

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería de Biosistemas

PRÁCTICA DIRIGIDA

“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (AL) A ESCALA DE PLANTA PILOTO”

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado académico de licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas

Silvia Fernández Fernández

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

2022

Trabajo Final de Graduación sometido a revisión por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas



Ing. Silvia Elena Fernández Fernández
Candidata



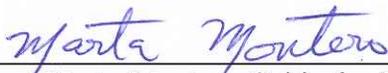
Ing. Beatriz Mazón Villegas, PhD.
Directora, Comité Asesor



Ing. Juan Roberto Mora Chaves, Msc.
Miembro, Comité Asesor



Natalia Barboza Vargas, PhD.
Miembro, Comité Asesor



Ing. Marta Montero Calderón, PhD.
Presidenta, Tribunal Examinador



Jéssica Montero Zamora, Msc.
Miembro, Tribunal Examinador

DEDICATORIA

A mis padres Annia y Marcos

A mis hermanas Laura y Michelle

Por todo el apoyo brindado durante estos años de carrera.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser mi soporte, mis motivadores, por todo el amor y apoyo incondicional que me han brindado durante todo este proceso.

A Beatriz Mazón Villegas, directora del proyecto, por confiar en mí en el desarrollo de este trabajo, por su guía, comprensión, consejos, apoyo, enseñanzas y múltiples aportes durante todo el proceso.

A Jéssica Montero Zamora, por toda la paciencia, dedicación, comprensión, guía, apoyo, tiempo, por siempre estar pendiente del proyecto y todos los conocimientos y aprendizajes que ha compartido conmigo.

A Natalia Barboza Vargas, por su orientación con la metodología y desarrollo del proyecto, por brindarme las cepas de BAL, pruebas API, aportes y recomendaciones.

A Aníbal Mora Villalobos, por todo el apoyo, sugerencias y recomendaciones.

A Vanny Mora Villalobos por capacitarme con la ejecución de las pruebas API

A Juan Roberto Mora Chaves por sus aportes y recomendaciones durante todo el proceso.

A Yeymi Torres Sequeira por ser mi amiga incondicional, por toda su ayuda, apoyo, escucha y motivación durante todo el proceso.

A Kevin Segura Rodríguez por ser mi apoyo, consejero y soporte, por toda su paciencia, ayuda y motivación durante todo el proceso.

A Valeria Leandro Arce por motivarme, acompañarme, ser mi compañera de laboratorio y por su ayuda incondicional en todo el proceso de fermentaciones en matraz y en biorreactores.

A Ana Elizondo Masis por ser mi compañera de laboratorio, por motivarme, ayudarme y aconsejarme durante todo el desarrollo de este proyecto.

Al fondo de becas CENAT-CONARE por financiar este proyecto y darme la oportunidad de desarrollarlo en tan prestigioso lugar.

Al CENIBiot por facilitarme los insumos, equipos necesarios y apoyo durante todo este tiempo.

Al sistema de becas de la Universidad de Costa Rica, por darme las herramientas necesarias para mantenerme estudiando.

Al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CIET-UCR), el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Costa Rica (CITA-UCR), a la Escuela de Ingeniería de Biosistemas (EIB-UCR) y a la Universidad de Costa Rica (Proyecto B9-457) por la oportunidad de publicar un artículo científico.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
NOMENCLATURA	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 <i>Bacterias ácido lácticas</i>	4
2.1.1 Historia.....	4
2.1.2 Definición	4
2.1.3 Características	4
2.1.4 Género <i>Weissella</i>	5
2.1.5 Métodos de identificación, caracterización y comportamiento de BAL.....	6
2.1.5.1 Tinción de Gram.....	6
2.1.5.2 Cinéticas de crecimiento	7
2.1.5.3 Pruebas API 50 CH	8
2.1.6 Importancia y usos	10
2.2 <i>Ácido láctico</i>	11
2.2.1 Definición	11
2.2.2 Aplicaciones.....	12
2.2.3 Producción de ácido láctico	12
2.2.3.1 Síntesis Química	12
2.3 <i>Fermentación</i>	13
2.3.1 Fermentación Microbiológica.....	14
2.3.2 Equipo y escala de producción	14
2.3.2.1 Microplaca.....	14
2.3.2.2 Microbiorreactor.....	15
2.3.2.3 Biorreactor.....	15
2.3.2.3.1 Partes de un biorreactor	15
2.3.2.3.2 Operación de un biorreactor	16
2.3.2.3.2.1 Discontinuo o batch.....	16
2.3.2.3.2.2 Semicontinuo o fed-batch.....	17

2.3.2.3.2.3 Continuo	17
2.3.3 Medios de cultivo.....	17
2.3.3.1 Suero de leche	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 <i>Aislamientos de bacterias ácido lácticas</i>	21
3.2 <i>Activación de aislamientos de BAL</i>	22
3.3 <i>Preparación de los medios de cultivo</i>	22
3.4 <i>Dilución</i>	22
3.5 <i>Caracterización de la cinética de crecimiento de los aislamientos de bacterias ácido láctico</i>	23
3.5.1 Tinción Gram.....	23
3.5.2 Cinética de crecimiento de las BAL	23
3.6 <i>Cuantificación de la producción de ácido láctico y consumo de glucosa de las bacterias ácido lácticas a escala de laboratorio</i>	24
3.6.1 Proceso de fermentación en un microbiorreactor a escala de laboratorio.	24
3.6.2 Prueba de fermentación de carbohidratos API 50 CH.....	24
3.7 <i>Proceso de producción de AL del aislamiento más promisorio en un biorreactor a escala de planta piloto</i>	25
3.7.1 Uso de suplementos con un medio alternativo para la fermentación en placas de 96 micropocillos.	25
3.7.2 Procesos de fermentación a escala de planta piloto.....	27
3.7.2.1 Preparación de los medios	27
3.7.2.2 Fermentación en matraz.....	27
3.7.2.3 Fermentación en biorreactor	27
3.8 <i>Diseño Experimental y análisis estadístico</i>	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1 <i>Caracterización de la cinética de crecimiento de los aislamientos de bacterias ácido lácticas</i>	30
4.1.1 Tinción de Gram	30
4.1.2 Cinéticas de crecimiento de BAL en microplaca.....	32
4.2.1 Proceso de fermentación en un microbiorreactor	37
4.2.2 Prueba de fermentación de carbohidratos API 50 CH.....	38
4.3 <i>Proceso de producción de AL con el aislamiento Weissella soli en un biorreactor a escala de planta piloto</i>	43

4.3.1	Tratamiento con suplementos a base de sales, fuentes de carbono y nitrógeno.	43
4.3.2	Proceso de fermentación en matraz	45
4.3.2.1	Proceso de fermentación en un medio sintético.....	45
4.3.2.2	Proceso de fermentación en suero de leche con suplemento	47
4.3.3	Proceso de fermentación en un biorreactor a escala de planta piloto	49
4.3.3.1	Proceso de fermentación en un medio sintético.....	49
4.3.3.2	Proceso de fermentación en suero de leche con suplemento	52
5.	CONCLUSIONES	56
6.	RECOMENDACIONES	58
5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS A	70
ANEXOS B.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	6
Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano.....	8
Figura 3. Partes del microtubo de la prueba API 50 CH.....	9
Figura 4. Formas isométricas del ácido láctico.....	11
Figura 5. Influencia de los factores internos y externos sobre la fermentación.....	14
Figura 6. Partes principales que componen los biorreactores.....	15
Figura 7. Procedimiento para la activación de aislamientos de BAL.....	22
Figura 8. Galería con 10 microtubos.....	25
Figura 9. Biorreactor y tapa Applikon Biotechnology de 7 L de capacidad.....	27
Figura 10. Morfología cocoide, bacilar y cocobacilar de BAL identificadas a partir de tinción de Gram.....	32
Figura 11. Curvas de crecimiento de 13 aislamientos de <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	32
Figura 12. Curvas de crecimiento de aislamientos de (a) <i>L. pentosus</i> , (b) <i>W. soli</i> , (c) <i>L. pseudomesenteroides</i> y (d) cuatro aislamientos.....	34
Figura 13. Producción de AL (g/L), AA (g/L) y consumo de glucosa (g/100 g) para nueve aislamientos de BAL.....	37
Figura 14. Coloración obtenida de pruebas API 50 CHL para aislamientos acomodadas de mayor a menos consumo, (a) <i>L. pentosus</i> _17-2, (b) <i>W. soli</i> _29, (c) <i>L. pentosus</i> _19-2 y (d) <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> _P10.....	39
Figura 15. Resultados obtenidos de las pruebas API 50 CH para nueve aislamientos de BAL.....	40
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>W. soli</i> _31 expuesto a diversos tratamientos, (a) controles, medio base y sintético. (b) suplemento a base de fuentes de nitrógeno y carbono, (c) suplemento de sales.....	44
Figura 17. Curvas de crecimiento de <i>W. soli</i> _31 en matraz y medio sintético (a) DO versus pH, (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, fructosa y sacarosa.....	46
Figura 18. Curvas de crecimiento de <i>W. soli</i> _31 en matraz y suero de leche suplementado (a) DO versus pH, (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, lactosa y galactosa.....	48
Figura 19. Curvas de crecimiento de <i>W. soli</i> _31 en biorreactor y medio sintético (a) DO y consumo de NaOH versus tiempo, (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, fructosa y sacarosa.....	50
Figura 20. Curvas de crecimiento de <i>W. soli</i> _31 en biorreactor y suero de leche suplementado (a) DO y consumo de NaOH versus tiempo (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, lactosa y galactosa.....	53
Figura B1. Microbiorreactor y cassette empleados.....	74
Figura B2. Muestras para HPLC previamente filtradas.....	74
Figura B3. API 50 CHL medium.....	75
Figura B4. Kit API 50 CH.....	75
Figura B5. Partes de un biorreactor Applikon Biotechnology de 7 L.....	76
Figura B6. Partes de la tapa de un biorreactor Applikon Biotechnology de 7 L.....	76
Figura B7. Coloración de la Prueba API para el aislamiento <i>L. pentosus</i> _69.....	77
Figura B8. Coloración de la Prueba API para el aislamiento <i>W. soli</i> _31.....	78
Figura B9. Coloración de la Prueba API para el aislamiento <i>L. pentosus</i> _68-3.....	79
Figura B10. Coloración de la Prueba API para el aislamiento <i>L. pentosus</i> _70-1.....	80
Figura B11. Coloración de la Prueba API para el aislamiento <i>L. falkenbergense</i> _66-2.....	81
Figura B12. Coloración del medio API 50 CHL Medium™ posterior a la inoculación.....	82
Figura B13. Fermentación de <i>W. soli</i> _31 en medio sintético.....	83
Figura B14. Fermentación de <i>W. soli</i> _31 en suero de leche suplementado.....	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio API 50 CHL Medium.....	9
Tabla 2. Sustratos incluidos en los microtubos de la prueba API 50 CH (58).....	10
Tabla 3. Sustratos alternativos empleados para el crecimiento de BAL y producción de AL.....	18
Tabla 4. Composición del suero de leche dulce y ácido (101,102).....	19
Tabla 5. Concentración de aminoácidos y vitaminas presentes en el suero de leche (101).....	19
Tabla 6. Clasificación de la especie de los aislamientos de las BAL de acuerdo con el tipo de residuo del cual fueron extraídas.....	21
Tabla 7. Composición de los tratamientos empleados para evaluar la eficacia de los suplementos.....	26
Tabla 8. Composición del medio de cultivo base.....	26
Tabla 9. Morfología, tamaño y resultado Gram para 30 aislamientos de BAL analizadas.....	30
Tabla 10. Aislamientos de BAL elegidos para la fermentación en microbiorreactor.....	37
Tabla 11. Producción de AL, AA y consumo de glucosa para nueve aislamientos de BAL.....	37
Tabla 12. Clasificación de azúcares metabolizadas por los nueve aislamientos de BAL y su porcentaje de consumo.....	42
Tabla 13. $DO_{m\acute{a}x}$ y tasa de crecimiento obtenidos al evaluar 18 tratamientos aplicados a <i>W. soli</i> en placa de 96 micropocillos.....	43
Tabla 14. Costo de fermentación de <i>W. soli</i> en biorreactor de 7 L empleando diversos sustratos.....	55
Tabla A1. Nomenclatura de las bacterias en estudio.....	70
Tabla A2. $DO_{m\acute{a}x}$ y tasa de crecimiento (h^{-1})* de las bacterias del ácido láctico.....	71
Tabla A3. DO, pH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en matraz utilizando medio sintético.....	72
Tabla A4. DO, pH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en matraz utilizando suero de leche suplementado.....	72
Tabla A5. DO, NaOH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en biorreactor utilizando medio sintético.....	72
Tabla A6. DO, NaOH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en biorreactor utilizando suero de leche suplementado.....	73

NOMENCLATURA

AA: ácido acético

AL: ácido láctico

ANOVA: análisis de varianza

BAL: bacterias ácido lácticas

CeNAT: Centro Nacional de Alta Tecnología

CENIBiot: Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas

CIET: Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

HBI: infusión cerebro corazón

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

KH_2PO_4 : fosfato monopotásico

K_2HPO_4 : fosfato dipotásico

LB: caldo de Lisogenia.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: sulfato de magnesio heptahidratado

$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$: sulfato de manganeso tetrahidratado

MRS: de Man Rogosa y Sharpe

NaOH: hidróxido de sodio

NH_4Cl : cloruro de amonio

NH_4OH : hidróxido de amonio

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: sulfato de amonio

DOMáx: densidad óptica máxima

DO: densidad óptica

Pep 10: peptona al 10%

Pep 20: peptona al 20%

pH: potencial de hidrógeno

PLA: ácido poliláctico

RPM: revoluciones por minuto

T: tiempo

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen gran potencial de aplicación en sistemas biológicos para la producción de metabolitos. Se usan en la industria alimentaria, médica, farmacéutica y cosmética. Son productoras de ácido láctico (AL) que es un compuesto de gran interés por sus aplicaciones como acidulante y conservante en alimentos, controlador de pH, solubilizador y precursor del ácido poliláctico (PLA) para la industria de biopolímeros.

Los residuos agroindustriales representan una problemática ambiental a nivel mundial. Además, a nivel nacional se generan volúmenes de 6,3 billones de toneladas de residuos orgánicos. Por esta razón alternativas biotecnológicas han surgido para revalorizar y aprovechar los residuos.

En total se seleccionaron 30 BAL aisladas de residuos agroindustriales. La cinética de crecimiento y la tasa de crecimiento (μ max) se evaluaron en microplacas de 96 pocillos a 37°C durante 24 h en caldo MRS. Con estos resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Los nueve aislamientos más promisorios fueron seleccionados para evaluar su producción de metabolitos utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Adicionalmente, se evaluó el perfil metabólico utilizando pruebas API 50 CH. Con los resultados obtenidos se eligió el aislamiento más promisorio y se estudió su cinética de crecimiento en 18 tratamientos alternativos y se seleccionaron dos medios para realizar una fermentación en biorreactor (7 L).

Las cinéticas de crecimiento permitieron seleccionar nueve aislamientos (*Lactiplantibacillus pentosus*_70-1, *Lactiplantibacillus pentosus*_19-2, *Weissella soli*_31, *Weissella soli*_29, *Lactiplantibacillus pentosus*_17-2, *Leuconostoc falkenbergense*_66-2, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*_P10, *Lactiplantibacillus pentosus*_68-3 y *Lactiplantibacillus pentosus*_69) que mostraron la DO y la μ elevadas. Los resultados de HPLC de los aislamientos crecidos en microbioreactor mostraron que *W. soli*_29 (20,833 \pm 2,731 g/L), *L. pentosus*_70-1 (20,100 \pm 2,754 g/L) y *L. pentosus*_69 (20,100 \pm 2,562 g/L) presentaron los valores más altos de AL.

