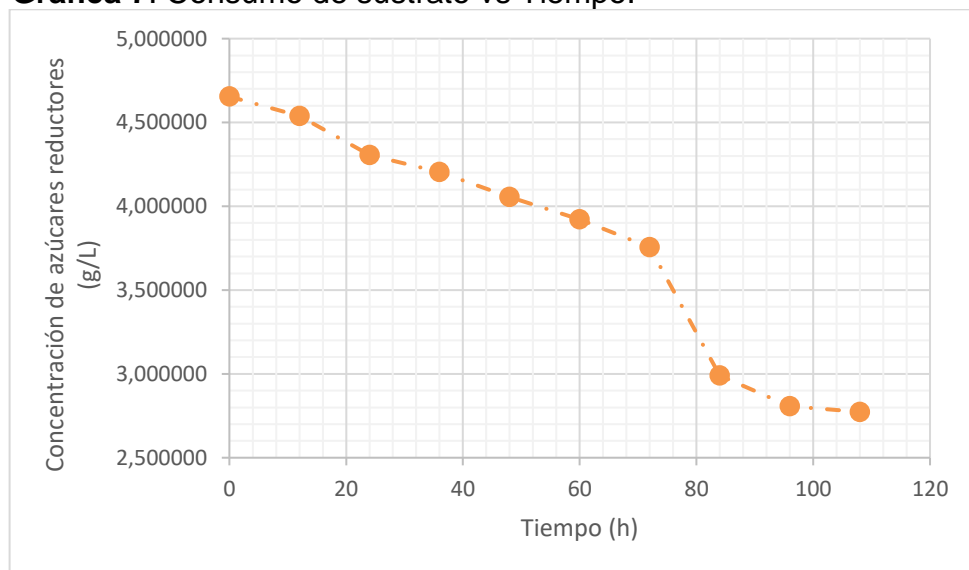
producir los compuestos por vía metabólica, por lo tanto, los valores obtenidos cumplen con esta teoría.

Por otra parte, el consumo de azúcares reductores (glucosa y fructosa) entre 0 y 12 horas no se aprecia significativamente, pero desde la hora 12 se empieza observar un consumo mayor y más uniforme de los azúcares reductores por *Lactobacillus acidophilus* para convertirlo en ácido láctico.

La bacteria *Lactobacillus acidophilus* es una bacteria homofermentativa que utiliza la vía de Embde-Meyerhof-Parnas, la glucosa siempre será consumida primero para la generación de ácido láctico, las bacterias primero buscan degradar los sacáridos más simples, una vez los consuma en su totalidad, buscara degradar azúcares más complejos lo que conlleva a una nueva adaptación ya se requiere de enzimas adicionales para cambiar de ruta metabólica (crecimiento diaúxico)¹⁵³. Cabe la posibilidad de que la bacteria sea capaz de descomponer glucosa y fructosa al tiempo, esta última mediante una fosforilación al nivel de fructosa-6-fostato, mediante la enzima hexoquinasa¹⁵⁴.

La gráfica 7 muestra la curva de la concentración de azúcares reductores respecto al tiempo para cada muestra.

Gráfica 7. Consumo de sustrato vs Tiempo.



¹⁵³ Shuler, Michael L., and Fikret Kargi, 'Bioprocess Engineering: Basic Concepts', Journal of Controlled Release, 2002, 293.

¹⁵⁴ AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S.; Von Wright, A. & Ouwehand, A. Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects. 2004. 3 ed. Marcel-Dekker, Nueva York.

Con relación al consumo de sustrato (gráfica 7), se observa que disminuye de 4,655 a 2,773 g/L y es el resultado del aprovechamiento de los azúcares por parte de *Lactobacillus acidophilus*. El residuo líquido de piña es caracterizado por ser un medio complejo con más de un medio nutricional (ver tabla 2). *Lactobacillus acidophilus* es capaz de descomponer glucosa, fructosa y sacarosa (ver sección 1.5.1) sin embargo, las bacterias descomponen de medios simples a complejos. Kompala et al.¹⁵⁵ reportaron un crecimiento diaúxico en glucosa y xilosa con xilosa como el sustrato menos preferido por la bacteria. Durante la fase de crecimiento (0-48 h) la glucosa que es el azúcar más simple es el primero en ser descompuesto por la bacteria luego la fructosa, en la hora 72 puede haberse presentado la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, mediante enzimas presentes en la bacteria, lo que pudo ocasionar un cambio en la pendiente y el aprovechamiento de la sacarosa en forma de glucosa y fructosa.

En el anexo C se presenta el cálculo del porcentaje de conversión del sustrato y el rendimiento de sustrato en biomasa. El porcentaje de conversión indica la conversión indica la fracción de la alimentación que se convierte en producto. En este caso se obtuvo que el 40,430% de sustrato se convierte en producto. Por otro lado, el rendimiento del sustrato en biomasa indica la relación de biomasa obtenida y el sustrato consumido. El rendimiento obtenido fue de $4,782 \times 10^{-4}$ g de biomasa/g de sustrato. Este resultado podría ser debido a que los rendimientos de sustrato bajo condiciones anaerobias o con bajo porcentaje de oxígeno son mucho menores favoreciendo la producción de metabolitos sobre la biomasa.¹⁵⁶

Al graficar los datos de crecimiento microbiano con los de consumo de sustrato se obtuvo la gráfica 8.

En la gráfica 8 se comparó el comportamiento del crecimiento microbiano y el consumo de sustrato. Dado que el microorganismo necesita degradar el medio para convertirlo en ácido láctico, se observa que al aumentar el crecimiento disminuye la concentración de sustrato, durante la fase de crecimiento exponencial de 0-48 h, se muestra una disminución constante de la concentración de sustrato, de 48 a 60 el crecimiento microbiano no aumenta significativamente se especula que agotó su principal fuente de carbono (glucosa), en algunos casos las bacterias necesitan cierto tiempo de adaptación en un medio para hidrolizar los enlaces de los carbohidratos por medio de enzimas, lo que ocasiona un crecimiento lento mientras ocurre esta adaptación¹⁵⁷. Así, la bacteria pudo empezar a hidrolizar la sacarosa en

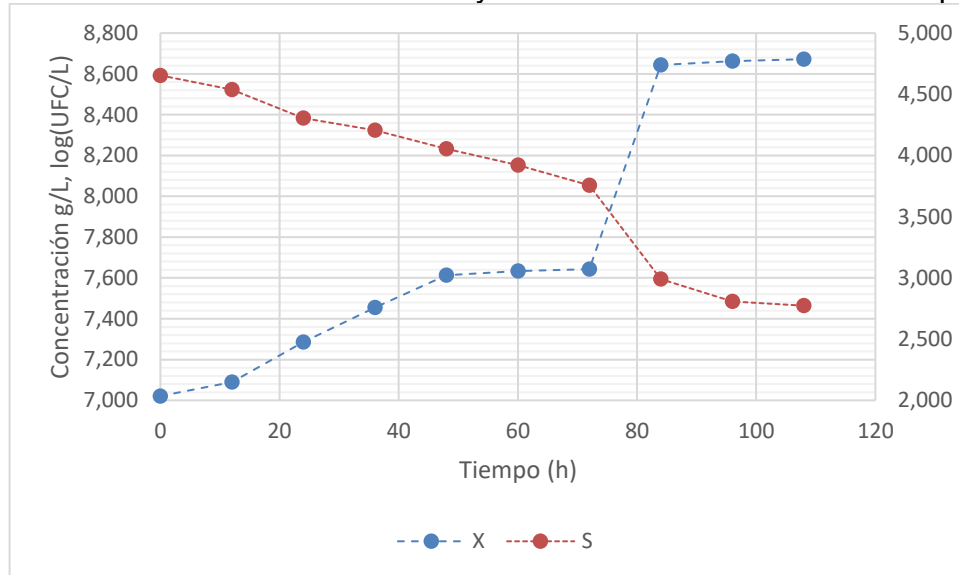
¹⁵⁵ Kompala DS, Ramkrishna D, Jansen NB, Tsao GT. Investigation of bacterial growth on mixed substrates: Experimental evaluation of cybernetic models. *Biotechnol Bioeng.* 1986;28(7):1044-1055.

¹⁵⁶ HOFVENDAHL, Karin, and Bärbel Hahn-Hägerdal, 'Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable resources1', *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2000), 87-107.

¹⁵⁷ BENINTENDE, Silvia. Crecimiento bacteriano. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en:

glucosa y fructosa de la hora 72 a 84, evidenciando un cambio de pendiente tanto para el crecimiento microbiano como para el consumo de sustrato, finalmente, de 84 a 108 h el crecimiento no aumenta significativamente.

Gráfica 8. Consumo de sustrato y crecimiento microbiano vs tiempo.



No se logró observar la fase de muerte de la bacteria, tampoco el consumo total de sustrato, sin embargo, Mussatto et al y Monteagudo et al¹⁵⁸, concluyen en sus investigaciones que así no se consume en su totalidad el sustrato, obtuvieron ácido láctico en altas cantidades.

Trabajos como el de Jyoti et al.¹⁵⁹ y Dhinakar et al.¹⁶⁰ presentan crecimiento diaúxico causado por medios con mezcla de sustratos. Jacques Monod descubrió en 1940 el fenómeno del crecimiento diaúxico, uso *Escherichia coli* con una mezcla de glucosa y lactosa, él observa el consumo total de la glucosa primero, luego deja de crecer (tiempo de retraso) mientras se inducen las enzimas que son capaces de degradar la lactosa antes de reanudar el crecimiento a un ritmo más lento y luego es usada la lactosa como fuente de carbono¹⁶¹. Finalmente, en la gráfica 8 se

http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf

¹⁵⁸ RIOS, Amelia. Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando de tecnología de membrana. Trabajo de grado. Universidad autónoma de Querétaro. México. 2011. P. 1-113.

¹⁵⁹ Jyoti BD, Suresh AK, Venkatesh K V. Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003;19(5):509-514.

¹⁶⁰ Kompala DS, Ramkrishna D, Jansen NB, Tsao GT. Investigation of bacterial growth on mixed substrates: Experimental evaluation of cybernetic models. *Biotechnol Bioeng.* 1986;28(7):1044-1055.

¹⁶¹ PLUMBRIGE, J. Regulation of carbon assimilation in bacteria. En *encyclopedia of microbiology*. 3 ed. 2009. p. 375-394.

evidenció un comportamiento diaúxico en las horas 48 y 84, causado por la degradación de más de un sustrato.

3.5 PARÁMETROS CINÉTICOS

La tabla 13 presenta las estimaciones de los parámetros cinéticos calculados por regresión no lineal en MATLAB a partir de los modelos cinéticos presentados en la sección 1.7. Los 5 modelos evaluados son capaces de describir las fases de latencia y la fase exponencial, lo evidencian trabajos como Mat Don et al.¹⁶², Trejos et al.¹⁶³, Åkerberg et al.¹⁶⁴, Gonçalves et al.¹⁶⁵, en el presente trabajo se presentan las fases de latencia y exponencial por consiguiente se toman todos los datos experimentales.

El valor de $Y_{x/s}$ corresponde al rendimiento teórico de biomasa en sustrato y debe ser mayor al rendimiento observado es de $4,782 \times 10^{-4}$ g de biomasa/g sustrato consumido.

Tabla 13. Valores estimados de los parámetros cinéticos.

Modelo	Ki (g/L)	Ks (g/L)	$Y_{x/s}$ (gx/gs)	μ_{max} (1/h)	(R) ²
Monod	-	99,98	0,235	0,464	0,987
Andrews	7,083	7,027	0,163	0,065	0,973
Edwards	32,580	0,0597	0,038	0,0511	0,975
Inhibición no competitiva	171,454	4,178	2,401	0,0941	0,667
Inhibición Competitiva	0,333	1,397	0,146	0,0774	0,973

El valor de K_s corresponde a la constante de saturación, es ese valor de la concentración de sustrato para la cual la velocidad específica de crecimiento es igual a la mitad de la velocidad máxima de crecimiento¹⁶⁶. Los valores de K_s varían dependiendo el modelo a utilizar, se aprecian altos valores de este parámetro para

¹⁶² NF. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochem Eng J.* 2010;49(1):95-103.

¹⁶³ Trejos VM, Alzate JF, Garcia M a G. Mathematical description and stability analysis of fermentative processes. Descripción matemática y análisis Estab procesos Ferment. 2009; 76:111-121.

¹⁶⁴ Åkerberg C, Hofvendahl K, Zacchi G H "Gerdal B. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ATCC 19435 in whole wheat flour. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998;49(682):90.

¹⁶⁵ Gonçalves LMD, Xavier AMRB, Almeida JS, Carrondo MJT. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microb Technol.* 1991;13(4):314-319.

¹⁶⁶ Fu W, Mathews AP. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem Eng J.* 1999;3(3):163-170.

el modelo de Monod, que según Duarte¹⁶⁷ su significado biológico indica que la glucosa es una de las fuentes de carbono “preferidas” por el microorganismo.

Altiook et al. reporta valores de K_s de trabajos anteriores para diferentes microorganismos con el sustrato utilizado, cuando el sustrato es glucosa, los valores de K_s están en un rango entre 0,09 y 0,7, por ejemplo, el valor de K_s usando *Lb. casei*¹⁶⁸ es de 0,203 g/L, y usando *L. delbrueckii*¹⁶⁹ es de 0,0967 g/L y μ_{max} es 0,0696 similar al valor obtenido en este trabajo usando el modelo de Edwards con un valor de K_s de 0,0597 g/L y de μ_{max} de 0,0511.