La producción de AA se mantuvo de 3,4 a 4,3 g/L y no presentó diferencias. De los nueve aislamientos *L. pentosus*_69, *L. paracasei* subsp. *tolerans*_P10 y *L. pentosus*_19-2 presentaron presencia de glucosa. Las pruebas API 50 CH mostraron que *L. pentosus*_17-2, *W. soli*_29 y *W. soli*_31 fermentaron la mayor cantidad de azúcares. *W. soli*_31 fermentó los azúcares de todos los grupos evaluados. La evaluación de 18 tratamientos alternativos permitió elegir dos medios, uno sintético y otro a base de suero de leche suplementado (SLS). Las fermentaciones en biorreactor y análisis por HPLC mostraron valores de AL de 16,27 \pm 2,301 g/L en medio sintético y 7,21 \pm 1,355 g/L en SLS. La producción de AA fue de 0,239 \pm 0,060 g/L en el medio sintético y 1,360 \pm 0,200 g/L en SLS. Los valores de $DO_{m\acute{a}x}$ y $\mu_{m\acute{a}x}$, producción de ácidos orgánicos (g/L) y pruebas API 50 CH mostraron que *W. soli*_31 es el aislamiento más promisorio.

El empleo y revalorización de residuos agroindustriales es una alternativa económica, consecuente con el medio ambiente, que contribuye con la economía circular y la producción de metabolitos de interés. Este estudio brinda dos alternativas de uso de residuos agroindustriales, la primera es la extracción y aislamiento de las BAL, y la segunda incorpora el SLS como sustrato alternativo para el crecimiento de BAL.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran presentes en la naturaleza y se identifican en la microflora y las etapas del procesamiento de múltiples alimentos. Han sido de gran utilidad a lo largo del tiempo, actualmente han adquirido gran importancia a nivel mundial porque desempeñan un papel importante en procesos industriales tales como la fermentación (1). Aportan beneficios al ambiente como una nueva alternativa para el aprovechamiento de recursos renovables (2). Además, las aplicaciones en la industria tienen como resultado procesos más eficientes y económicos. Estos microorganismos son capaces de metabolizar diversos sustratos y producir compuestos de alto valor industrial, alimenticio y farmacéuticos; por estas razones se aplican también en biorrefinería (3,4).

Las BAL se han destacado debido a su condición de Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) o de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés), respectivamente. Debido a su capacidad de generar metabolitos primarios y secundarios como el AL, bacteriocinas, antioxidantes, vitaminas y otros compuestos hace a estos microorganismos atractivos a nivel biotecnológico (5).

Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de crecer en ambientes no aptos para la mayoría de los microorganismos. La actividad de agua que se define como el agua disponible para el crecimiento microbiano es de 0,95. Este valor es cercano a 1,00 lo que permite un crecimiento adecuado dado que corresponde al límite superior (6). El pH mínimo para su crecimiento es de 3,2 y el valor máximo es de 9,6, lo que permite el desarrollo en múltiples ambientes (7). El estudio de estos microorganismos es útil en distintos contextos. Una de las aplicaciones en la industria de alimentos es que son capaces de efectuar fermentaciones en productos de consumo humano, aportando sabor y olores característicos (8).

En la actualidad existe una amplia diversidad de microorganismos presentes en residuos y microambientes, por lo que estos ambientes son promisorios para el aislamiento de BAL. Sin embargo, su utilización y aplicación en biorrefinería ha sido poco explotada en América Latina, específicamente en Costa Rica. Su utilización podría favorecer la economía a nivel país, a partir de la producción de AL. Esta es una molécula orgánica con una demanda mundial en crecimiento debido a su aplicación en la producción de PLA (9). Sin embargo, su uso se ha destacado principalmente en el ámbito alimenticio como conservante y acidulante. Si bien, a nivel mundial se ha estudiado un gran número de aislamientos de BAL como productoras de AL algunos géneros siguen siendo menos explorados y podrían presentar un potencial interesante para la industria biotecnológica, como es el caso del género *Weissella*.

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO-ONU) el desperdicio de alimentos ha generado pérdidas económicas cercanas al billón de dólares anuales. Siendo la industria de bebidas los responsables de generar el 26% de los residuos alimenticios, seguidos de la industria láctea con un 21%, estos residuos generan grandes problemáticas a nivel mundial por la contaminación ambiental (10,11). Según datos del Estado de

la Nación (12) para el año 2020 el área agrícola sembrada en el país fue de 403 222 ha. El 62% representó los cultivos agroindustriales, de los cuales destacaron las plantaciones de piña, banano y plátano. La producción a nivel agroindustrial genera gran cantidad de residuos que en su mayoría no son aprovechados. Esta biomasa es un problema a nivel nacional dado que el 68% del territorio dedicado a estas actividades no le da ningún tratamiento a los residuos (13), permitiendo la proliferación de moscas e insectos (14). Así como la liberación de dióxido de carbono, contaminación de aguas, molestias por presencia de olores, y proliferación de ratas (15).

La biomasa desechada es un recurso de gran valor, dado que puede ser empleada para la producción AL y otros subproductos, lo que además se ve favorecido por su alto contenido de glucosa, sacarosa y lactosa, principales fuentes de carbono. En la actualidad, la búsqueda de productos más puros ha interferido en la elección de la metodología empleada, siendo la vía fermentativa la preferida debido a la pureza de sus resultados. Sin embargo, el proceso de aislamiento y purificación resulta costoso (16). Por este motivo, el empleo de residuos agroindustriales puede ser una alternativa menos costosa y a su vez permite la revalorización del mismo.

Los residuos agroindustriales cuentan con un alto potencial para ser utilizados en la elaboración de nuevos productos de valor agregado dado que son biodegradables, y una fuente rica de energía. Se emplean para la obtención de enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, proteína celular y bacterias ácido lácticas (17). Por ende, existe la necesidad de aprovechar subproductos con fuentes de carbono renovables de bajo costo, como el bagazo de yuca, las melazas de caña de azúcar, los residuos de almidón y el suero de leche (18).

El suero de leche es un subproducto con un gran potencial de utilización en la industria biotecnológica. Con el fin de revalorizarlo y disminuir su volumen de desecho (estimado en $1,9 \times 10^8$ toneladas/año) sería una alternativa viable para disminuir la problemática ambiental. Dado que este producto tiene una elevada demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO) al ser descartado y entrar en contacto con el agua, reduce el oxígeno disuelto siendo un gran riesgo para la vida acuática (19). Por esta razón, en la actualidad se ha intentado revalorizar este producto al utilizarlo en suplementos y alimento para animales, recuperación de la lactosa y bebidas a base de suero de leche (20,21).

La búsqueda de una economía circular, el aprovechamiento de residuos agroindustriales y la existencia de diversos géneros de BAL justifica la necesidad de caracterizar algunas de estos aislamientos con el fin de identificarlas y mantener datos precisos de su genotipo. Además, el alto costo de aislamiento y purificación a nivel industrial también justifica iniciar con una evaluación de la producción de AL de dichos aislamientos a escala de laboratorio. Este análisis es con el fin de optimizar la producción, facilitar el proceso de aislamiento y purificación para su posterior empleo y producción a escala de planta; la materia prima consistirá en el uso de residuos agroindustriales.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar bacterias ácido lácticas (BAL) procedentes de residuos agroindustriales para la evaluación de la producción de metabolitos de interés a escala de planta piloto.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar la cinética de crecimiento de los aislamientos de bacterias ácido lácticas.
2. Cuantificar la producción de ácido láctico y consumo de glucosa de las bacterias ácido lácticas a escala de laboratorio.
3. Escalar la producción de ácido láctico del aislamiento más promisorio a nivel de planta piloto.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 *Bacterias ácido lácticas*

3.1.1 Historia

Las bacterias ácido lácticas (BAL), tienen su origen a inicios del siglo XIX, con el objetivo de identificar un grupo variado de bacterias formadoras de ácido láctico (AL) como punto en común, dicho grupo en la actualidad se encuentra conformado por más de 30 géneros (1). Debido a la variabilidad en las características que presentaban existió gran confusión en torno a cuáles debían considerarse bacterias ácido lácticas.

Se desarrollaron diversas investigaciones entre 1857 y 1863, destacándose los estudios sobre fermentación láctica, alcohólica y butírica descubierta por Luis Pasteur (22), pero fue hasta 1873 que Joseph Lister aisló el primer aislamiento de *Lactococcus lactis*, permitiendo establecer criterios fenotípicos (23). El término '*bacterium acidi lactici*' fue descrito por Weigmann en 1889 al definir las bacterias como formadoras de leche ácida a partir del azúcar de la leche (24), y para el año 1901 Martinus Willem Beijerinck determinó los *Lactobacillus* como bacterias Gram positivas, definiendo características importantes para su reconocimiento (23). Pero fue hasta 1920 que Orla-Jensen, describió las características de las bacterias del ácido láctico que se siguen utilizando en la actualidad, estableció la morfología celular, rango de temperatura de crecimiento, tipo de metabolismo, tolerancia y requerimientos nutricionales (25).

3.1.2 Definición

Las BAL constituyen un grupo de bacterias con habilidad para metabolizar grandes cantidades de ácido láctico a partir de los carbohidratos, como principal o único producto de la fermentación (26). Debido a su limitada capacidad biosintética, requieren factores nutritivos y de crecimiento complejos que incluyen aminoácidos, bases nitrogenadas, fuentes de carbono, vitaminas, purinas y pirimidinas (27). Sin embargo, su capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales ha permitido encontrarlas asociadas a material vegetal, corteza terrestre, y en la microbiota de humanos y animales, encontrándose en los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario (23).

3.1.3 Características

Estos microorganismos se caracterizan por ser fisiológicamente uniformes, con pared Gram positiva, anaeróbicos y aerotolerantes (24,28); no forman esporas, no reducen el nitrato, no producen pigmentos, no son patógenas, ni toxigénicas. Su morfología es cocoide, bacilar o cocobacilar y no tienen mecanismo de movilidad (29,30). La mayoría de las BAL son mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento de 25°C. Sin embargo, son capaces de crecer a temperaturas en un rango de 5 a 45°C, su pH óptimo es de 4.5, pero resisten ambientes extremos con valores de pH de 3,2 a 9,6 (25).

Las BAL están incluidas dentro del grupo de microorganismos “seguros” o GRAS (*generally recognized as safe*) (31), lo que implica que pueden utilizarse para la elaboración de productos de uso y consumo humano. Además, carecen del ciclo de Krebs, por lo cual son incapaces de sintetizar ATP por respiración, en cambio, la generación ocurre mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados (32). Entre los sustratos fermentables se encuentran los azúcares (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), los polialcoholes, el citrato y algunos aminoácidos como la arginina.

Su metabolismo puede ser homofermentativo produciendo ácido láctico como principal producto de la fermentación. En este proceso las bacterias son capaces de transformar el 90% de la glucosa en AL, dentro de este grupo se caracterizan los géneros *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y algunos *Lactobacillus* (23). La fermentación heterofermentativa genera ácido láctico y otros compuestos como lactato, dióxido de carbono y etanol (30). En este proceso las BAL sólo son capaces de transformar el 50% de la glucosa en AL. Las bacterias que presentan este metabolismo corresponden a los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y algunos *Lactobacillus* (33).

Su clasificación se basa en diferentes aspectos tales como la morfología, habilidad de crecer en ambientes alcalinos y ácidos, fermentación de la glucosa, temperatura de crecimiento, configuración del ácido láctico, entre otros (24). El grupo está conformado por distintos géneros, sin embargo, entre los más conocidos se encuentran: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, y *Oenococcus* (26).

3.1.4 Género *Weissella*

El género *Weissella* fue designado por Collins en 1993. A partir de estudios taxonómicos y bioquímicos se logró diferenciar del género *Leuconostoc* dónde había sido anteriormente catalogado (34). Su nombre se debe al alemán Norbert Weiss conocido por sus numerosas contribuciones en el campo de la investigación de las bacterias del ácido láctico (35). Las bacterias del género *Weissella* pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Leuconostocaceae* (36) y actualmente el género comprende 25 especies clasificadas en 5 ramas filogenéticas (34).

Son bacterias Gram positivas, catalasa negativas, con morfología bacilar o cocoide, inmóviles y no formadoras de esporas. Su metabolismo es heterofermentativo, obteniendo como productos finales AL, CO₂, etanol y acetato principalmente. Todas las especies crecen entre los 15°C hasta los 45°C (37). El hábitat de estas BAL incluye una variedad de nichos ecológicos ricos en nutrientes incluido material vegetal, alimentos fermentados, tracto gastrointestinal de los animales, piel y leche (35). Sin embargo, la especie de *W. soli* sp. es la única documentada donde se surgiere que su hábitat natural es el suelo (38). El género tiene un gran potencial como probiótico y es ampliamente utilizado por su generación de exopolisacáridos como el dextrano.

La especie *W. soli* debe su nombre al suelo, debido que fue aislada de un jardín en Suecia. Son bacterias de 1 mm de diámetro, blanquecinas, lisas y convexas (38). Su temperatura de crecimiento varía entre 4 y 40°C, pero no a 42°C. La producción de AL se ve beneficiada a partir de L-xilosa, galactosa, fructosa, ramnosa, manitol, celobiosa, lactosa y melicitosa.

3.1.5 Métodos de identificación, caracterización y comportamiento de BAL

3.1.5.1 Tinción de Gram

La tinción de Gram, es una técnica desarrollada por el Dr. Hans Gram en el año 1884. Este método consiste en la identificación de microorganismos a partir de la coloración de las membranas de las células empleadas, diferenciando dos grupos: Gram positivos y Gram negativos (39). El principio de esta técnica parte de las características y estructura de la pared celular de las bacterias. Las bacterias Gram positivas cuentan con una pared celular gruesa (20 a 80 nm de espesor) compuesta por varias capas interconectadas de peptidoglicano, que representan el 80 a 90% de la pared, así como ácido teicoico y polímeros, que proporcionan impermeabilidad a la pared haciendo que resista la decoloración. Sin embargo, no cuenta con membrana celular externa (40–42). Por el contrario, las bacterias Gram negativas mantienen una capa delgada de peptidoglicano (2 nm) que representa sólo del 10 al 20% de la pared, más una membrana celular externa compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos (40,41,43). La figura 1 muestra la pared celular de bacterias Gram positivas y negativas.

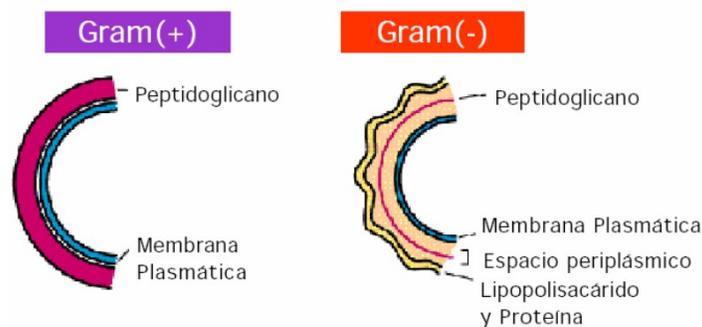


Figura 1. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La técnica parte de las células fijadas sobre un portaobjetos que se tiñen, primero con una solución de cristal violeta que tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana, permitiendo la tinción, en este estado todas las células están teñidas. Posteriormente, el portaobjetos se cubre con una solución de yodo-yoduro potásico (lugol). Este sirve como mordiente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo insoluble en agua yodo-cristal violeta que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana (42,44,45). Seguidamente se procede con la decoloración, que emplea una mezcla de alcohol/acetona con el fin de eliminar el complejo yodo-cristal violeta (43,44). Por último se utiliza una coloración de contraste empleando safranina que sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo (44,46).