El valor de K_i indica la potencia de una fuente inhibitoria, y es la concentración requerida de sustrato para producir la mitad de la inhibición máxima¹⁷⁰. Se puede decir que en los resultados obtenidos por Edwards un K_i a una concentración de sustrato de 32, 58 g/L inhibirá la mitad de la inhibición máximo. Por otro lado, si $K_i \ll S$, no hay presencia de inhibición en el sistema, puedo que la inhibición se produce a altas concentraciones de sustrato.

Se investigó diferentes propuestas de modelos como alternativa a la ecuación de Monod, que proporcionaron corrección para la inhibición del sustrato los modelos de Andrews, Edward, Inhibición competitiva y no competitiva. De acuerdo con el ajuste realizado los valores de μ_{max} presentan un rango entre 0,0511 y 0,4636 h⁻¹. Sin embargo, para los modelos de Andrews y Edwards resultaron ser valores muy similares 0,06 y 0,05 h⁻¹ respectivamente. El modelo no competitivo brinda valores similares de μ_{max} pero con un menor grado de ajuste, este valor indica la velocidad máxima con la que crece la bacteria.

Comparando los valores obtenidos con investigaciones similares, los valores de μ_{max} determinados en este trabajo se pueden relacionar con los valores observados por Idris et al.¹⁷¹, en el cual utilizaron residuo liquido de piña para la producción de LA por *Lb. Delbrueckii* con un valor de 0,0903 h⁻¹ para la tasa máxima de

¹⁶⁷ DUARTE, Alberto, 'Evaluación de Los Parámetros Cinéticos de La Ecuación de Monod', Ingeniería E Investigación, 1996, 123–38.

¹⁶⁸ Pinelli D, Gonzalez-Vara A, Matteuzzi Dand Magelli F, Assessment of kinetic models for the production of L- and D-lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* DMS 20011 and *Lactobacillus coryniformis* DMS 20004 in continuous fermentation, citado por ALTIOK, Duygu., TOKATLI, Figen., and HARSA, Sebnem. Kinetic Modelling of Lactic Acid Production from Whey by *Lactobacillus Casei* (NRRL B-441). En: Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2006. Vol. 81. p. 1190–97.

¹⁶⁹ Dutta SK, Mukherjee A and Chakraborty P, Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: simulation and modelling, citado por ALTIOK, Duygu., TOKATLI, Figen., and HARSA, Sebnem. Kinetic Modelling of Lactic Acid Production from Whey by *Lactobacillus Casei* (NRRL B-441). En: Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2006. Vol. 81. p. 1190–97.

¹⁷⁰ London's global university. Enzyme inhibitors. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/inhibition.htm>

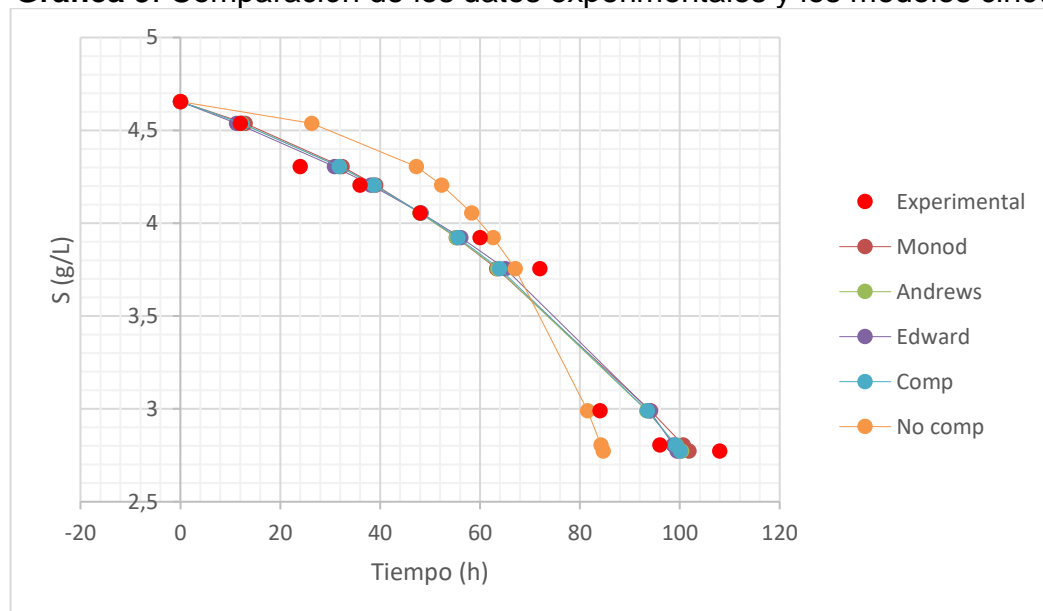
¹⁷¹ Idris A, Suzana W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochem. 2006;41(5):1117-1123.

crecimiento similar al determinado en este trabajo es el no competitivo. En este mismo trabajo reportan un valor de K_s de 9,26 g/L, aproximado al 7,027 g/L del modelo de Monod en este trabajo. Juárez et al.¹⁷² emplea *Lb. Acidophilus* para la producción de LA, a una temperatura de 37°C reporta un valor de μ_{max} de 0,41 h⁻¹, análogo al determinado por Monod en este trabajo de 0,46 h⁻¹. Se puede señalar que la especie *Lb. Delbrueckii* presenta valores de los parámetros similares a los de este estudio utilizando *Lb. Acidophilus*.

En este trabajo se obtuvieron valores más altos para K_s comparados con las referencias mencionadas anteriormente, ya que tanto μ_{max} como K_s dependen del tipo de microorganismo, las condiciones de crecimiento, condiciones de operación como temperatura y pH. Por lo anterior, se puede decir que la diferencia entre los valores reportados por otros investigadores y el presente se atribuye a diferencias en las condiciones de fermentación.

La comparación entre los datos experimentales y los resultados por los modelos que muestran los ajustes de los datos experimentales por los modelos se muestran en la gráfica 9.

Gráfica 9. Comparación de los datos experimentales y los modelos cinéticos



Se logró observar el ajuste de los datos experimentales, en el rango de 0 a 48 horas los modelos logran describir el comportamiento del consumo de sustrato con valores cercanos a los datos experimentales, luego de las 48 horas se evidencia la desviación de los datos experimentales a los modelos, como se observó en la

¹⁷² Juárez MSJ, Ocaña VS, Wiese B, Nader-Macías ME. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2003;52(12):1117-1124.

gráfica 5 del crecimiento microbiano el crecimiento máximo alcanzado por la bacteria se dio aproximadamente a las 48 y 84 horas (crecimiento diaúxico).

Por otro lado, se observa que las curvas de los modelos pasan sobre la misma curva, es decir que los valores calculados son muy parecidos entre sí, sin embargo, algunos parámetros cinéticos varían significativamente. El modelo por inhibición no competitiva resultó ser el modelo que menos se ajusta a los datos experimentales con relación a los demás, además no se aproxima a los otros modelos evaluados. Sin embargo, los valores de los parámetros obtenidos por el modelo de Edwards fueron los de mayor similitud con respecto a los estudios comparativos precedentemente.

Los datos experimentales en la tabla 12 fueron ajustados en las ecuaciones (10) a (14), obteniéndose los parámetros presentados en la tabla 13. La grafica 9 muestra que los modelos cinéticos evaluados predicen satisfactoriamente los datos experimentales con coeficientes de correlación mayores a 0,9 y un valor por debajo de 0,9.

De acuerdo con Annuar et al¹⁷³, el coeficiente de correlación (R^2) es frecuentemente utilizado para juzgar si el modelo representa correctamente los datos, lo que implica que, si el coeficiente de correlación está cerca de uno, entonces el modelo de regresión es de alta correlación. Se obtuvo un R^2 para el modelo de inhibición no competitiva igual a 0,667 se puede decir que este modelo no representa correctamente los datos experimentales porque el coeficiente de correlación no es cercano a 1, por consiguiente, las suposiciones sobre este modelo y el mecanismo propuesto no se ajusta al sistema usado. El modelo de inhibición competitiva presenta un R^2 de 0,973, es un coeficiente cercano a la unidad sin embargo el K_i es igual a 0,333, sin embargo, si K_i es menor a la concentración de sustrato ($K_i < S$) no se presenta inhibición¹⁷⁴, por lo tanto, se puede decir que en el sistema no se presenta inhibición competitiva. El modelo de Monod brindó un coeficiente de determinación de 0,987 y si bien es capaz de describir los datos experimentales como se observa en la gráfica 9, el modelo de Monod se vuelve insatisfactorio cuando hay presencia de inhibición¹⁷⁵, a no ser que al modelo se le aplique una corrección por inhibición de sustrato incorporando la constante K_i ¹⁷⁶, de lo contrario el modelo no predice correctamente los datos experimentales, de modo que este modelo no predice correctamente los datos experimentales del presente estudio.

¹⁷³ M.S.M. Annuar, I.K.P. Tan, S. Ibrahim, K.B. Ramachandran, A kinetic model for growth and biosynthesis of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*, Braz. J. Chem. Eng. 25 (2) (2008) 217–228.

¹⁷⁴ Shuler ML, Kargi F. Bioprocess engineering: Basic concepts. J Control Release. 2002:293.

¹⁷⁵ Don MM, Shoparwe NF. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. Biochem Eng J. 2010;49(1):95-103.

¹⁷⁶ ALTIOK, Duygu., TOKATLI, Figen., and HARSA, Sebnem. Kinetic Modelling of Lactic Acid Production from Whey by *Lactobacillus Casei* (NRRL B-441). En: Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2006. Vol. 81. p. 1190–97.

El modelo de Andrews brindó un coeficiente de determinación de 0,973 y si bien es capaz de describir los datos experimentales como se observa en la gráfica 9, el mayor coeficiente de determinación fue del modelo de Edwards con un valor de 0,975 indicando alta correlación con los datos experimentales, además en el análisis realizado anteriormente los parámetros cinéticos del modelo de Edwards son los que mejor se asemejan a los parámetros reportados en otras investigaciones que realizan ajuste modelos de este tipo, debido a lo cual el modelo de Edwards es el que mejor se ajusta a sistema *Lactobacillus acidophilus* y residuos de piña para la producción de ácido láctico con una constante de saturación K_s igual a 0,0587 g/L que indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad específica de crecimiento es igual a la mitad de la velocidad máxima específica, una constante de inhibición de 32,58 g/L que indica la concentración de sustrato a la cual se produce la mitad de la inhibición máxima, una velocidad máxima de crecimiento de 0,0511 h^{-1} y fue la máxima velocidad de multiplicación alcanzada por la bacteria y un coeficiente de rendimiento de 0,038 gramos de biomasa sobre gramos de sustrato consumido.

4. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una fermentación experimental por lotes para el sistema *L. acidophilus* y residuos de jugo de piña como sustrato a una temperatura de 36 °C, con agitación continua a 160 rpm por 108 horas, el pH inicial se fijó en 4,43 y el pH final fue de 4,0 debido a la producción de ácido láctico, la cantidad de LA producido fue de 58,7 g/L valor similar al obtenido en otras investigaciones que producen ácido láctico usando diferentes fuente de carbono o microorganismo, Se determinaron las unidades formadoras de colonias por litro entre $1,05 \times 10^7$ y $4,70 \times 10^8$ UFC/L, se observó un crecimiento diaúxico por parte de la bacteria ácido láctica en la hora 48 y 84.
- Se determinó el consumo de sustrato por parte de *Lactobacillus acidophilus* mediante un procedimiento experimental para la determinación de azúcares reductores en residuos de piña por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico para la fermentación realizada inició en 4,655 g/L y finalizó en 2,773 g/L, con lo cual se comprobó el consumo y el aprovechamiento de glucosa, fructosa y sacarosa en piña evidenciado por el crecimiento diaúxico de la bacteria ácido láctica, se determinó la conversión de sustrato con un valor de 40,43%.
- Se ajustaron cinco modelos cinéticos no estructurados no segregados al consumo de sustrato, con lo cual se comprobó la capacidad para representar los datos experimentales en la fermentación, en el proceso de fermentación por lotes. Se seleccionó el modelo cinético propuesto por Edwards ya que se ajusta a los datos experimentales de la fermentación por parte de *Lactobacillus acidophilus* y residuos de piña para la producción de ácido láctico con una constante de saturación K_s igual a 0,0587 g/L que indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad específica de crecimiento es igual a la mitad de la velocidad máxima específica, una constante de inhibición de 32,58 g/L que indica la concentración de sustrato a la cual se produce la mitad de la inhibición máxima, una velocidad máxima de crecimiento de $0,0511 \text{ h}^{-1}$ y fue la máxima velocidad de multiplicación alcanzada por la bacteria y un coeficiente de rendimiento de 0,038 gramos de biomasa sobre gramos de sustrato consumido, además se compararon los parámetros cinéticos de los modelos con los parámetros reportados en otras investigaciones, observando que los parámetros cinéticos del modelo de Edwards son los que mejor se asemejan a los parámetros reportados en otras investigaciones. La aplicación de método integral y regresión con base al comportamiento mostrado en los datos experimentales evidencio un ajuste adecuado de los datos y se obtuvo el coeficiente de determinación con un valor de 0,975 indicó alta correlación con los datos experimentales.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización química del jugo de piña detallado con el fin de determinar que otras sustancias puede estar presentes en ella.
- Se recomienda realizar una hidrólisis de los azúcares del medio de piña antes de la fermentación para aprovechar en mayor medida la concentración de estos.
- Evaluar el efecto de variables de fermentación a diferentes concentraciones iniciales de sustrato.
- Se propone realizar un modelo con mayor especificidad sobre las rutas metabólicas que posee la bacteria, con el fin de comprender mejor el desarrollo metabólico en las diferentes etapas de abundancia o escases de los sustratos, así como por variación de la relación carbono/nitrógeno que modifican drásticamente el comportamiento bacteriano.
- Controlar el pH, grados Brix y concentración de oxígeno disuelto durante la fermentación, con el fin de reducir el riesgo de muerte microbiana o inhibición.
- Usar otra solución buffer como fosfato de amonio o hidróxido de amonio.
- Medir la cantidad de azúcares totales del medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