Las bacterias Gram positivas al tener paredes celulares gruesas (gran cantidad de peptidoglicano) presentan mayor fuerza de retención provocando que el complejo quede atrapado dentro de la pared celular (42,46). Sin embargo, en las bacterias Gram negativas, la mezcla de alcohol/acetona al ser un solvente lipídico, disuelve la membrana exterior de la pared celular, de modo que la capa de peptidoglicano no es capaz de retener el complejo y la célula se decolora (42). La tinción de Gram es un método sencillo, rápido y económico (39,40), que permite diferenciar las bacterias según las características de su pared, observar las distintas morfologías (cocos, bacilos, cocobacilos), su agrupación (aisladas, en cadena, en racimo, en tétradas) y su tamaño (43).

3.1.5.2 Cinéticas de crecimiento

La cinética de crecimiento se encarga de comprender el comportamiento y reacciones de microorganismos como las bacterias. Entre los aspectos se destacan el crecimiento, supervivencia, muerte, adaptaciones, formación de producto, ciclos celulares e interacciones con el medio ambiente (47). Entender la cinética de crecimiento de las bacterias es una herramienta necesaria en el control de los procesos, ya que su estudio se basa en las velocidades y mecanismos de reacción del microorganismo, donde se relacionan las concentraciones con el tiempo, conversión de sustrato, concentración de biomasa, concentración de productos, etc (48,49), permitiendo conocer los rendimientos y viabilidad de los procesos desde un punto de vista económico.

Para que ocurra un crecimiento bacteriano óptimo es necesario primero tener una fuente de carbono y nitrógeno. Además, la incorporación de micronutrientes representados por sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co (50), y los macronutrientes que son fuente de C, N, S, P, K y Mg. Otro requerimiento, son los componentes orgánicos, que no son sintetizados ni metabolizados por las células, en cambio, son agregados como vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos no saturados (47).

Cuando se lleva a cabo una cinética de crecimiento, el microorganismo es inoculado en un medio de cultivo. El crecimiento de la biomasa es medido con un espectrofotómetro o lector de microplacas, en el cual una fuente de luz con una longitud de onda establecida atraviesa un tubo que contiene el cultivo bacteriano. Conforme la concentración celular aumenta el medio de cultivo se vuelve más turbio, generando una reducción en la cantidad de luz transmitida (51–53). El cambio de la intensidad de la luz inicial con la luz transmitida se relaciona con la concentración del cultivo y se registra como absorbancia o densidad óptica (DO) (51,52).

La absorbancia no es una medida directa del número de células. Sin embargo, a partir de estos valores es posible representar el crecimiento mediante una curva de crecimiento constituida por 4 etapas (54). Las curvas de crecimiento bacteriano (Figura 2) son representaciones empleadas para caracterizar el metabolismo de las bacterias en una variedad de medios. Los cultivos bacterianos crecen exponencialmente y la DO aumenta en función del Log (DO), con el logaritmo de la DO es posible observar un crecimiento lineal. Con las curvas de crecimiento también es posible conocer la tasa de crecimiento, que es el cambio en el número de células por minuto, o bien se estima como el cambio en la DO por unidad de tiempo (55).

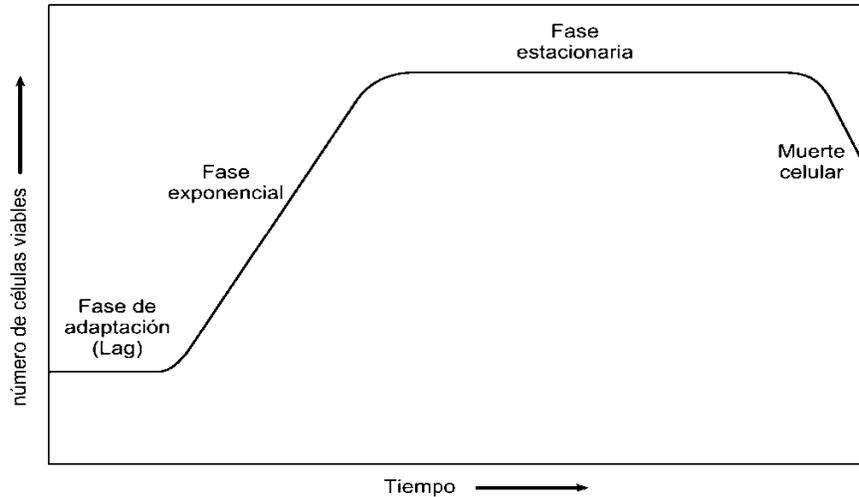


Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano.

La primera etapa corresponde a la *fase de adaptación*, que hace referencia al tiempo que tarda el microorganismo en adecuar su metabolismo a las nuevas condiciones y nutrientes del medio de cultivo, metabolizar la fuente de carbono disponible y alcanzar un estado fisiológico capaz de tener un crecimiento y división celular (54,56). Seguidamente, la *fase exponencial* representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente al consumir a gran velocidad los nutrientes del medio (56). Este crecimiento, división celular, replicación de ADN, transcripción del ARN y producción de proteínas ocurre rápidamente (55).

La *fase estacionaria* consiste en una ralentización del crecimiento bacteriano y por ende, no se presenta un aumento significativo en la densidad celular (56). Esto ocurre debido a la limitación o agotamiento de diversos nutrientes (55), donde las fuentes de carbono se agotan y las células continúan con vida hasta alcanzar la madurez, sin posibilidad de dividirse (54). Finalmente, la *fase de muerte celular* se da cuando las bacterias no pueden alimentarse y mantener la población, generando que el número de células decrezca y ocurra la lisis celular debido a la limitación de nutrientes (54,55).

3.1.5.3 Pruebas API 50 CH

El API 50 CH es un sistema estandarizado compuesto por ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo y patrón de fermentación de los carbohidratos presentes en microorganismos (43). Y se utiliza en combinación con el API 50 CHL Medium (tabla 1) para la identificación de *Lactobacillus* y microorganismos próximos (57).

Tabla 1. Composición del medio API 50 CHL Medium.

Compuestos	Concentración (g/10 ml)
Polipeptona (origen bovino/porcino)	10
Extracto de levadura	5
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotásico	2
Acetato sódico	5
Citrato diamónico	2
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Púrpura de bromocresol	0,17
Agua desmineralizada	1000 ml
pH	6,7-7,1

Referencia: (58).

Cada test cuenta con 10 galerías compuestas por 50 microtubos distribuidas en 5 columnas (10 microtubos c/u). Cada microtubo contiene una zona anaerobia (tubo) para el estudio de fermentación, y una zona aerobia (cúpula) para el estudio de oxidación o asimilación, tal como se muestra en la Figura 33. El primer microtubo sirve como control negativo dado que no cuenta con ningún sustrato y los siguientes contienen sustrato deshidratado (hidratos de carbono y derivados como heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos) (43,59).

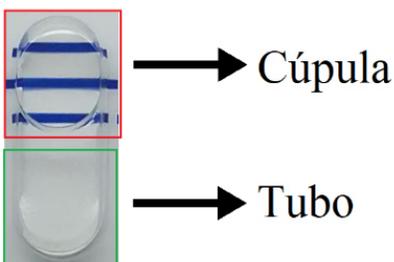


Figura 3. Partes del microtubo de la prueba API 50 CH.

Los sustratos (Tabla 2) pueden ser metabolizados por diversas rutas bioquímicas, como la asimilación, que se indica por el crecimiento del microorganismo en la cúpula por ser la única fuente de carbono. La oxidación, mostrada por un cambio de color en la cúpula debido a la producción aeróbica de ácido o bien la fermentación, que presenta un cambio de color en el tubo, y es debido a la producción anaerobia de ácido detectado por el indicador de pH incluido en el medio elegido (59).

Tabla 2. Sustratos incluidos en los microtubos de la prueba API 50 CH (58).

Tubo	Ensayo	Sustrato	Tubo	Ensayo	Sustrato
0			25	ESC	Esculina
1	GLY	Glicerol	26	SAL	Salicina
2	ERY	Eritritol	27	CEL	D-Celibiosa
3	DARA	D-Arabinosa	28	MAL	D-Maltosa
4	LARA	L-Arabinosa	29	LAC	D-Lactosa
5	RIB	R-Ribosa	30	MEL	D-Melibiosa
6	DXYL	D-Xilosa	31	SAC	D-Sacarosa
7	LXYL	L-Xilosa	32	TRE	D-Trealosa
8	ADO	D-Adonitol	33	INU	Inulina
9	MSX	Metil-βD-Xilpiranosido	34	MLZ	D-Melecitosa
10	GAL	D-Galactosa	35	RAF	D-Rafinosa
11	GLU	D-Glucosa	36	AMD	Almidón
12	FRU	D-Fructosa	37	GLYG	Glicógeno
13	MNE	D-Manosa	38	XLT	Xilitol
14	SBE	L-Sorbosa	39	GEN	Gentibiosa
15	RHA	L-Ramnosa	40	TUR	D-Turanosa
16	DUL	Dulcitol	41	LYX	D-Lixosa
17	INO	Inositol	42	TAG	D-Tagatosa
18	MAN	D-Manitol	43	DFUC	D-Fucosa
19	SOR	D-Sorbitol	44	LFUC	L-Fucosa
20	MDM	Metil-αD-Manopiranosido	45	DARL	D-Arabitol
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranosido	46	LARL	L-Arabitol
22	NAG	N-Acetilglucosamina	47	GNT	Gluconato potásico
23	AMY	Amigdalina	48	2KG	2-cetogluconato potásico
24	ARB	Arbutina	49	5KG	5-cetogluconato potásico

El principio de la prueba parte de poner en suspensión el microorganismo a estudiar en el medio y después se inocula en cada tubo de la galería. Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda del programa informático APIWEB™ (58).

3.1.6 Importancia y usos

El metabolismo de las BAL genera algunas sustancias como ácidos orgánicos (AL, AA, ácido propiónico), acetaldehído, etanol, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetil, bacteriocinas, entre otros (28,60). Estos propician un ambiente hostil para el crecimiento y la supervivencia de microorganismos patógenos debido a la disminución de pH y la generación de compuestos inhibitorios (25,61). La utilización de BAL está ampliamente desarrollada en la industria alimentaria para la “formación de sabor ácido, textura, inhibición de organismos patógenos, valor nutricional, gelificación de la leche, reducción de lactosa, formación de aroma y maduración de los quesos” (28), gracias a su producción de exopolisacáridos y modificación de

proteínas durante el proceso de fermentación. Esto sucede debido a su actividad metabólica sobre lípidos, proteínas y azúcares favoreciendo la digestión y preservación de los alimentos (28).

Un ejemplo de uso, son las bacteriocinas. Consideradas como biopreservantes naturales, dado que evitan el desarrollo de poblaciones de microorganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, hongos y levaduras (25), ya sea por su patogenicidad o por su efecto deteriorador. Son una alternativa al uso de aditivos químicos, dado que no son tóxicas al ser consumidas, y resisten temperaturas de producción en planta de alimentos como los tratamientos térmicos (62). Las BAL también son empleadas como probióticos, debido a su producción de ácidos orgánicos inhiben potencialmente el crecimiento de bacterias patógenas, que al disminuir el pH reduce las enfermedades gastrointestinales como diarrea y síndrome de colon irritable, su uso se extiende además para los ensilajes forrajeros y el ensilaje de pescado (7).

3.2 Ácido láctico

3.2.1 Definición

El AA (ácido 2-hidroxi-propanoico) es un compuesto orgánico formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo. Es incoloro, inodoro, soluble en agua y por lo general se encuentra en estado líquido. En su estado puro, son sólidos altamente higroscópicos, y forman cristales blancos (63,64). El AA está formado por 3 carbonos (Figura 4), donde el carbono 2 es asimétrico, que da lugar a su actividad óptica (63). Este ácido es producido por animales, microorganismos, plantas y puede obtenerse a partir de químicos derivados del carbón como el acetileno, aceites como el etileno, o bien, a partir de materiales de origen renovable como el etanol o el acetaldehído (32). El ser humano es capaz de metabolizar el isómero L(+), mientras que el isómero D(-) es perjudicial para el metabolismo (2).

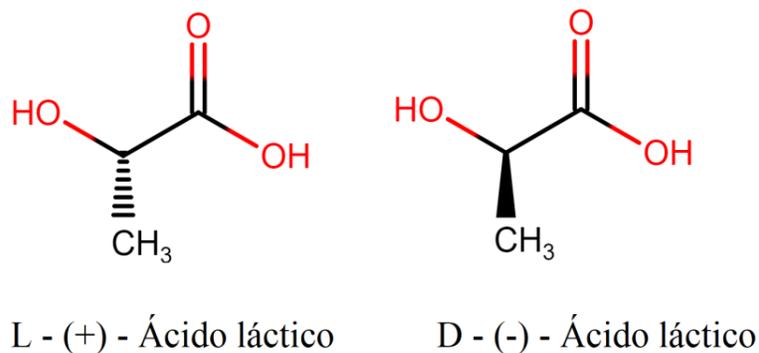


Figura 4. Formas isométricas del ácido láctico.

3.2.2 Aplicaciones

El AA es un ácido orgánico y versátil, sus aplicaciones pueden clasificarse en 3 áreas principales: alimentaria, farmacéutica, cosmética y química. En la industria alimentaria es utilizado por su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos sin alterar las características organolépticas de los productos. Por ende, es utilizado como preservante de carnes, embutidos, frutas y verduras (65,66), como gelificante en jaleas y mermeladas, como acidulante y acentuador de sabor en bebidas con zumos, confitería, aderezos, vinos y cerveza, como emulsionante y estabilizador en panadería y en general para la producción de quesos, yogures, requesones, entre otros (61, 68, 69).

En la industria farmacéutica y cosmética se emplea como electrolito de sueros intravenosos y fuente de minerales, así como humectante, antimicrobiano, rejuvenecedor de la piel y regulador de pH. Además es utilizado en la fabricación de ungüentos, lociones, suturas quirúrgicas y prótesis (61, 68). En la industria química el ácido láctico se emplea para preparar disolventes limpios, neutralizantes, desincrustantes y desinfectantes. Adicionalmente para la síntesis de aglutinantes para textiles y papeles, para sintetizar ácido acrílico para adhesivos y pinturas y 1-2 propanodiol para la elaboración de anticongelantes. Sin embargo, actualmente uno de sus usos de mayor importancia es como monómero para sintetizar el ácido poliláctico (2,65).

3.2.3 Producción de ácido láctico

La producción del ácido láctico se lleva a cabo mediante fermentación microbiana obteniendo isómeros puros, o bien, mediante síntesis química obteniendo mezclas racémicas de ácido D- y L-láctico (66). A nivel industrial cada isómero tiene aplicaciones distintas, sin embargo, dado que las propiedades físicas como solubilidad y punto de fusión son similares, la separación de cada isómero es una tarea costosa y complicada (65). Por este motivo a nivel de mercado la obtención de isómeros puros tiene más valor, siendo entonces la producción de AL por vía biotecnológica la más atractiva y utilizada a nivel mundial.

3.2.3.1 Síntesis Química

La síntesis química parte de la reacción del ácido cianhídrico con acetaldehído, que al emplear un catalizador se da la formación del lactonitrilo (ecuación 1). Posteriormente, mediante destilación se recupera el lactonitrilo y este es sometido a una hidrólisis a 100°C en la que se emplean ácidos fuertes como el H₂SO₄ o HCl con lo que se obtiene el ácido láctico (mezcla racémica) y sal de amonio (ecuación 2) (54,64). Posteriormente, resulta necesaria la purificación del AL el cuál es sometido a un proceso de esterificación empleando metanol para producir metil-lactato (ecuación 3), esto permite que el producto sea extraído y purificado por destilación, seguidamente es hidrolizado para producir nuevamente AL y obtener el metanol anteriormente utilizado (66,69) (ecuación 4).