ÅKERBERG C., HOFVENDAHL K., ZACCHI G. y HAHN–HaGerdal B. Modelling the Influence of pH, temperature, glucose and Lactic Acid Concentrations on the Kinetics of Lactic Acid Production by *Lactococcus Lactis Spp. Lactis* ATCC 19435 in Whole-Wheat Flour. En: Appl Microbiol Biotechnol. 1998. Vol. 49. p. 682-690.

ALCÓN MARTÍN, Almudela. Desarrollo de Modelos Cinéticos Para Bioprocesos: Aplicación a La Producción de Xantano. Trabajo de grado. Madrid.: Universidad complutense de Madrid. 1999. 471 p.

ALTIOK, Duygu., TOKATLI, Figen., and HARSA, Sebnem. Kinetic Modelling of Lactic Acid Production from Whey by *Lactobacillus Casei* (NRRL B-441). En: Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2006. Vol. 81. p. 1190–97.

ANDERSON, M., CALDERON, V. Microbiología alimentarioa: metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial diaz de santas SA. 2 ed. 1999. p. 12.

ANDREWS, John F. A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates. En: Biotechnology and Bioengineering. 1968. vol. 10. p. 707–23.

ARIAS VELÁZQUEZ, Ciro J., Y, and TOLEDO HEVIA. Julio. 'Manual de Manejo Postcosecha de Frutas Tropicales (Papaya, Piña, Plátano, Cítricos). En: Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación (FAO), 1 (2007), 50.

ARIAS, Mario., HENAO, Lina. y CASTRILLÓN, Yulieth. Lactic Acid Production by Fermentation of Coffee Mucilage with *Lactobacillus Bulgaricus* NRRL-B548. En: DYNA. 2009. Vol. 158. p. 147–53.

ÁVILA, Ramona., Bernarda RIVAS, Rómulo y HERNÁNDEZ, and Marluy CHIRINOS. Contenido de Azúcares Totales , Reductores Y No Reductores En Agave Cocui Trelease. En: Multiciencias. 2012. Vol. 12, no. 2. 129–35.

BARRERA, J.A., HERNÁNDEZ, M., PÁEZ, D., OVIEDO, E. y ROMERO, H. 2004. Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia Colombiana. Universidad de la Amazonía. Florencia- Caquetá. Promedios. p. 64.

BENINTENDE, Silvia. Crecimiento bacteriano. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano.pdf.

BRACKEN, James, Nick GUST, Jeff ROSS, and Ashley COUTTS. An Assessment of the Efficacy of Chemical Descalers for Managing Non-Indigenous Marine Species within Vessel Internal Seawater Systems and Niche Areas. En: Management of Biological Invasions. 2016. Vol. 7. P. 241–56.

BRITANIA. MRS Agar. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: <http://www.britanialab.com/productos/B02205%20REV%2001-MRS%20AGAR.pdf>

CARVAJAL, L. M. Producción, transformación y comercialización de pulpas de frutas tropicales [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Medellín: Universidad de Antioquia. Facultad de química farmacéutica. 2000. Disponible en: <http://huitoto.udea.edu.co/FrutasTropicales/pina.html>

CASTILLO MARTINEZ, Fabio Andrés., BALCIUNAS, Eduardo Marcos., SALGADO, José Manuel., DOMÍNGUEZ GONZALEZ, José Manuel., CONVERTI Attilio., and OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro de Souza. Lactic Acid Properties, Applications and Production: A Review. En: Trends in Food Science and Technology. 2013. Vol. 30. p. 70–83.

CASTRO, L., ECHEVERRI, G., SALAZAR, R., Y PINON, A. 1993. Efecto de la temperatura en el almacenamiento de dos variedades de piña, cayena lisa y manzana. En: *Memorias primer simposio latinoamericano de piñicultura*. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

CERRA, Héctor, Néstor AVERSA, Nora CARBONE, Susana CARNEVALI, Carlos CHIESA, Mino COVO, and others, Manual de Microbiología Aplicada a Las Industrias Farmacéutica, Cosmética Y de Productos Médicos, 2013.

COMTRADE, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <https://comtrade.un.org/db/dqBasicQueryResults.aspx?px=H1&cc=291811&r=156&y=2014>.

COMTRADE, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <https://comtrade.un.org/db/mr/daCommoditiesResults.aspx?px=H1&cc=291811>.

Cordón Páez, Santiago., Pérez Martínez, Jorge A. (2016). *Ajuste de un modelo matemático de Streptococcus pyogenes* en el mejor de los 2 sustratos complejos

para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio. Tesis de pregrado. Bogotá.: Universidad de América. 2016. p. 191.

CUELLAR OVIEDO, Juan Camilo. Evaluación de la Separación de Ácido Láctico obtenida a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticos. Trabajo de Grado Ingeniería Química. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. 2014. p. 132.

SWINEHART, D. F. The Beer-Lambert Law. En: Journal of Chemical Education. 1962. Vol. 39. p. 333.

DATTA, Rathin; TSAI, Shih-perng; BONSIGNORE, Patrick; MOON, Seung-hyeon and FRANK, James R. Technological and Economic Potential of Poly (Lactic Acid) and Lactic Acid Derivatives. En: FEMS Microbiology Reviews. 1995. Vol. 16. p. 221–31.

DEMIRCE, A., and POMETTO, A. L. Enhanced Production of D(-)-Lactic Acid by Mutants of Lactobacillus-Delbrueckii Atcc-9649. En: Journal of Industrial Microbiology. 1992. Vol. 11. p. 23–28.

DON, Mashitah Mat; and SHOPARWE, Noor Fazliani. Kinetics of Hyaluronic Acid Production by Streptococcus Zooepidemicus Considering the Effect of Glucose. En: Biochemical Engineering Journal. 2010. Vol.49. p. 95–103.