La síntesis química presenta como desventajas un rendimiento de ~60%, emplea solventes dañinos para el medio ambiente (recursos petroquímicos) que implican un mayor gasto energético y condiciones de operación más severas (65). La principal desventaja es que no se obtiene un producto puro, sino una mezcla racémica lo que hace menos atractivo y más costoso este procedimiento.

3.3 Fermentación

El proceso de fermentación consiste en la preparación de un medio de cultivo rico en azúcares que será empleado como sustrato y seguidamente inoculado con el microorganismo. Empleando un biorreactor o fermentador y estableciendo las condiciones de trabajo, la producción de ácido láctico ocurre durante la fermentación y finaliza cuando todo el azúcar se ha consumido (64). Posteriormente, es necesaria la separación y la purificación del AL. Una de las desventajas de este proceso es el costo operativo, dado que es necesario que el material y los medios empleados estén esterilizados para evitar contaminaciones, así como los costos elevados que implica la separación y purificación (69).

La fermentación es un proceso metabólico de hongos, bacterias y levaduras. Donde ocurre la transformación de compuestos orgánicos como azúcares en sustancias más simples. Los microorganismos utilizan los sustratos y nutrientes presentes en el medio de cultivo como alimentos para multiplicarse, de modo que en el transcurso del proceso van aumentando su concentración, a la vez que se modifican los sustratos del medio de cultivo y por acción microbiana son transformados en biomasa y metabolitos más simples que pueden incluir ácidos orgánicos, alcoholes, compuestos volátiles de aroma, exopolisacáridos, péptidos, bacteriocinas y/o sustancias antimicrobianas, entre otros (70–72).

Existen factores internos y externos que pueden influir en el desarrollo del proceso. A nivel interno destacan los factores genéticos de los microorganismos que intervienen directamente en los procesos metabólicos. A nivel externo se consideran variables de manipulación física tales como la temperatura, agitación, aireación y pH (73). Factores químicos como los macro y micronutrientes, fuentes de carbono y nitrógeno, así como vitaminas, aminoácidos, entre otros (32). La Figura 5 muestra un esquema del proceso según lo establece (73).

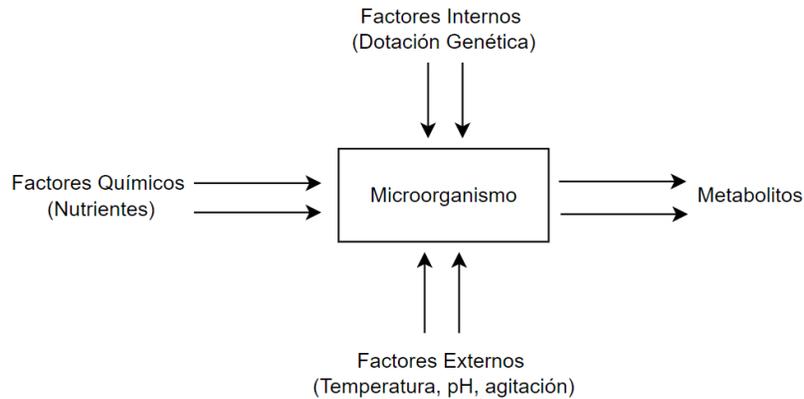


Figura 5. Influencia de los factores internos y externos sobre la fermentación.

Los procesos fermentativos pueden desarrollarse a pequeña o gran escala. Existen 6 tipos de fermentación, siendo la alcohólica, láctica, maloláctica, propiónica, butírica y acética. Durante la producción de un metabolito como el AL a partir de una fermentación láctica empleando BAL, la fermentación puede ser escalada en diversas etapas. Comenzar empleando placas con micropocillos, continuar con microbiorreactores, posteriormente a matraces y finalmente emplear biorreactores. El volumen de trabajo inicial corresponde a 250 μ L y el final a 4 L o más.

3.3.1 Fermentación Microbiológica

Actualmente la mayor producción del ácido láctico es generado a partir de rutas biotecnológicas empleando BAL homo y heterofermentativas (74), este proceso consiste en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos empleando bacterias u hongos y tiene la ventaja de producir AL ópticamente puro L(+) y D(-) (60). Para lograr la efectividad del proceso es necesario establecer las condiciones durante la fermentación que favorezcan el crecimiento celular y producción del metabolito. Las condiciones son el tipo de microorganismo, pH, temperatura, agitación, tipo de fermentación, fuente de carbono y nitrógeno (75). Como parte de sus ventajas, existe la posibilidad de emplear materia prima de origen vegetal como trigo, papa, tapioca, yuca, melaza, caña de azúcar, maíz, suero de leche, etc (69), lo que permite el aprovechamiento de carbohidratos renovables de residuos agroindustriales. Los carbohidratos se suplementan si es necesario para asegurar el crecimiento adecuado del microorganismo.

3.3.2 Equipo y escala de producción

3.3.2.1 Microplaca

Una microplaca es una placa hecha comúnmente a base de polipropileno que cuenta con múltiples pocillos utilizados como pequeños tubos de ensayo. Tienen la capacidad de ser almacenadas a bajas temperaturas durante periodos prolongados o bien pueden ser calentadas según las necesidades del experimento. Existen diversos tipos de microplacas. Según su uso pueden contar con 6, 12, 24, 96, 384 o incluso 1.536 pocillos organizados en una matriz rectangular de formato

2:3. Los pocillos pueden ser circulares o cuadrados y ser empleados con múltiples fines. Las placas de 96 pocillos cuentan con una capacidad de 300 μL en cada uno de sus pocillos, además cada uno cuenta con identificación alfanumérica (76). Cuenta con bordes altos y paredes lisas libre de estrías que previenen una contaminación cruzada.

3.3.2.2 Microbiorreactor

Son biorreactores a pequeña escala también conocidos como micromatrices de 24 biorreactores. Los 24 recipientes cilíndricos tienen un volumen de trabajo de 5 mL y están distribuidos en un cassette de policarbonato. Su diseño permite controlar variables esenciales durante un proceso de fermentación, tales como temperatura, oxígeno disuelto, pH y agitación (77). Los 3 diseños de cassette y el cierre de los pocillos permiten desarrollar fermentaciones en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y el cultivo de células de mamíferos e insectos.

3.3.2.3 Biorreactor

Un biorreactor, también llamado fermentador es un recipiente de reacción en el cual se lleva a cabo la fermentación mediante una reacción biológica en estado líquido o sólido (78). Para que esto ocurra, se crean condiciones óptimas para el cultivo y multiplicación del microorganismo con el que se trabaje (72). Durante el desarrollo del proceso, es necesario que existan condiciones controladas (temperatura, pH y agitación), para asegurar la homogeneidad entre los componentes del sistema y obtener el metabolito de interés. Dichas condiciones determinan la forma de construcción de los biorreactores (72,78) como el suministro de nutrientes (carbono, nitrógeno, fósforo y sales). Si la fermentación es anaeróbica es necesario corroborar que exista el suministro de oxígeno para mantener la aireación del medio.

3.3.2.3.1 Partes de un biorreactor

Las fermentaciones llevadas a cabo en biorreactores industriales constan de 13 piezas distintas que aseguren la eficacia del proceso. La Figura 6 muestra 7 de las partes principales que componen el biorreactor (79).

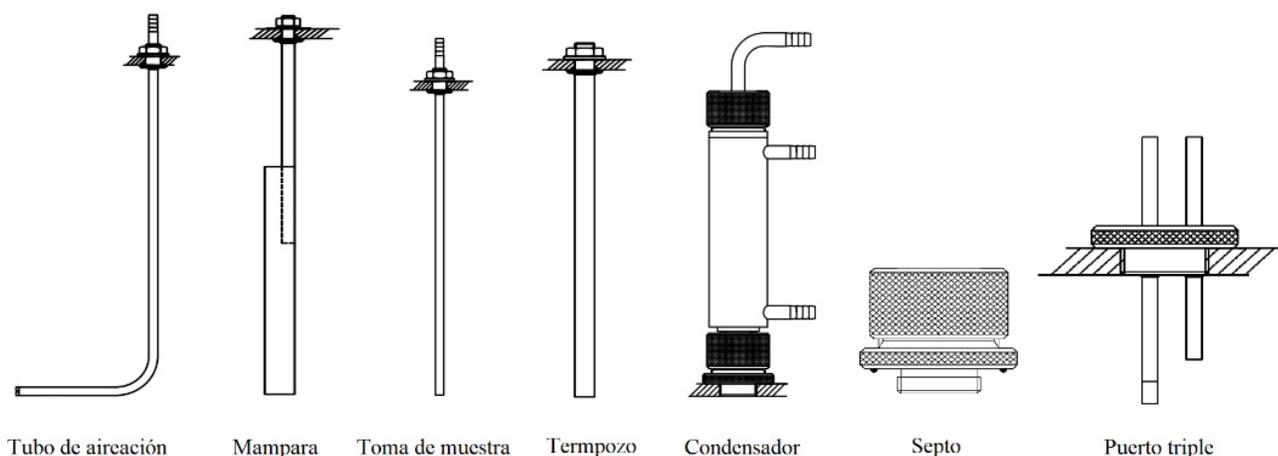


Figura 6. Partes principales que componen los biorreactores.

El **tubo de aireación**, cuenta con pequeños orificios en la parte inferior que garantizan que la corriente de gas o aire sean expulsados al medio. Este es utilizado para satisfacer la demanda de oxígeno de un cultivo. Las **mamparas** se utilizan para aumentar la eficiencia de la mezcla asegurando la homogeneidad en el medio. Si estas no son utilizadas el flujo del medio puede volverse laminar, lo que provoca una mala eficiencia de mezcla y transferencia de masa. El **tubo de muestra** se utiliza como una conexión directa con el medio, empleado para extraer muestras y efectuar mediciones o análisis según corresponda. El **termopozo** permite controlar la temperatura durante el proceso de fermentación (79).

El **condensador** es la salida de aire que evita la disminución de volumen y concentración de nutrientes generada por la evaporación durante la fermentación cuando existen temperaturas elevadas y aireación del cultivo. El **septo**, está hecho a base de caucho de silicona y puede ser utilizado como un puerto de adición al perforarlo con una o más agujas. El **puerto triple** es un dispositivo que permite tres conexiones simultáneamente. Este es utilizado generalmente para la adición de ácido, base y antiespumante. Sin embargo, en fermentaciones fed-batch puede ser utilizado como puerto de alimentación (79). El diseño del biorreactor cuenta además con sensores de pH, oxígeno disuelto, y de nivel. Así como un puerto de adición, sensor de biomasa o tapón y tornillos ciegos anchos y delgados.

3.3.2.3.2 Operación de un biorreactor

Según el microorganismo que se utilice, el metabolito de interés y el rendimiento deseado, la operación del biorreactor puede variar. Existen 3 modos de operación: discontinuo, semicontinuo y continuo.

3.3.2.3.2.1 Discontinuo o batch

La fermentación tipo batch es la forma de cultivo más utilizada. Las características del proceso son previamente conocidas, tales como volumen de trabajo, concentración inicial del inóculo, tiempo de fermentación y condiciones de operación.

El proceso inicia al introducir al biorreactor el volumen del medio de cultivo estéril y posteriormente se inocula con el microorganismo seleccionado. La fermentación ocurre durante el tiempo esperado y seguidamente se cosecha el caldo. Este proceso se considera un sistema cerrado, dado que el crecimiento de microorganismos ocurre sin que las condiciones del medio sean alteradas por nutrientes adicionales, existiendo un volumen constante y sólo las condiciones del medio son controladas por el operador (pH, espuma, temperatura, aire, velocidad de agitación, etc) (80,81).

La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células. El proceso finaliza cuando todo el sustrato es consumido por la biomasa. Las ventajas que presenta este proceso están los tiempos de cultivo cortos generando bajo riesgo de infección y/o contaminación,

bajos costos de inversión, un proceso versátil, entre otras. Los inconvenientes que presenta son la necesidad de un inóculo por batch o lote, tiempos muertos de esterilización, llenado, cosecha, limpieza y fluctuaciones en la calidad del producto (81).

3.3.2.3.2 Semicontinuo o fed-batch

En la fermentación tipo fed-batch el medio de cultivo es agregado por etapas para garantizar un crecimiento óptimo del microorganismo. En este proceso el volumen de trabajo aumenta conforme trasciende la fermentación, sin embargo, es similar al proceso batch, dado que las condiciones del medio son controladas por el operador tales como el pH (adición de ácido o base), nivel de espuma, temperatura, oxígeno disuelto, velocidad de agitación, etc (81).

El proceso inicia al introducir al biorreactor una parte del medio de cultivo e inocularlo con el microorganismo seleccionado, posteriormente ir añadiendo sustrato de manera escalonada a medida que progresa la fermentación. El objetivo de agregar nutrientes de forma semicontinua es que se mejora la productividad al mantener una baja concentración del sustrato (80,82). Esto permite que el microorganismo mantenga un crecimiento constante y los nutrientes no se acaben hasta que se termine la fermentación.

Las ventajas de este tipo de fermentación es que existe un alto índice de productividad debido al tiempo de cultivo, mantiene condiciones óptimas y una alta flexibilidad. Sin embargo, existen muchos tiempos muertos y desgaste de material. Además, la velocidad de adición del medio de cultivo posterior al inicio de la fermentación debe ser lenta, de lo contrario el microorganismo podría presentar inhibición del crecimiento por exceso de nutrientes.

3.3.2.3.3 Continuo

El proceso de fermentación continuo consiste en proporcionar nutrientes y retirar productos de un biorreactor a una tasa constante (82). A ciertas condiciones el cultivo puede alcanzar un estado estacionario en el tiempo. Por ende, este proceso se puede utilizar para producir sustancias biológicas a condiciones óptimas y para estudios fisiológicos (80). El objetivo de este tipo de fermentación es minimizar los costos e incrementar los rendimientos, a pesar de esto no es un método tan utilizado como la fermentación tipo batch.

Entre sus ventajas destaca la posibilidad de obtener un producto consistente en su calidad, bajo costo de personal y procesos automatizados y económicos. Sin embargo, requiere una misma calidad en la materia prima, una alta inversión para la automatización del proceso, tiene un alto riesgo de contaminación y mutación (81).

3.3.3 Medios de cultivo

El medio más utilizado para las BAL corresponde al MRS. El medio fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe en 1960 como una búsqueda para sustituir el jugo de tomate previamente

utilizado, dado que no todas las bacterias del género presentaban un crecimiento apropiado y el jugo era muy variable de un lote a otro (83). Su composición ha permitido el desarrollo adecuado de lactobacilos y otras BAL.

En su composición, la peptona, glucosa, extracto de carne y levadura son las que aportan vitaminas, minerales, nitrógeno y carbono, identificándose como las fuentes nutritivas. Los factores que estimulan el crecimiento bacteriano e inhiben el desarrollo de otros microorganismos son aportados por las sales de magnesio, manganeso, sodio y el tween 80. Este medio al ser rico en nutrientes y las BAL son bacterias Gram positivas el citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas (84). A diferencia del caldo, el agar tiene la misma composición, sólo que cuenta con agar bacteriológico (12 g/L) y su pH final debe ser de 6,4 (85). A pesar de que el MRS es el medio ideal de crecimiento, en diversos estudios se ha explorado el aprovechamiento de medios alternativos que buscan disminuir los costos y revalorizar residuos agroindustriales (62). La tabla 3 muestra un resumen de los medios alternativos comúnmente utilizados. Sin embargo, existen otros no mencionados en este documento.