DUARTE, Alberto. Evaluación de Los Parámetros Cinéticos de La Ecuación de Monod. En: Ingeniería E Investigación. 1996. 123–38.

EDWARDS, Victor H. The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics. En: Biotechnology and Bioengineering. 1970. Vol. 12. p. 679–712.

FELCOBO. Como determinar la madurez de la fruta. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: <http://www.felcobo.com/Nota.php?er=0&id=5>

FU, Wenge. and MATHEWS, A. P. Lactic Acid Production from Lactose by Lactobacillus Plantarum: Kinetic Model and Effects of pH, Substrate, and Oxygen. En: Biochemical Engineering Journal. 1999. Vol. 3. p. 163–70.

GARCIA, Carlos A.; ARRÁZOLA, Guillermo S. and DURANGO, Alba M. Producción de Ácido Láctico Por Vía Biotecnológica En: Temas Agrarios. 2010, vol. 15. p. 9–26.

GOMES, Ana M.P., and MALCATA, F. Xavier. Bifidobacterium Spp. and Lactobacillus Acidophilus: Biological, Biochemical, Technological and Therapeutical Properties Relevant for Use as Probiotics. En: Trends in Food Science and Technology, 1999, vol. 10. p. 139–57.

GONÇALVES, L.; XAVIER, A.; ALMEIDA, J. and CARRONDO, M. Concomitant Substrate and Product Inhibition Kinetics in Lactic Acid Production. En: Enzyme and Microbial Technology, 1991, vol. 13. p. 314–19.

GRANDA, Diana; MEJÍA, Amanda and JIMÉNEZ, Gloria. Utilizacion de Residuos de Plátano Para La Producción de Metabolitos Secundarios Por Fermentacion En Estado Solido Con El Hongo Lentinus Crinitus. En: Vitae, 2005, 13–20

GUILLÉN, Laura., y VEGA J. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*ananas comosus merr.*) Y banano (*musa sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado. Bogotá.: Universidad de América. 2013. p. 191.

GULLÓN, Beatriz.; GARROTE, Gil.; ALONSO, José Luis.; and PARAJÓ, J. C. Production of L-Lactic Acid and Oligomeric Compounds from Apple Pomace by Simultaneous Saccharification and Fermentation: A Response Surface Methodology Assessment. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007. Vol. 55. p. 5580–87.

GUSAKOV, Alexander V., Elena G. KONDRATYEVA, and Arkady P. SINITSYN, 'Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities', International Journal of Analytical Chemistry, 2011 (2011), 1–4

Handbook of Culture Media for Food Microbiology, J.E.L. Corry et al. (Eds.).

HALDANE, J. Enzymes, Longmans, London, 1930.

HEPING Zhang and Yimin Cai (eds.), Lactic Acid Bacteria, 2014, Fundamentals and Practice.

HO, Kai Lai.; POMETTO, Anthony L.; and HINZ, Paul N. Optimization of L-(+)-Lactic Acid Production by Ring and Disc Plastic Composite Supports through Repeated-Batch Biofilm Fermentation. En: Applied and Environmental Microbiology, 1997, vol. 63. p. 2533–42.

HOFVENDAHL, Karin, and HAHN–Hägerdal, Bärbel. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable resources. En: Enzyme and Microbial Technology, 2000, vol. 67. p. 87–107.

HOOD, S. K., and ZOITOLA, E. A. Effect of Low pH on the Ability of Lactobacillus Acidophilus to Survive and Adhere to Human Intestinal Cells. En: Journal of Food Science, 1988, vol. 53. p. 1514–16.

HUJANEN, M., S. Linko, Y. Y. Linko, and M. Leisola, 'Optimisation of Media and Cultivation Conditions for L(+)(S)-Lactic Acid Production by Lactobacillus Casei NRRL B-441', Applied Microbiology and Biotechnology, 56 (2001), 126–30.

ICIS Chemical Business [en línea], 15 de septiembre de 2017. Disponible en Internet:<https://www.icis.com/chemicals/channel-info-chemicals-a-z/>.

IHS Markit, [en línea], 20 de septiembre, 2017 Disponible en: <https://www.ih.com/products/lactic-acid-itssalts-chemical-economics-handbook.html>.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Referencias bibliográficas. Contenido, forma y escritura. NTC 5613. Bogotá D.C.: El instituto, 2008. 33p. c.

_____. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Bogotá D.C.: El instituto, 2008. 36p. 2008.

_____. Frutas frescas. Piña manzana. Especificaciones. NTC 4102. Bogotá D.C.: El Instituto, 1997. p. 1-15.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC 4490. Bogotá D.C.: El instituto, 1998. 23p.

KRUSS. Informe de aplicación. Refractómetro – Medición Brix en la industria de bebidas y zumos. En línea. http://www.kruess.com/documents/Applikationsberichte/AP130710_001_Medicion_Brix_en_la_industria_de_bebidas_ES.pdf.

IDRIS, Ani, and SUZANA, Wahidin. Effect of Sodium Alginate Concentration, Bead Diameter, Initial pH and Temperature on Lactic Acid Production from Pineapple Waste Using Immobilized Lactobacillus Delbrueckii. En: Process Biochemistry, 2006, vol. 41. p. 1117–23.

JOHN, Rojan P.; NAMPOOTHIRI, K. Madhavan and PANDEY, Ashok. Solid-State Fermentation for L-Lactic Acid Production from Agro Wastes Using Lactobacillus Delbrueckii. En: Process Biochemistry, 2006, vol. 41. p. 759–63.

JUÁREZ, María Silvina.; OCAÑA, Virginia S.; WIESE, Birgitt. and NADER-Macías, María E. Growth and Lactic Acid Production by Vaginal Lactobacillus Acidophilus CRL 1259, and Inhibition of Uropathogenic Escherichia Coli. En: Journal of Medical Microbiology, 2003, vol. 52. p. 1117–24.

JYOTI, B. D., SURESH, A. K. and VENKATESH, K. V. Diacetyl Production and Growth of Lactobacillus Rhamnosus on Multiple Substrates. En: World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, vol. 19. p. 509–14.

KARBASI, Mehri.; YARMAND, Mohammad Saeed and MOUSAVI, Mohammad. Fermentation Potential of Lactobacillus Rhamnosus and Lactobacillus Acidophilus in Date Syrup to Develop a Functional Fermented Beverage: A Comparative Study. En: Journal of Food Processing and Preservation, 2015, vol. 39. p. 863–70.

Kompala, DS.; Ramkrishna, D.; Jansen, NB.; Tsao GT. Investigation of bacterial growth on mixed substrates: Experimental evaluation of cybernetic models. En: Biotechnol Bioeng. 1986; vol. 28, no. 7. p.1044-1055.