Tabla 3. Sustratos alternativos empleados para el crecimiento de BAL y producción de AL.

Sustrato	Microorganismo	Ácido Láctico	Autores
Alfalfa	<i>Lactobacillus plantarum</i>	34- 43,4 g/L	(86)
	<i>Lactobacillus delbruekii</i>		
Almidón de ñame	<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	16,26 %	(60)
Banano	<i>Lactobacillus casei</i>	1.49 g/L/h	(68)
Jugo de dátil	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	22,5-24,8 g/L	(87)
Jugo de piña	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	----	(54)
	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	102 g/L	(88)
Leche	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	----	(89)
	<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	----	(90)
Maíz	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	96,7 g/L	(91)
		99,6 g/L	(92)
Melaza	<i>Lactobacillus plantarum</i>	84,2 g/L	(93)
Naranja	<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>delbruekii</i>	6,72 g/L/h	(65)
Soya	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	125 g/L	(94)
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	----	(95)
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10 %	(96)
	<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	36,7 g/L	(97)
	Suero de leche		25 g/L
<i>Lactobacillus casei</i>		76,24 g/L	(99)
		1,2 g/L/h	(75)

La tendencia actual se basa en el uso de residuos agroindustriales que aún poseen concentraciones importantes de carbohidratos o polisacáridos que pueden ser aprovechados. Algunas de las tendencias en ascenso hacen referencia al uso del suero de leche (75).

3.3.3.1 Suero de leche

El suero de leche, también conocido como lactosuero, se define como “el líquido remanente que resulta de la coagulación de las proteínas caseicas de la leche durante la elaboración de queso” (100). Representa aproximadamente el 90% del volumen de la leche y se encuentra compuesto por carbohidratos, minerales, vitaminas y proteínas. Existen dos tipos de suero de leche: el dulce y el ácido. Su variación se debe principalmente en el contenido de minerales, acidez, composición química de la proteína, así como al proceso de eliminación de la caseína.

La caseína en el suero dulce se elimina por la coagulación de la renina y en el suero ácido se da por la fermentación o adición de ácidos orgánicos (101). La tabla 4 muestra la composición nutricional del suero de leche dulce y ácido, y la tabla 5 muestra las vitaminas y aminoácidos que lo componen.

Tabla 4. Composición del suero de leche dulce y ácido (101,102).

Componente	% p/v	Suero dulce (g/L)	Suero ácido (g/L)
Calcio	8,0-10,0	0,4-0,6	1,2-1,6
Cloruros	--	1,1	1,1
Fosfatos	--	1,0-3,0	2,0-4,5
Lactato	--	2	6,4
Lactosa	4,5-5,0	46,0-52,0	44,0-46,0
Lípidos	0,5-8,0	--	--
Proteína	0,8-1,0	6,0-10,0	6,0-8,0
Sólidos totales	--	63,0-70,0	63,0-70,0

Tabla 5. Concentración de aminoácidos y vitaminas presentes en el suero de leche (101).

Aminoácido	Concentración g/100 g proteína	Vitaminas	Concentración (mg/ml)
Treonina	6,2	Tiamina	0,38
Cisteína	1	Riboflavina	1,2
Metionina	2	Ácido nicotínico	0,85
Valina	6	Ácido pantoténico	3,4
Leucina	9,5	Piridoxina	0,42
Isoleucina	5,9	Cobalamina	0,03
Fenilalanina	3,6	Ácido ascórbico	2,2
Lisina	9	--	--
Histidina	1,8	--	--
Triptófano	1,5	--	--

Desde el punto de vista nutricional el suero de leche es un residuo valioso. Sin embargo, su utilización es poca comparada con su producción, generando volúmenes de residuo considerables (96). Su descarga en el medio ambiente provoca daños importantes en los ecosistemas, dado que interfiere negativamente en la estructura física y química del suelo, generando una disminución en el rendimiento de los cultivos agrícolas y un agotamiento del oxígeno disuelto en mantos acuíferos

(95,101). Sin embargo, a través de procesos de bioconversión pueden obtenerse del suero productos con un alto valor comercial (96).

El suero de leche se utiliza en la industria alimentaria por sus propiedades gelificantes y emulsificantes para la elaboración de productos cárnicos, bebidas fermentadas, postres, confitería, lácteos y panadería. A nivel farmacéutico se emplea para pomadas antifúngicas, alimentos dietéticos, pastas dentales y fórmulas para niños (100). A nivel químico se usa para obtener aislados, concentrados e hidrolizados de proteína (102). En la industria textil se usa para la producción de polímeros biodegradables, fabricación de papel, pinturas y barnices. Finalmente, a nivel industrial se utiliza para la producción de biomasa, exopolisacáridos, ácidos orgánicos como etanol, ácido láctico, acético y propiónico, etc (101).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental para el desarrollo del presente estudio se llevó a cabo en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot). En total, se caracterizaron 30 aislamientos de BAL procedentes de residuos agroindustriales para identificar el aislamiento más promisorio en función de la producción de AL. La selección del aislamiento más promisorio se basó en la DOMáx, la tasa de crecimiento, la producción de AL y AA, el consumo de glucosa, la reacción con 49 azúcares mediante las pruebas API 50 CH, así como su potencial de crecimiento en medios alternativos. Los resultados obtenidos permitieron utilizar el aislamiento *Weissella soli* previamente identificada como la más promisorio para producir AL en un biorreactor (7 L) a escala de planta piloto.

4.1 Aislamientos de bacterias ácido lácticas

Los aislamientos de BAL utilizados, fueron proporcionados por el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), y proceden de residuos agroindustriales. Los 30 aislamientos estudiados se muestran en la tabla A1 (anexo A) con su respectivo código de identificación, especie y procedencia. La tabla 6 muestra los aislamientos clasificados de acuerdo con su procedencia.

Tabla 6. Clasificación de la especie de los aislamientos de las BAL de acuerdo con el tipo de residuo del cual fueron extraídas.

Procedencia	Especie de la bacteria
Broza de café	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>
Residuos de zanahoria	<i>Weissella soli</i>
Residuos de naranja-banano	<i>Leuconostoc falkenbergense</i>
	<i>Levilactobacillus brevis</i>
	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>
Celdas de combustible microbiana de aguas mieles de café	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>
	<i>Lactobacillus harbinensis</i>

4.2 Activación de aislamientos de BAL

Los aislamientos de BAL se almacenaron en tubos eppendorf con glicerol y se congelaron a -80°C . El proceso de activación consistió en tres pasos (Figura 7). En el primer paso se realizó un rayado mediante el método de rayado por estría del aislamiento y se sembró en una placa Petri para posteriormente incubarla a 24 ± 2 h a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, el segundo paso consistió en tomar con un asa de siembra una colonia de las bacterias en la placa y se disolvió en 5 ml de Caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Sigma Aldrich) en tubos de ensayo de 15 ml. Los inóculos se incubaron durante 24 ± 2 h a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. El tercer paso consistió en rayar nuevamente una placa Petri a partir del caldo. Una vez realizado el proceso de activación a partir del rayado final se tomó una colonia de cada aislamiento para llevar a cabo los ensayos de cinética de crecimiento.

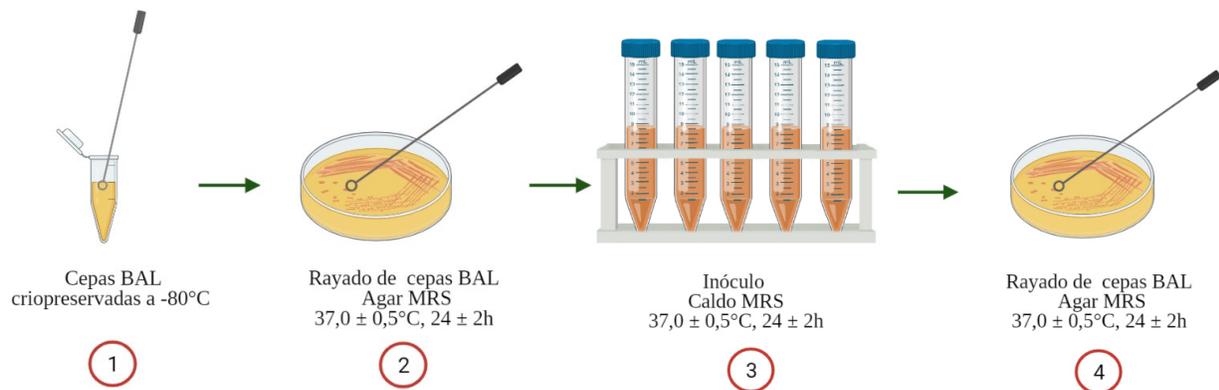


Figura 7. Procedimiento para la activación de aislamientos de BAL.

4.3 Preparación de los medios de cultivo

Se empleó agar y caldo MRS (Sigma Aldrich) para la siembra en placa Petri y preparación de inóculos, dilución, montaje de microplaca, microbiorreactor y biorreactor. El agar y caldo se prepararon disolviendo 61 y 51 g respectivamente en 1 L de agua de ósmosis. La dilución se completó empleando una placa calefactora con agitación a 700 rpm por 15 min. Posteriormente, los medios fueron esterilizados en una autoclave (Tuttnauer, 3870 EHS) a 121°C por 45 min. La preparación del medio en las placas consistió en verter 25 ml de agar de forma homogénea en cada placa Petri. Este proceso se realizó en una cámara de bioseguridad en condiciones asépticas. Posteriormente, se dejaron solidificar por 20 min y se almacenaron a 4°C .

4.4 Dilución

El proceso de dilución se efectuó con el fin de conocer las condiciones iniciales de crecimiento de la bacteria en caldo después de 24 h. Esta información es necesario determinarla previo a los ensayos a escala de laboratorio y a escala de planta piloto. A partir de esta información se determinó la concentración necesaria para la siembra de cada aislamiento en una microplaca de 96

pocillos, en un cassette o un biorreactor. La dilución consistió en agregar caldo MRS e inóculo previamente homogenizado en tubos eppendorf en una proporción 1:2, 2:4, 3:4 según fuera necesario. Posteriormente, se procedió al llenado de una placa de 96 pocillos para determinar las condiciones iniciales según sea indicado por el lector de microplacas (BioTek, Epoch 2™).

4.5 Caracterización de la cinética de crecimiento de los aislamientos de bacterias ácido láctico.

El desarrollo de este objetivo consistió en dos pasos. El primero abarcó los ensayos de tinción de Gram de la totalidad de los aislamientos de BAL. La prueba se efectuó para conocer la morfología y medir el tamaño de las bacterias incluidas en este estudio. Este proceso consistió en la preparación del frotis y la tinción de las bacterias. Posteriormente, en el segundo paso se caracterizó la cinética de crecimiento de las bacterias en microplaca.

4.5.1 Tinción Gram

4.5.1.1.1 Preparación del frotis

En el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se colocaron dos gotas de agua estéril con un asa de siembra bacteriológica. Seguidamente, una colonia se colocó en el agua estéril. Este procedimiento se repitió en cada uno de los aislamientos de BAL. El material se frotó directamente sobre el portaobjetos para formar una suspensión bacteriana homogénea y se dejó secar.

4.5.1.2 Tinción de Gram

Las células fijadas al portaobjetos se cubrieron con una solución colorante de cristal violeta, se dejaron reposar por 1 min y se retiró el colorante mediante un suave lavado con agua de ósmosis. Posteriormente, se agregó Lugol y se dejó reaccionar por 2 min, el exceso se retiró con agua de ósmosis y se decoloró la muestra al incorporar una mezcla de alcohol-acetona al portaobjetos. Las bacterias (Gram +) que mantienen el color violeta, después de transcurrido 1 min se lavaron con agua de ósmosis. Las bacterias (Gram -) que perdieron el color violeta se les añadió safranina, después de transcurrido 1 min se retiró el exceso de colorante con agua de ósmosis hasta el secado. La morfología de los aislamientos se observó con un microscopio (Motic, BA310) con un objetivo 40X/0,65.

4.5.2 Cinética de crecimiento de las BAL

En una placa de 96 pocillos se incorporó caldo MRS como medio de control y el inóculo previamente diluido de cada uno de los aislamientos de las BAL por triplicado. La absorbancia inicial correspondió a 0,05 nm y un volumen de 250 µl. La placa se selló con papel parafilm y se tomaron las mediciones cada 15 min en el lector de microplacas durante 24 ± 2 h a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Los datos obtenidos permitieron el cálculo de la $DO_{\text{máx}}$ y la tasa de crecimiento de las BAL. De la totalidad de los aislamientos se seleccionaron nueve para realizar los ensayos en un microbiorreactor.

4.6 Cuantificación de la producción de ácido láctico y consumo de glucosa de las bacterias ácido lácticas a escala de laboratorio

Este objetivo consistió en cuantificar la producción de ácido láctico y el consumo de glucosa de las BAL para elegir el aislamiento más promisorio según la tasa de producción de ácido láctico. El desarrollo de este objetivo consistió en dos ensayos. El primero abarcó la fermentación de las BAL en un microbiorreactor. Posteriormente, se ejecutó el procedimiento API 50 CH para la totalidad de los aislamientos en estudio.

4.6.1 Proceso de fermentación en un microbiorreactor a escala de laboratorio.

La preparación consistió en un rayado previo en placa Petri de los nueve aislamientos de BAL seleccionados. Los inóculos se prepararon con sus correspondientes diluciones para conocer las concentraciones iniciales de las bacterias. Posteriormente, el montaje en un cassette (MicroReactor Technologies modelo Pall,) consistió en incorporar caldo MRS como medio de control y el inóculo de cada aislamiento de BAL por triplicado. La absorbancia inicial se ajustó a 0,05 nm y un volumen de 5 ml. Posteriormente, el cassette se incorporó a un microbiorreactor (Biotechnology, Applikon) durante 24 ± 2 h a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con agitación constante (Figura B1, anexo B). El sobrenadante se extrajo transcurrido un tiempo de 24 h, luego se filtró ($0,20 \mu\text{m}$) y las muestras se almacenaron a $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. (Figura B2, anexo B). La producción de ácido láctico, ácido acético y glucosa consumida por cada aislamiento de BAL se cuantificó en el laboratorio de química del CITA, mediante HPLC. Las mediciones se realizaron por duplicado.

4.6.2 Prueba de fermentación de carbohidratos API 50 CH

Para la preparación de las muestras, se inició con el rayado de nueve aislamientos de BAL en agar MRS y fueron incubadas durante 24 ± 2 h a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se procedió a preparar el inóculo empleando como medio de cultivo el API 50 CHL Medium™ bioMérieux (Figura B3, anexo B). La turbidez se mantuvo en un valor de 2 en la escala McFarland para asegurar una suspensión bacteriana densa. La prueba de fermentación de carbohidratos se llevó a cabo con el sistema miniaturizado API 50 CH™ (bioMérieux) que permite identificar bacterias del género *Lactobacillus* (Figura B4, anexo B).

Este sistema cuenta con una plantilla plástica con un total de 5 galerías (Figura 8). Durante la inoculación se mantuvo una ligera inclinación en la plantilla para evitar la formación de burbujas de aire durante el llenado. Finalmente se colocó la tapa plástica del kit sobre las galerías y se incubaron durante 48 ± 2 h a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Los resultados se reportaron en imágenes, y se analizaron con el programa APIWEB™ (bioMérieux).

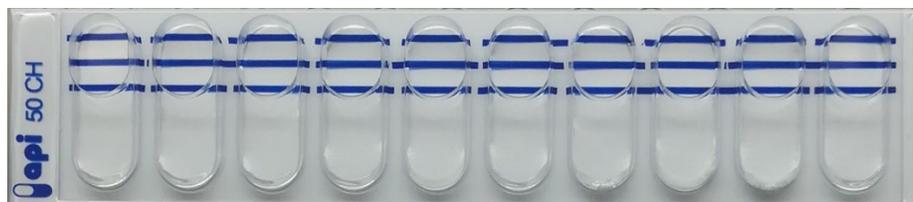


Figura 8. Galería con 10 microtubos.

4.7 Proceso de producción de AL del aislamiento más promisorio en un biorreactor a escala de planta piloto.

El desarrollo de este objetivo se enfocó en la producción de AL. La ejecución constó de dos etapas. La primera consistió en someter el aislamiento elegido como el más promisorio a diversos tratamientos a base de sales, azúcares, extractos y peptona junto con suero de leche, con el fin de determinar los suplementos que potencian su crecimiento y evaluar la elección del mejor extracto mediante la fermentación en matraz. La segunda etapa consistió en la fermentación en un biorreactor haciendo uso de los suplementos seleccionados en la etapa previa. Los suplementos seleccionados consisten en glucosa, fructosa, extracto de levadura, K_2HPO_4 y KH_2PO_4 . El orden de las etapas permite conocer el comportamiento del aislamiento con diversos extractos, y verificar si su comportamiento es el mismo al aumentar su volumen de trabajo.

4.7.1 Uso de suplementos con un medio alternativo para la fermentación en placas de 96 micropocillos.

El crecimiento del aislamiento elegido como el más promisorio se analizó en dos medios alternativos (base y sintético) y en la adición de suplementos a base de sales, fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo con el fin de conocer si existía una mejor alternativa a las combinaciones previamente reportadas en la bibliografía. En total se efectuaron 18 tratamientos por triplicado con dos repeticiones.

Se consideró la $DOM_{\text{máx}}$ y la tasa de crecimiento. Se utilizó $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (J.T. Baker, 10 g/L) y peptona (Oxoid, 100 g/L), estos suplementos se evaluaron en dos concentraciones diferentes en la microplaca. Además, se utilizó K_2HPO_4 (Fermont, 50 g/l), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (Sigma, 10 g/L), extracto de carne (Oxoid, 100 g/L), extracto de levadura (Sigma, 100 g/L), glucosa (PhytoTech, 100 g/L), KH_2PO_4 (Fisher Chemical, 12,5 g/L), NH_4Cl (Sigma, 1,3 g/L, pH = 7), $(NH_4)_2 SO_4$ (Sigma, 2,6 g/L, pH = 7) y NH_4OH (2 g/L, pH = 7). Adicionalmente, se empleó caldo MRS como control positivo, suero de leche previamente centrifugado a 25°C y 2500 rpm, un medio base y un medio sintético. La tabla 7 muestra la composición de cada tratamiento empleado y la tabla 8 la composición del medio base.

Tabla 7. Composición de los tratamientos empleados para evaluar la eficacia de los suplementos.

Disolución	Control negativo	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ 7H ₂ O (1)	MgSO ₄ 7H ₂ O (2)	MnSO ₄ 4H ₂ O	Pep 10	Pep 20	Glucosa	Extracto Levadura	Extracto Carne	KH ₂ PO ₄	NH ₄ Cl	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ OH
Suero	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
Glucosa	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Agua	90	80	89,5	85	88,75	65	40	40	80	70	80	75,5	75,5	75,5
Suplemento	0	10	0,5	5	1,25	25	50	50	10	20	10	14,5	14,5	14,5
Inóculo	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tabla 8. Composición del medio de cultivo base.

Reactivo	Concentración (g/L)
Glucosa	50,0
Ext. Levadura	4,00
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,60
Acetato de sodio	1,00
MnSO ₄ 4H ₂ O	0,03
KH ₂ PO ₄	0,50
K ₂ HPO ₄	0,50

4.7.2 Procesos de fermentación a escala de planta piloto.

4.7.2.1 Preparación de los medios

Los medios elegidos como alternativa para reemplazar al caldo MRS se prepararon previo a los procesos de fermentación y fueron conservados en refrigeración a 4°C hasta su uso. El medio sintético seleccionado se compone de 1 L de agua de ósmosis, 10 g de glucosa, 10 g de fructosa, 10 g de sacarosa y 15 g de extracto de levadura. El medio a base de suero de leche se compone de 1 L de suero previamente pasteurizado a 75°C durante 5 min en una tetera (Westfalia-GEAS, Bonn), y centrifugado, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de KH_2PO_4 . Este tiene un valor de pH entre 6,5 y 6,8. Posteriormente, se añadieron 40 ml de extracto de levadura (100 g/L).

4.7.2.2 Fermentación en matraz

El montaje en matraz consistió en incorporar el medio de crecimiento y el inóculo del aislamiento de BAL previamente seleccionado como el más promisorio por triplicado. La absorbancia inicial que fue previamente definida correspondió a 0,05 nm y un volumen de 1 L. Posteriormente, los matraces se colocaron en una incubadora con agitación (Thermo scientific, MaxQ 480 R HP) durante 24 ± 2 h a $37 \pm 0,5^\circ C$, 200 rpm. La toma de las muestras (10 ml) se realizó al inicio y posteriormente cada 2 h, se determinó su DO, el valor de pH, y se filtraron 1,5 mL de la muestra para su posterior análisis mediante HPLC.

4.7.2.3 Fermentación en biorreactor

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un biorreactor (Applikon Biotechnology) de 7 L de capacidad, con sensores de pH, temperatura, oxígeno disuelto y nivel (figura 9). En total se utilizaron 6 biorreactores. El biorreactor se ensambló con puerto de adición del medio de cultivo, inóculo, entrada de ácido y base, toma de muestra, tubo de aireación, condensador, 3 mamparas, 2 agitadores de 5 hojas planas tipo rushton con una separación de 7 cm. Los detalles de la configuración se muestran en la figura B5 y B6 (anexo B).



Figura 9. Biorreactor y tapa Applikon Biotechnology de 7 L de capacidad.

Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado para los dos medios de cultivo seleccionados, mediante un proceso discontinuo, se empleó un volumen de trabajo de 4 L. La toma de muestra (10 mL) se realizó al inicio y posteriormente cada 2 h por un periodo de 20 h. Durante la fermentación se controlaron los parámetros de la acidez del medio de cultivo, el valor de pH se mantuvo en 6,80 a partir de NaOH 2M como medio base y H₂SO₄ 2M como medio ácido, la temperatura se mantuvo en 37°C, la generación de espuma se reguló con la adición de antiespumante (antifoam 204 al 10 %), además se mantuvo una agitación constante de 200 rpm.

El intervalo de la toma de muestra se cambió cada hora cuando la bacteria presentó un crecimiento exponencial. A partir de la muestra obtenida se midió la DO de cada biorreactor con cubetas y un espectrofotómetro UV-visible (Perkin Elmer, Lambda 35) y se filtraron 1,5 mL del caldo para un posterior análisis mediante HPLC.

4.8 Diseño Experimental y análisis estadístico.

Para las evaluaciones de cinética de crecimiento y la densidad de crecimiento de las BAL se utilizó un diseño experimental completamente al azar simple con 30 factores con 4 repeticiones. Las variables independientes corresponden a los aislamientos de BAL y las variables respuesta corresponden a la DO_{máx} y la tasa de crecimiento.

Para las evaluaciones de fermentación en un microbiorreactor y cuantificación de la producción de ácido láctico y el consumo de glucosa de los aislamientos de BAL, se utilizó un diseño experimental completamente al azar simple con un total de 2 repeticiones. Las variables independientes corresponden a los nueve aislamientos de BAL. Las variables respuesta corresponden a la producción de AL, AA y al consumo de glucosa. Además, se incluyó caldo MRS como un control positivo.

El estudio de tratamientos mediante la adición de suplementos en el medio de cultivo evaluado mediante cinéticas de crecimiento empleó un diseño experimental completamente al azar con 18 factores con 2 repeticiones. Las variables independientes corresponden a los tratamientos (control positivo y negativo, medio sintético, medio estándar, MgSO₄ • 7H₂O (2 concentraciones), peptona 10 y 20%, K₂HPO₄ (2 concentraciones), MnSO₄ • 4H₂O, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa, KH₂PO₄, NH₄Cl, (NH₄)₂ SO₄ y NH₄OH)) y las variables respuesta corresponden a la DO_{máx} y la tasa de crecimiento. La fermentación en matraz empleando los tratamientos elegidos a partir de las cinéticas de crecimiento empleó un diseño experimental completamente al azar con 2 factores (medio sintético y suero de leche suplementado) y 3 repeticiones. Las variables independientes corresponden a los tratamientos y las variables respuesta corresponden a la DO, pH y producción de AL, AA y consumo de azúcares.

La producción de AL del aislamiento más promisorio mediante fermentación en un biorreactor a escala de planta piloto empleando diferentes medios de cultivo empleó un diseño experimental completamente al azar con 2 factores (medio sintético y suero de leche suplementado) y 3

repeticiones. Las variables independientes corresponden a los medios empleados y las variables respuesta corresponden a la DO, la producción de AL, AA, consumo de glucosa y NaOH (pH).

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor mediante la prueba de Tukey para determinar los efectos de las variables y las interacciones con un valor de $\alpha = 0,05$ utilizando Minitab 19. El análisis del primer objetivo se efectuó con el fin de determinar los aislamientos que presentaran los valores máximos de la DO y la tasa de crecimiento, a la vez que no presentaran diferencias significativas entre sí. Para el segundo y tercer objetivo, el análisis estadístico se empleó para determinar los aislamientos que presentaran mayor producción de AL, AA y el consumo glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y galactosa.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la cinética de crecimiento de los aislamientos de bacterias ácido lácticas

4.1.1 Tinción de Gram

Los resultados de las tinciones de Gram efectuadas para los 30 aislamientos se muestran en la tabla 9, se identificaron nueve especies, siendo *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* la especie mayoritaria y *Levilactobacillus brevis* y *Lactobacillus harbinensis*, las minoritarias.

Tabla 9. Morfología, tamaño y resultado Gram para 30 aislamientos de BAL analizadas.

Especie	Código	Morfología	Tamaño μm
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	2A2-B	Coco y cocobacilos	0,15
	II-C1-C		
	P2		
	P4		
	P6		
	P8	Coco	0,1
	IA2-P		
	11-C1-B		
	11-C2-C	Bacilos	0,38
	I-C2		
P9			
P10			
<i>Weissella soli</i>	P13	Coco y cocobacilos	0,15
	29		
	31		
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	30-2	Coco	0,1
	19-2	Coco y cocobacilos	0,18
	68-3		
	70-1		
	16	Coco	0,1
	17-2	Bacilos	0,25
	69		
71-6	Coco y cocobacilos	0,2	
<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>			
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>			
<i>Levilactobacillus brevis</i>			
<i>Lactobacillus harbinensis</i>			
<i>Leuconostoc falkenbergense</i>	66-2	Coco	0,1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	17-1		
	18		

Los ensayos de las tinciones de Gram revelaron que el 100% de los aislamientos estudiados son Gram positiva, lo que implica que tienen una pared celular gruesa compuesta por peptidoglicano y polímeros lo que permite la retención del cristal violeta añadido durante el proceso de tinción (103). Este procedimiento permite conocer algunas características de las bacterias en estudio, tal es el caso del tamaño y la morfología. La especie *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* se destacó, el 43% del total de aislamientos se identificó con esta especie. Además, los aislamientos presentaron una morfología variable entre estas. Los aislamientos cocoide (15%) y bacilar (38%) presentaron un tamaño promedio de 0,1 μm y 0,38 μm respectivamente. En el caso de la combinación cocos y cocobacilos (47%) el tamaño promedio es de 0,15 μm . Esta especie destaca por presentar una morfología de bastón, característica indicada en su nombre, pero con un tamaño superior cercano a 0,8 μm (104).

Del género *Lactiplantibacillus* la especie *L. pentosus* (78%) presentó cuatro aislamientos con morfología combinada entre cocos y cocobacilos con un tamaño promedio de 0,18 μm , dos aislamientos bacilares de 0,25 μm y sólo un aislamiento cocoide de 0,1 μm de tamaño. Las bacterias de esta especie se caracterizan principalmente por tener bastoncillos rectos de hasta 1,2 μm o bastones pequeños con bordes curvados conocidos como cocobacilos (105). Este resultado coincide con la morfología de los aislamientos estudiados en esta especie, a excepción de su tamaño. Las especie *L. argentoratensis* y *L. paraplantarum* (11%) cada una se describe principalmente como bacterias cocobacilares con un tamaño promedio de 0,7 μm (106,107). Sin embargo, los aislamientos estudiados en este trabajo mostraron un tamaño promedio de 0,2 μm .

La morfología de los aislamientos de *Weissella soli*, *Leuconostoc (pseudomesenteroides y falkenbergense)* se distinguió principalmente por ser bacterias pequeñas (0,1-0,2 μm) con forma cocoide y cocobacilar. Algunos autores indican que en ambos casos predomina la morfología de coco pero que puede haber presencia de cocobacilos debido a su forma lenticular (1,23,35). Sin embargo, indican un tamaño superior para bacterias del género *Leuconostoc* con valores cercanos a 0,9-1,2 μm (106). Finalmente, las especies *Levilactobacillus brevis* y *Lactobacillus harbinensis* se destacan por su forma cocoide o cocobacilar (108).

Las tinciones de Gram son análisis sencillos que brindan información útil. Si bien, son ampliamente utilizados para conocer el tamaño y morfología de las especies, este análisis permite identificar la existencia de otros microorganismos, siendo un indicativo en caso de que la muestra en estudio esté contaminada. En este estudio se identificaron aislamientos de otros microorganismos como *Staphylococcus epidermis* y *Enterobacter cloacae*. Sin embargo, estos no forman parte del alcance del presente estudio. Durante el análisis, las BAL son Gram positiva, sin embargo, el aislamiento con identificación de *E. cloacae* presentó una tinción negativa. Los 30 aislamientos estudiados presentaron morfología y tinción acorde a lo descrito en la teoría, sin embargo, los tamaños reportados en este experimento fueron inferiores. La figura 10 muestra la morfología coco, bacilos y cocobacilos con el fin de ilustrar las diferencias en la forma de las bacterias.



Figura 10. Morfología cocoide, bacilar y cocobacilar de BAL identificadas a partir de tinción de Gram.

El desarrollo de este primer análisis brinda una idea clara de las características de los microorganismos en estudio. Este análisis justifica la ejecución de las pruebas de cinética de crecimiento bacteriano, dado que permite agrupar los aislamientos en estudio según su tamaño, morfología y especie permitiendo comparar las curvas de crecimiento, $DO_{máx}$ y tasa de crecimiento.

4.1.2 Cinéticas de crecimiento de BAL en microplaca

Los datos de $DO_{máx}$ y tasa de crecimiento se obtuvieron a partir de los 30 aislamientos de BAL analizados mediante cinéticas de crecimiento, se muestran en la tabla A2 (anexo A). Las curvas de crecimiento fueron distribuidas según su especie con el fin de facilitar la comparación entre los aislamientos de la misma especie. La figura 11 muestra las curvas de crecimiento de los aislamientos de *L. paracasei subsp. tolerans*.