KOMPAÑA, Dhinakar S.; RAMKRISHNA, Doraiswami.; JANSEN, Norman B. and TSAO, George T. Investigation of Bacterial Growth on Mixed Substrates: Experimental Evaluation of Cybernetic Models. En: Biotechnology and Bioengineering, 1986, vol. 28. p. 1044–55 .

KULP, W & RETTGER, M. A comparative study of lactobacillus acidophilus and lactobacillus bulgaricus, citado por WHEATER DM. The Characteristics of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. En: J Gen Microbiol. 1955; vol. 12, no. 1. p.123-132.

KUMAR Dutta, S., MUKHERJEE, A. and CHAKRABORTY, P. Effect of Product Inhibition on Lactic Acid Fermentation: Simulation and Modelling. En: Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, vol. 46. p. 410–13.

LIZCANO, Sergio. Identificación de Las Etapas de Maduración de La Piña Perolera Empleando Técnicas de Visión Artificial. Trabajo de grado. Bucaramanga.: Universidad Pontificia Bolivariana. 2010. 111 p.

London's global university. Enzyme inhibitors. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/inhibition.htm>

LUEDEKING, Robert., Y, and PIRET, Edgar. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controllet pH. En: Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering, 1959, vol.1. p. 393–412.

Anuar, M.; Tan, I.; Ibrahim, S. y Ramachandran, K. A kinetic model for growth and biosynthesis of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*, Braz. En: J. Chem. Eng. 2008. Vol. 25, no.2. p. 217–228.

MACARULLA, José., GOÑI, Félix. Bioquímica humana: curso básico. 2 ed. Reverté. Barcelona. 1994. p. 33

MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 – 2.

Markets and Markets, [en línea], 20 de septiembre, 2017. Disponible en: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/polylacticacid-387.html>.

MARQUARD, Donald, 'AN ALGORITHM FOR LEAST-SQUARES ESTIMATION OF NONLINEAR PARAMETERS', 11 (1963)

MAST. MRS Agar. Procedimiento. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU402_SPA.pdf

MEHTA, Rajeev.; KUMAR, Vineet.; BHUNIA, Haripada. and UPADHYAY, S. N. Synthesis of Poly(lactic Acid): A Review. En: Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews, 2005, vol. 45. p. 325–49.

MELZOCH, Karel; VOTRUBA, Jaroslav; HÁBOVÁ, Věra. and RUCHTERA, Mojmír. Lactic Acid Production in a Cell Retention Continuous Culture Using Lignocellulosic Hydrolysate as a Substrate. En: Journal of Biotechnology, 1997, vol.56. p. 25–31.

MÉNDEZ, Daniel. MODELAMIENTO MATEMÁTICO Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EMPLEANDO LA BACTERIA *Burkholderia Cepacia* B27 A PARTIR DE ÁCIDOS GRASOS. Trabajo de grado. Bogotá. Universidad nacional de Colombia. 2016. 137 p.

Mercier P, Yerushalmi L, Rouleau D, Dochain D. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J Chem Technol Biotechnol* 1992; 55: 111–21.

MILLER, C., FOSMER A., RUSH, B., McMULLIN, T., BEACOM, D. and SUOMINEN, P. Industrial Production of Lactic Acid, *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, Second Edition (Elsevier B.V., 2011),

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. En: *Analytical Chemistry*, 1959, vol. 31. p. 426–28.

Ministerio de industria y comercio, 21 de septiembre 2017 – BACEX.

MONOD, Jacques. The growth of bacterial cultures. En: *Annual Reviews in M.* 1949, vol.3. p. 371–94.

MOUSAVI, Z., MOUSAVI, M., RAZAVI, H., EMAM-DJMOMEH, Z., KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. En: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 27, no. 1. p. 123–128.

NAVEENA, B. J., ALTAF, M.D., BHADRIAH, K. AND REDDY, G. Selection of Medium Components by Plackett-Burman Design for Production of L(+) Lactic Acid by *Lactobacillus Amylophilus* GV6 in SSF Using Wheat Bran. En: *Bioresource Technology*, 2005, vol. 96. p. 485–90.

NEIRA G, Ana María.; MARTINEZ R, Antonio María; and ORDUZ R, Javier Orlando. Análisis Del Mercado de Piña Gold Y Perolera En Dos Principales Centrales Mayoristas de Colombia. En: *Economía Y Desarrollo Rural*, 2016, vol. 16. p. 149–65.

NF. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. En: *Biochem Eng J.* 2010; vol. 49, no.1. p. 95-103.

NOMURA, Yoshiyuki, IWAHARA, Masayoshi.; and HONGO, Motoyoshi. Lactic Acid Production by Electrodialysis Fermentation Using Immobilized Growing Cells. En: *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, vol. 30. p. 788–93.

OLMOS-Dichara, A., AMPE, F., URIBELARREA J.-L., PAREILLEUX, A. and GOMA, G. Growth and Lactic Acid Production by *Lactobacillus Casei* Ssp. *Rhamnosus* in Batch and Membrane Bioreactor: Influence of Yeast Extract and Tryptone Enrichment. En: *Biotechnology Letters*, 1997, vol. 8. p. 709–714.

OROZCO, M. y SOLARTE, J. Búsqueda Del Mejor Medio De Cultivo Y Modelamiento Cinético Para La Obtención Del Ácido Láctico a Partir De Glucosa Por Vía Fermentativa. Tesis de Pregrado En Ingeniería Química. Manizales.: Universidad nacional de Colombia. 2003. 115 p.

Pontificia Universidad Javeriana. (2007). Manual De Laboratorio De Procesos Biotecnológicos. Bogotá D.C.

PARRA HUERTAS, Ricardo Adolfo. Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional En Los Alimentos. En: Revista de La Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2010, vol. 8. p. 93–105.

PLUMBRIGE, J. Regulation of carbon assimilation in bacteria. En encyclopedia of microbiology. 3 ed. 2009. p. 375-394.

PRODOCA. Etapas de la maduración de la piña. [online]. Consultado el 3 de febrero del 2018. Disponible en: <http://prodoqa.com.mx/home/mapa/pina/>

RASHID, Roslina. Optimization and Modeling of Lactic Acid Production From Pineapple Waste. Trabajo de grado. Malasia.: Universiti Teknologi Malaysia. 2008. 238 p.

REN, Jie. Lactic Acid, Biodegradable Poly (Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications. 2010, 4–14.

RIOS, Amelia. Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando de tecnología de membrana. Trabajo de grado. Universidad autónoma de Querétaro. México. 2011. P. 1-113.