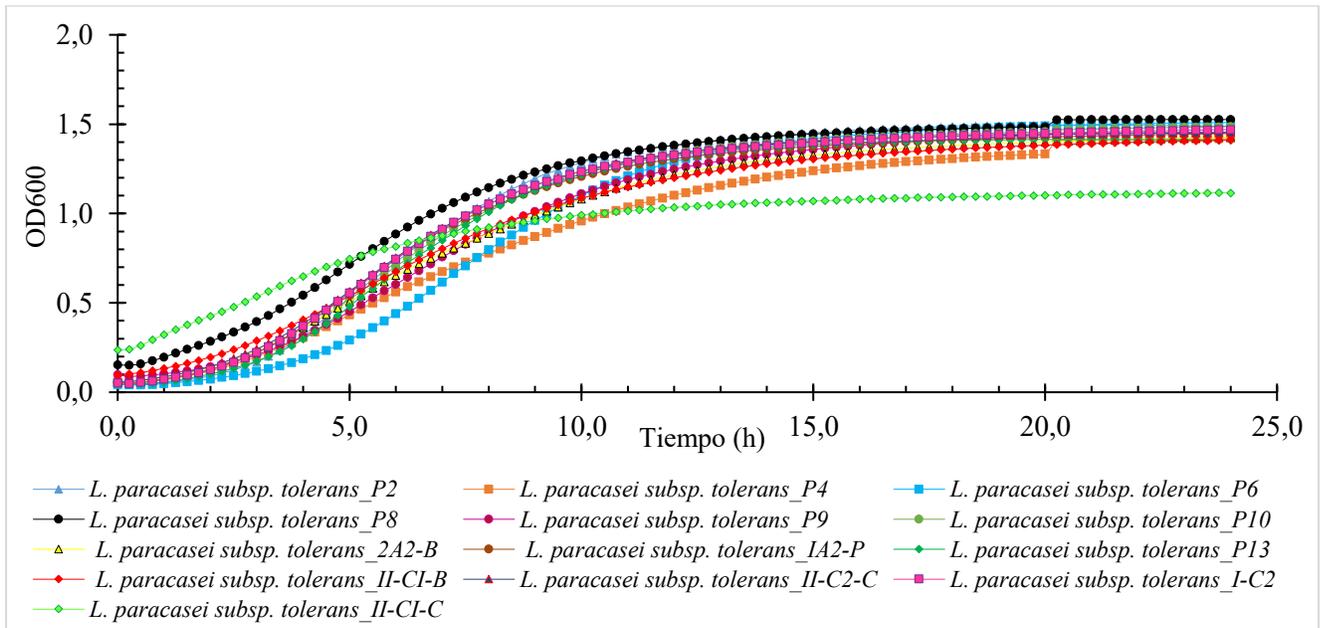
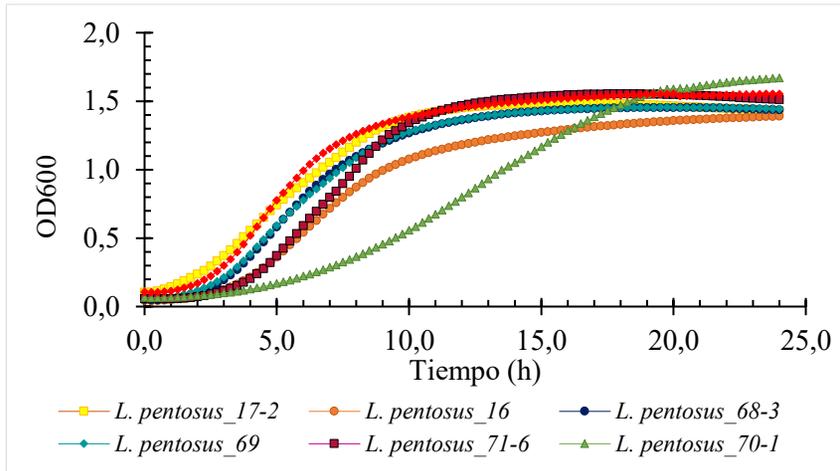


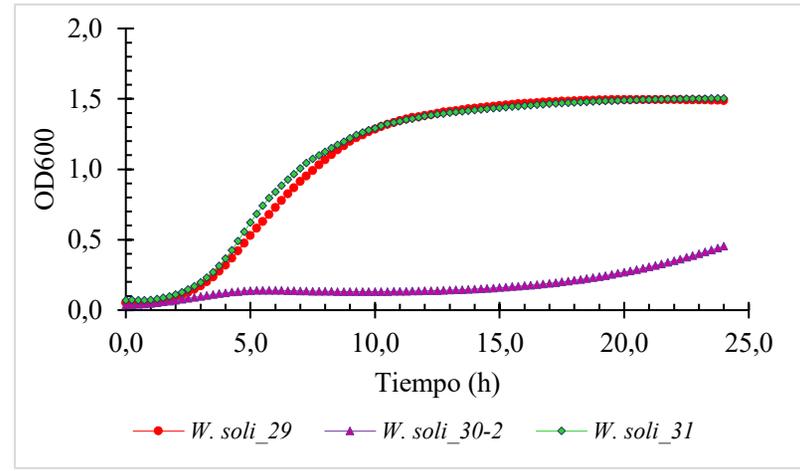
Figura 11. Curvas de crecimiento de 13 aislamientos de *Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans*.

La figura 11 muestra las curvas de crecimiento de la especie *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* que representa el 43% del total de los aislamientos, siendo los aislamientos P6 y P8 los de mayor DO, con valores de $1,510 \pm 0,014$ y $1,490 \pm 0,057$ respectivamente. Al contrario, el aislamiento II-CI-C presentó la menor DO ($1,116 \pm 0,666$), así como la menor tasa de crecimiento ($0,115 \pm 0,081$), generando una curva distinta a las demás. Estas diferencias de crecimiento se podrían deber a la diversidad de morfología, tamaño o bien a la fuente de extracción. Sin embargo, estos aislamientos mantienen una morfología cocoide y cocobacilar, un tamaño promedio de $0,15 \mu\text{m}$ y la fuente de extracción fue las aguas mieles de café para todas las cepas. Por ende, la variación podría deberse a la adaptación de cada aislamiento al ambiente, la competencia entre ellas, y a las diversas etapas del proceso de crecimiento.

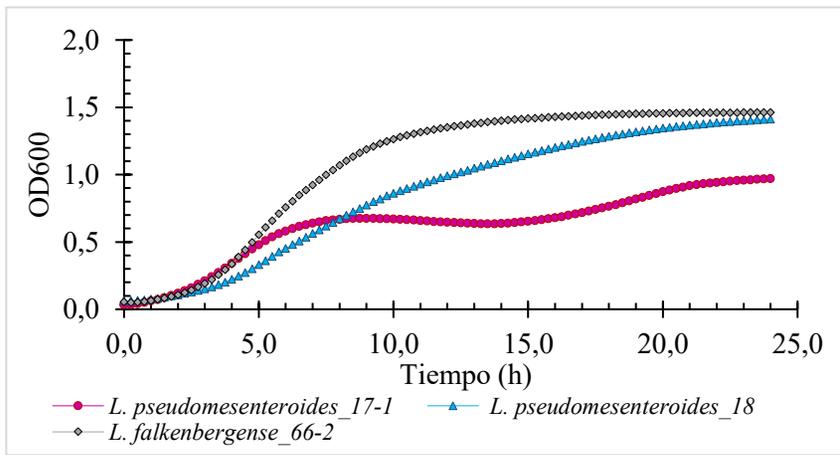
La figura 12 presenta las curvas de crecimiento de diversos aislamientos, (a) correspondiente a siete curvas de crecimiento de la especie *Lactiplantibacillus pentosus* que representa el 23% del total de los aislamientos, (b) presenta tres curvas de la especie *Weissella soli*. (c) presenta tres aislamientos de *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc falkenbergense* y (d) muestra cuatro especies combinadas (*Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus harbinensis*, *Leuconostoc falkenbergense*).



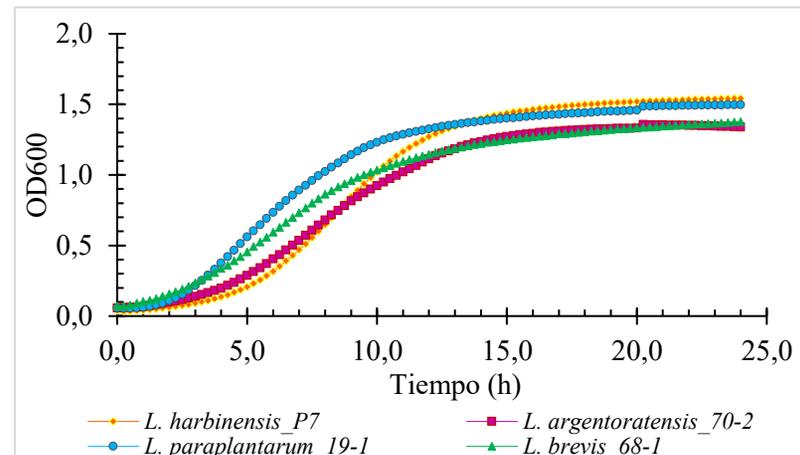
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 12. Curvas de crecimiento de aislamientos de (a) *L. pentosus*, (b) *W. soli*, (c) *L. pseudomesenteroides* y (d) cuatro aislamientos.

Las curvas de crecimiento de la especie *Lactiplantibacillus pentosus* representada en la figura 12.a muestra el comportamiento de siete aislamientos, siendo las especies 70-1, 19-2 y 71-6 quienes presentaron los OD con los valores más altos ($1,662 \pm 0,011$, $1,563 \pm 0,091$ y $1,554 \pm 0,051$), respectivamente. Al comparar la pendiente de las curvas, los aislamientos 70-1 y 19-2 mostraron la mayor pendiente, y por ende, la mayor DO. Sin embargo, el aislamiento 70-1 presentó en segundo lugar la menor tasa de crecimiento del total de los aislamientos con un valor de $0,139 \pm 0,013$, en consecuencia su curva de crecimiento se muestra por debajo en comparación con los otros aislamientos, además, necesitó mayor tiempo para alcanzar la fase estacionaria.

Los valores de $DO_{m\acute{a}x}$ de *W. soli* (aislamientos 31 y 29) representados en la figura 12.b fueron de $1,504 \pm 0,059$ y $1,500 \pm 0,045$ y la tasa de crecimiento ($0,256 \pm 0,021$ y $0,229 \pm 0,014$). El aislamiento 30-2 presentó la menor $DO_{m\acute{a}x}$ y tasa de crecimiento de los 30 aislamientos estudiados, ($0,401 \pm 0,226$ y $0,048 \pm 0,024$), respectivamente. Al analizar la curva de crecimiento, a partir de las 13,5 h aumenta su DO lo que podría indicar que su fase de adaptación es muy prolongada y requiere un tiempo de fermentación superior a las demás, pero tal comportamiento no pudo confirmarse dado que el experimento se desarrolló en un periodo de 24 h.

Los aislamientos *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc falkenbergense* (figura 12.c) destacan debido a las diferencias en su $DO_{m\acute{a}x}$. El aislamiento 66-2 presentó la mayor $DO_{m\acute{a}x}$ de esta categoría. En cuanto a la forma de las curvas, los aislamientos 66-2 y 18 alcanzaron la fase estacionaria al mismo tiempo. Sin embargo, el aislamiento 17-1 mostró variaciones en su crecimiento, por ejemplo, no alcanzó la fase estacionaria, que podrían deberse a la adaptación del aislamiento al medio de cultivo, temperatura y pH. En la figura 12.d se muestran cuatro aislamientos de distintas especies. A partir de las 2,5 h *Lactiplantibacillus paraplantarum*_19-1 inició su fase exponencial mostrándose como el de mayor crecimiento. Sin embargo, *Lactobacillus harbinensis*_P7 presentó la mayor pendiente, destacando como el aislamiento de mayor DO, pero al tener una tasa de crecimiento desfasada su crecimiento no se identificó desde el inicio y tardó más tiempo en alcanzar la fase estacionaria.

Para el total de aislamientos evaluados, en promedio la fase exponencial alcanzó su punto máximo a las 10 h de fermentación y la curva de crecimiento para todas las bacterias llegó hasta la fase estacionaria, sin mostrar la curva de descenso en la fase de muerte celular. Esta situación se debe a tres factores principales: el periodo de tiempo evaluado (24 h), el volumen de trabajo limitado (250 μ L) y el medio de cultivo utilizado (CMRS). Este último es un medio rico en nutrientes que permite el crecimiento adecuado de la mayoría de BAL durante su proceso de fermentación.

Investigaciones han reportado valores similares a los obtenidos en este trabajo (109,110). Vargas, (2021) cuantificó la producción de ácido láctico y bacteriocinas de trece aislamientos de BAL obtenidas de residuos agroindustriales. A partir de la cinética de crecimiento bacteriano (CMRS y 37°C), obtuvo valores de $DO_{m\acute{a}x}$ de $1,536 \pm 0,195$ y $1,629 \pm 0,229$ para dos aislamientos de *L. paracasei* (109). Nguyen y col., (2003) estudió el crecimiento de *L. paracasei* extraída de soya fermentada y obtuvo una $DO_{m\acute{a}x}$ de 2,0 (110). En ambos ejemplos los valores se muestran cercanos a los obtenidos en esta investigación, en el primer caso los aislamientos también fueron extraídos de residuos agroindustriales a nivel nacional, en el segundo caso los resultados superiores

podrían atribuirse al medio de obtención, o bien, la adaptación del aislamiento a las condiciones del proceso.

Dey et al., (2019) utilizó el aislamiento de *W. confusa* DD-A7 extraída de kimchi de diversos restaurantes en Corea del Sur con el fin de demostrar su potencial como antagonista de bacterias patógenas. Empleando CMRS obtuvo un valor de $DO_{m\acute{a}x}$ de 1,5 (111) en la cinética de crecimiento a 37°C. Ye et al., (2018) aisló *W. viridescens* de carne con el objetivo de evaluar la capacidad antimicrobiana de *W. viridescens* contra *Listeria monocytogenes*. La evaluación de la cinética de crecimiento usando dos concentraciones iniciales del inóculo obtuvo un $DO_{m\acute{a}x}$ de 1,3 cercano a las 24 h de fermentación (112). Ambas investigaciones, la especie utilizada es distinta, pero los valores obtenidos se mantuvieron cercanos al valor máximo de $1,504 \pm 0,059$.

Rivera de la Cruz et al., (2017) estudiaron aislamientos de BAL extraídas de quesos mexicanos con el fin de demostrar que la fermentación ácido láctica podría ser una alternativa a la pasteurización. Para ello emplearon tres aislamientos distintos, siendo una de estas *Leuconostoc spp* con un valor de $DO_{m\acute{a}x}$ de 1,14 a las 6,5 h de fermentación (113). Por su parte Andreevskaya et al., (2018) estudió la competencia de tres aislamientos de BAL en CMRS a 30°C. El aislamiento *L. gelidum* mostró el mayor crecimiento con un valor de $DO_{m\acute{a}x}$ de 2,0 (114).

Otras publicaciones emplearon aislamientos diferentes en condiciones de trabajo similares (CMRS y 37°C). Nguyen-Sy et al (2020) emplearon aislamientos de *L. plantarum* y *L. pentosus* extraídas de leche materna (1, 3 y 6 meses) para establecer un nuevo método de determinación de la fase lag, durante las cinéticas de crecimiento obtuvieron valores de $DO_{m\acute{a}x}$ de 1,348 y 0,984 respectivamente (115). Además, Dimov et al., (2014) analizaron trece aislamientos de BAL con el fin de simplificar un modelo matemático de crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas. Los aislamientos empleadas corresponden a *Lactobacillus delbrueckii*, extraídas de yogurt casero de leche de vaca, búfalo y oveja en Bulgaria. Durante las pruebas de cinéticas de crecimiento obtuvieron un valor de $DO_{m\acute{a}x}$ de 0,790 (116). Finalmente, Montero et al., (2020) utilizó *L. rhamnosus GG* para el diseño de una bebida probiótica a base de suero de leche y guayaba, al estudiar su crecimiento obtuvo un valor de $1,891 \pm 0,005$ (117). Investigaciones previas sobre el comportamiento, la $DO_{m\acute{a}x}$ y la tasa de crecimiento de las BAL se desarrollaron en condiciones similares a las expuestas en este trabajo, además obtuvieron resultados similares a los del presente estudio. En cuanto a la morfología, la zona geográfica, la fuente de extracción y la adaptación del microorganismo es importante mencionar que pueden interferir directamente en los resultados obtenidos.