Rooj, Arun K, Yasuhiro Kimura, and Randal K Buddington, 'Metabolites Produced by Probiotic Lactobacilli Rapidly Increase Glucose Uptake by Caco-2 Cells.', BMC Microbiology, 10 (2010), 16

SASAKI, K., Noparatnaraphorn, N. and Nagai, S. (1991). Use of Photosynthetic Bacteria for the Production of SCP and Chemicals from Agro Industrial Waste. Bioconversion of Waste Material to Industrial Product. Ed. Martin, A. M., J. of Elsevier App. Science. 225-233.

SENGUPTA, D., PIKE, R. Chemicals from Biomass: Integrating Bioprocesses into Chemical Production complexes for sustainable development. CRC Press. London. 2013, p. 122.

SERNA, Liliana, y RODRIGUEZ Aida. Producción Biotecnológica de Acido Láctica: Estado Del Arte. En: Ciencia, Tecnología Y Alimentos. 2005, vol. 5. p. 54–65.

SHERMAN, J. M. & HODGE, H. M. The value of certain tests in the differentiation of Lactobacillus bulgaricus from Lactobacillus acidophilus, citado por WHEATER DM. The Characteristics of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus. J Gen Microbiol. 1955;12(1):123-132.

SHULER, Michael L., and KARGI, Fikret. Bioprocess Engineering: Basic Concepts. 2 ed. Prentice Hall, 2002. P. 576.

STERN, N., HESSELTINE, C., WANG, H., & KONISHI, F. Lactobacillus acidophilus: Utilization of sugars and production of a fermented soybean product. En: Journal, Brazilian. 2011; vol. 42, no. 21. p. 330-339.

SUAREZ, Diego Andres. Evaluación Y Simulación de La Producción de Ácido Láctico Con Lactobacillus Casei ATCC 7469. Trabajo de grado. Medellín.: Universidad EAFIT. 2007. 117 p.

TORRES, D., Del Valle, G., Mora, S., y Henao, J. Producción de ácido láctico, Universidad nacional de Colombia – sede Bogotá. Agosto 2016; <https://www.slideshare.net/mariaguzman75/trabajo-final-de-produccion-de-acido-lactico>.

Trejos VM, Alzate JF, Garcia M a G. Mathematical description and stability analysis of fermentative processes. Descripción matemática y análisis Estab procesos Ferment. 2009; 76:111-121.

TRINIDAD, Adalberto, 'Modelos de Crecimiento En Biología, Su Significado Biológico Y Selección Del Modelo Por Su Ajuste', Trabajo de grado. México D. F.: Universidad Autónoma Metropolitana. 2014, 114 p.

UGR. [En línea], 20 de octubre, 2017. Disponible en: http://www.ugr.es/~bioestad/_private/cpfund5.pdf.

ULPGC. [En línea], 18 de octubre 2017. Disponible en: <http://www.webs.ulpgc.es/hbg/PRACTICAS/PROBLEMAS/CALCULOS-UFC.pdf>.

VILLADSEN, J., NIELSEN, J. and LIDÉN, G. Bioreaction Engineering Principles, 3rd Springer, 2011. 592 p.

VINK, E., GLASSNER, D., KOLSTAD, J., WOOLEY, R., y CONNOR, R., 'The Eco-Profiles for Current and near-Future NatureWorks® Polylactide (PLA) Production', 2006, 58–81

WANG, Y., G. CORRIEU, and C. BÉAL, 'Fermentation pH and Temperature Influence the Cryotolerance of Lactobacillus Acidophilus RD758', Journal of Dairy Science, 88 (2005), 21–29

WEE, Young-jung, KIM, Jin-nam.; and RYU, Hwa-won. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. En: Food Technology and Biotechnology, 2006, vol. 44. p. 163–72.

WERNER, Esterl. Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Editorial Reverté. Barcelona. 2008. p. 16.

WHEATER, D. M. The Characteristics of Lactobacillus Acidophilus and Lactobacillus Bulgaricus. En: Journal of General Microbiology, 1955, vol. 12. p. 123–32.

YE, K., JIN, S., SHIMIZU K. Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. En: J Ferment Bioeng 1996. Vol. 81. p. 240–6.

YEPES, Sandra Milena; MONTONYA, Lina; and OROZCO, Fernando. Valorización de Residuos Agroindustriales - Frutas - En Medellín Y El Sur Del Valle Del Aburrá, Colombia. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 2008. Vol 61, no. 1. p. 4422–31.

ANEXOS

ANEXO A
CÁLCULOS, DILUCIONES Y SIEMBRAS.

Calculo preparación MRS:

Para 1L agregar 67,15g

$$600 \text{ mL} \times \frac{67,15 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = 40,29 \text{ g}$$

Preparación NaCl 1%

Para 600 mL de NaCl 1%

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$1 V_1 = 0,01 \times 0,6 \text{ L}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

$$m = \rho \times V = 2,16 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 6 \text{ mL} = 12,96 \text{ gramos NaCl}$$

Diluciones seriadas para siembra.

Horas	Diluciones
0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108	10^0
	10^{-2}
	10^{-3}
	10^{-4}
	10^{-5}

ANEXO B
DETERMINACIÓN DE UFC/mL.

Hora	Numero de colonias	UFC/mL
0 horas	105	$\frac{UFC}{ml} = 105 * 100 = 1,05 \times 10^4$
12 horas	123	$\frac{UFC}{ml} = 123 * 100 = 1,23 \times 10^4$
24 horas	193	$\frac{UFC}{ml} = 193 * 100 = 1,93 \times 10^4$
36 horas	285	$\frac{UFC}{ml} = 285 * 100 = 2,85 \times 10^4$
48 horas	41	$\frac{UFC}{ml} = 41 * 1000 = 4,10 \times 10^4$
60 horas	43	$\frac{UFC}{ml} = 43 * 1000 = 4,30 \times 10^4$
72 horas	44	$\frac{UFC}{ml} = 44 * 1000 = 4,40 \times 10^4$
84 horas	44	$\frac{UFC}{ml} = 44 * 10000 = 4,40 \times 10^5$
96 horas	46	$\frac{UFC}{ml} = 46 * 10000 = 4,60 \times 10^5$
108 horas	47	$\frac{UFC}{ml} = 47 * 10000 = 4,70 \times 10^5$

ANEXO C
CONVERSIÓN Y RENDIMIENTO DE SUSTRATO EN BIOMASA.

$$\%Conversion = \frac{\text{moles de reactivo que reaccionan}}{\text{moles de reactivo que entran}} \times 100$$

$$\%Conversion = \frac{S_o - S_f}{S_o} \times 100$$

$$\%Conversion = \frac{4,655 - 2,773}{4,655} \times 100$$

$$\%Conversion \text{ de } S = 40,430\%$$

$$Y_{X/S} = \frac{\text{gramos de biomasa obtenida}}{\text{gramos de sustrato consumido}} = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f}$$

$$Y_{X/S} = \frac{0,0913 - 0,0904}{4,655 - 2,773} = 4,782 \times 10^{-4}$$