La elección de los aislamientos que continuaron con el desarrollo del segundo objetivo se hizo en base al análisis estadístico (Tabla A2, anexo A). Los dieciocho aislamientos que no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en su $DO_{m\acute{a}x}$ fueron consideradas para la ejecución del proceso de producción de AL a escala de laboratorio. Este proceso corresponde a la segunda etapa del presente estudio. Sin embargo, debido a que sólo nueve aislamientos podían continuar por razones prácticas, se eligieron aquellas que también presentaron la mayor tasa de crecimiento, priorizando que no presentaran diferencias significativas entre sí. A excepción del aislamiento *Lactiplantibacillus pentosus* (código 70-1) que se incluyó en el análisis ya que tuvo la mayor $DO_{m\acute{a}x}$ de los 30 aislamientos estudiados. La tabla 10 muestra los aislamientos elegidos.

Tabla 10. Aislamientos de BAL elegidos para la fermentación en microbiorreactor

Código	Especie de la bacteria	DOMáx	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)
70-1	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	1,662±0,011 ^a	0,139±0,013 ^{ij,k,l}
19-2	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	1,563±0,091 ^{a,b,c}	0,267±0,016 ^{a,b}
31	<i>Weissella soli</i>	1,504±0,059 ^{a,b,c}	0,256±0,021 ^{a,b,c}
29	<i>Weissella soli</i>	1,500±0,045 ^{a,b,c}	0,229±0,014 ^{b,c,d,e,f}
17-2	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	1,492±0,039 ^{a,b,c}	0,224±0,013 ^{b,c,d,e,f}
66-2	<i>Leuconostoc falkenbergense</i>	1,477±0,058 ^{a,b,c}	0,225±0,049 ^{b,c,d,e,f}
P10	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	1,471±0,028 ^{a,b,c}	0,201±0,033 ^{c,d,e,f,g}
68-3	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	1,469±0,035 ^{a,b,c}	0,231±0,044 ^{b,c,d,e,f}
69	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	1,457±0,086 ^{a,b,c}	0,225±0,019 ^{b,c,d,e,f}

4.2 Cuantificación de la producción de ácido láctico y consumo de glucosa de las bacterias ácido lácticas a escala de laboratorio

4.2.1 Proceso de fermentación en un microbiorreactor

La tabla 11 muestra los valores obtenidos a partir del análisis estadístico y la figura 13 muestra la producción de cada aislamiento.

Tabla 11. Producción de AL, AA y consumo de glucosa para nueve aislamientos de BAL

Especie	A. Láctico (g/L)	A. Acético (g/L)	Glucosa (g /100 g)
<i>Weissella soli</i> _29	20,833±2,731 ^a	4,023±0,680 ^{a,b}	0,000±0,000 ^{c,d,e,f}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _70-1	20,100±2,754 ^{a,b}	4,367±0,626 ^a	0,000±0,000 ^{e,f}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _69	20,100±2,562 ^a	4,115±0,660 ^{a,b}	0,069±0,072 ^{b,c,d,e,f}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _17-2	19,867±2,757 ^a	3,965±0,553 ^{a,b}	0,000±0,000 ^f
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P10	19,850±2,829 ^a	3,868±0,492 ^{a,b}	0,183±0,193 ^b
<i>Weissella soli</i> _31	19,350±3,336 ^{a,b}	3,490±0,595 ^b	0,000±0,000 ^f
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _68-3	19,133±2,553 ^{a,b}	3,530±0,470 ^{a,b}	0,000±0,000 ^{d,e,f}
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> _66-2	18,633±2,666 ^{a,b}	3,888±0,698 ^{a,b}	0,000±0,000 ^f
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _19-2	18,550±2,533 ^{a,b}	3,858±0,586 ^{a,b}	0,062±0,065 ^{b,c,d,e,f}

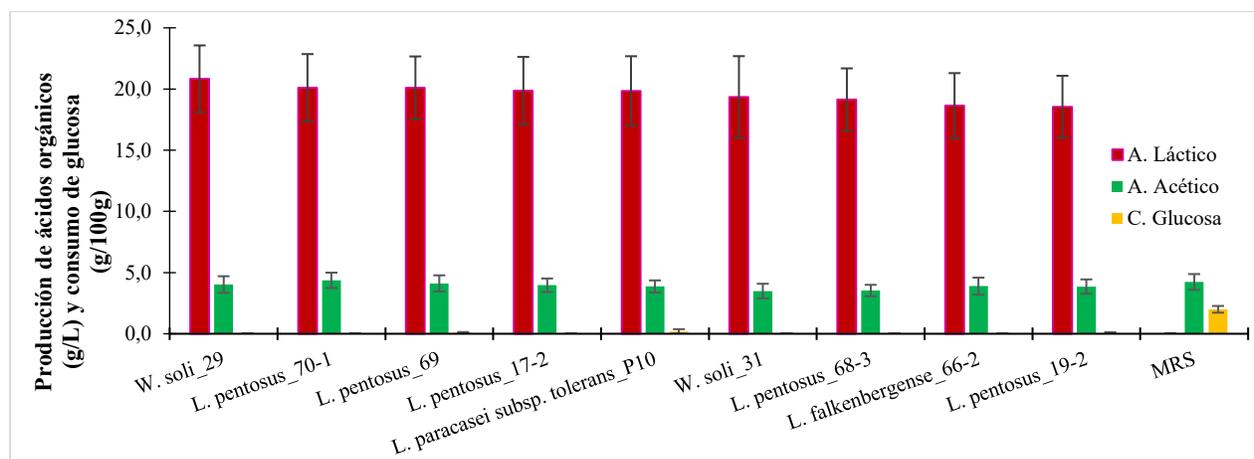


Figura 13. Producción de AL (g/L), AA (g/L) y consumo de glucosa (g/100 g) para nueve aislamientos de BAL.

A partir del análisis por HPLC se cuantificó la producción de metabolitos, siendo los aislamientos de *W. soli*_29, *L. pentosus*_70-1 y *L. pentosus*_69 los que presentaron la mayor producción de AL (20,833 ±2,731 g/L, 20,100 ±2,754 g/L y 20,100 ±2,562 g/L) respectivamente. Mientras que la producción de AA fue de 4,023 ±0,680 g/L, 4,367 ±0,626 g/L y 4,115 ±0,660 g/L. Al contrario, el aislamiento *L. pentosus*_19-2 presentó los valores más bajos de ambos subproductos en ambos casos. Sin embargo, los análisis estadísticos mostraron que no hay diferencias significativas entre las muestras evaluadas y los valores de AL y AA obtenidos. A pesar de analizar aislamientos de cuatro especies distintas (*L. pentosus*, *W. soli*, *L. paracasei* subsp. *tolerans* y *L. falckenbergense*), la producción de AL mantuvo valores cercanos entre sí. La mayor variabilidad corresponde a 2,283 g/L en la producción de AL, lo que se considera una variación aceptable. Esto se corrobora con el análisis estadístico donde no existieron diferencias significativas entre los aislamientos.

La producción de AA se mantuvo en un rango de 3,4 – 4,3 g/L, lo que se corrobora al no existir diferencias significativas entre ellas, a excepción de los aislamientos *L. pentosus* y *W. soli* (70-1 y 31 respectivamente). Esta última obtuvo la menor producción de AA. A nivel industrial, el uso de un aislamiento es viable si se obtiene una alta producción de AL y una baja producción de AA, dado que favorece el proceso de extracción del AL disminuyendo los procesos necesarios para la purificación. De los nueve aislamientos en estudio sólo tres presentaron presencia de glucosa (*L. pentosus*_69, *L. paracasei* subsp. *tolerans*_P10 y *L. pentosus*_19-2) posterior a la fermentación, siendo *L. paracasei* subsp. *tolerans*_P10 la de menor consumo. Un microorganismo capaz de generar metabolitos secundarios tales como el AL con un bajo consumo de azúcares como la glucosa resulta conveniente, dado que es capaz de adaptarse al medio de cultivo sin la necesidad de suplementos y por ende, implica un menor costo.

En la literatura, cuando se ha utilizado caldo MRS como medio de cultivo encontraron resultados similares a este trabajo(49,118–121). Por ejemplo, la aplicación de *L. plantarum* DSM 20174 reportó una producción máxima de 17,75 ± 1,38 g/L de AL (118). Empleando *L. brevis* dio como resultado una producción de 17,6 ± 0,1 g/L (49). Los resultados obtenidos con el uso de *L. casei* CCDM 198 reportaron 19,50 g/L de AL, con un rendimiento de 97,5% y 2,43 g/L/h de productividad (119). Otras investigaciones reportaron valores inferiores de la producción de AL. Una fermentación realizada durante 78 h con CMRS utilizado como medio obtuvo una producción máxima de 6,08 y 6,16 g/L para los aislamientos *L. plantarum* y *L. casei*, respectivamente (120). Finalmente, el uso de *Leuconostoc mesenteroides* E131 reportó valores de ~12 g/L (121).

4.2.2 Prueba de fermentación de carbohidratos API 50 CH

La figura 14 muestra los resultados obtenidos para cuatro aislamientos (*L. pentosus*_17-2, *W. soli*_29, *L. pentosus*_19-2 y *L. paracasei* subsp. *tolerans*_P10 en orden de mayor a menor fermentación, el resto de las fotografías se muestran en el anexo B (Figura B7-B11). La figura 15 muestra los resultados obtenidos de esta prueba para el total de los aislamientos en estudio. Siendo la primera columna el nombre de las especies estudiadas, la segunda indica el color correspondiente al control negativo. Y las columnas posteriores hacen referencia a las 49 azúcares estudiadas clasificadas según monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, polioles y sales, así como el porcentaje de azúcares empleadas por cada uno de los aislamientos.



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura 14. Coloración obtenida de pruebas API 50 CHL para aislamientos acomodadas de mayor a menos consumo, (a) *L. pentosus*_17-2, (b) *W. soli*_29, (c) *L. pentosus*_19-2 y (d) *L. paracasei* subsp. *tolerans*_P10.

Las pruebas API 50 CH funcionan a base de un indicador de pH. El cambio de color ocurre debido a la acidificación del medio causado por la fermentación del sustrato. Conforme la BAL crece y se alimenta produce metabolitos como los ácidos orgánicos (AL, AA, etc), el cual acidifica el medio de crecimiento, que al reaccionar con los azúcares presentes en los microtubos provoca un viraje de color. Un resultado negativo indica que no hay consumo del azúcar. Este comportamiento se observó en los aislamientos *L. pentosus_70-1* y *L. paracasei* subsp. *tolerans_P10*. Para identificar un resultado como positivo o negativo se compara el color obtenido en los microtubos con respecto al control negativo.

Durante el proceso de inoculación el medio empleado presentó una coloración púrpura (Figura B12, anexo B). Sin embargo, conforme transcurrieron las 48 h de fermentación, la coloración varió indicando si el aislamiento utilizó los azúcares como sustrato para su fermentación. A partir de los colores obtenidos, se identificó si el resultado fue positivo o negativo. La figura 14 muestra los resultados obtenidos para cuatro aislamientos, organizados de mayor a menor porcentaje de utilización de azúcares. De izquierda a derecha y de arriba abajo se obtuvieron porcentajes de fermentación de 65%, 59%, 22% y 2%.

Estas pruebas permiten conocer el comportamiento de los microorganismos. Sin embargo, presentan algunas limitaciones. La identificación de un resultado positivo o negativo se basa en un color, generando que los resultados se reporten a partir de un criterio subjetivo de la persona que las aplica. Lo cual podría influir en la identificación de los microorganismos, así como en la atribución de las características como la adaptabilidad a medios alternativos. Por este motivo, con el fin de facilitar la visualización y comprensión de la prueba, la figura 15 muestra dos coloraciones, azul para un resultado negativo y amarillo para un resultado positivo.

Las nueve BAL seleccionadas fermentaron diversos azúcares. *L. pentosus_17-2*, *W. soli_29* y *W. soli_31* fermentaron la mayor cantidad de azúcares del panel evaluado. El aislamiento *W. soli_31* logró transformar azúcares monosacáridos, tales como la L-arabinosa, D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, entre otros. Además, redujo azúcares disacáridos, como la D-maltosa, la D-lactosa, D-sacarosa, esculina y arbutina, polisacáridos como la D-rafinosa y la inulina y polioles como D-manitol y D-sorbitol. Adicionalmente, fue el único aislamiento que fermentó una sal “gluconato potásico”. Al contrario, *L. pentosus_70-1* y *L. paracasei* subsp. *tolerans_P10* sólo fermentaron un azúcar de la totalidad del panel, D-turanosa y D-manitol, respectivamente.

Del total de azúcares presentes en los microtubos, ninguno fue metabolizado completamente (100%) por los nueve aislamientos. Un total de once azúcares (22,45%) obtuvieron el mayor porcentaje de fermentación (78%) dividido entre los monosacáridos (D-galactosa y D-glucosa), disacáridos (D-celobiosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-turanosa, arbutina y esculina), y polioles (D-manitol y D-sorbitol). Un total de catorce azúcares que representan el 28,57% no fueron fermentados por ninguno de los nueve aislamientos, entre estos el glicógeno, L-xilosa, D-tagatosa, D-fucosa, entre otros. Este fenómeno podría no ser el mismo para otros microorganismos, sin embargo, la forma de metabolizar los sustratos de las BAL puede variar de un aislamiento a otro. Las condiciones de adaptación, la temperatura y el proceso de fermentación podrían interferir directamente en los resultados obtenidos. Los resultados del consumo de azúcares se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Clasificación de azúcares metabolizadas por los nueve aislamientos de BAL y su porcentaje de consumo.

Clasificación	Nombre	Consumo %
Monosacárido	D-galactosa y D-glucosa	78
	D-ribosa, D-fructosa, D-manosa y N-acetilglucosamina	67
	L-arabinosa, Metil- α D-xilopiranosida y Metil- α D-glucopiranosida	56
	L-sorbosa y L-rhamnosa	33
	D-arabinosa y D-xilosa	11
	D-lixosa, L-xilosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa y Metil- β D-xilopiranosida	0
	Disacárido	D-celobiosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-turanosa, arbutina y esculina
D-lactosa, D-melibiosa, salicina y amigdalina		67
Gentibiosa		44
Polisacáridos	D-melezitosa	67
	Inulina y D-rafinosa	56
	Almidón	11
	Glicógeno	0
Polioles	D-manitol y D-sorbitol	78
	Dulcitol, inositol y D-arabitol	11
	Glicerol, eritritol, D-adonitol, xilitol y L-arabitol	0
Sales	Gluconato potásico	11
	2-Cetogluconato potásico y 5-Cetogluconato potásico	0

Los resultados de esta prueba en conjunto con los valores de $DO_{m\acute{a}x}$ obtenidos en las cinéticas de crecimiento fueron la base para la elección del aislamiento más promisorio que se aplicó en el proceso de fermentación en un biorreactor. El uso de un aislamiento fácilmente adaptable es importante, especialmente en medios de crecimiento alternativos a base de residuos agroindustriales como el suero de leche. Los datos de $DO_{m\acute{a}x}$ indican que *L. pentosus* (70-1 y 19-2) y *W. soli*_31 fueron las bacterias con mayor crecimiento. Sin embargo, las pruebas API indican que *W. soli* es la más adecuada ya que fermentó diferentes azúcares. Por lo tanto, el aislamiento seleccionado para la fermentación en un biorreactor es *W. soli*_31.

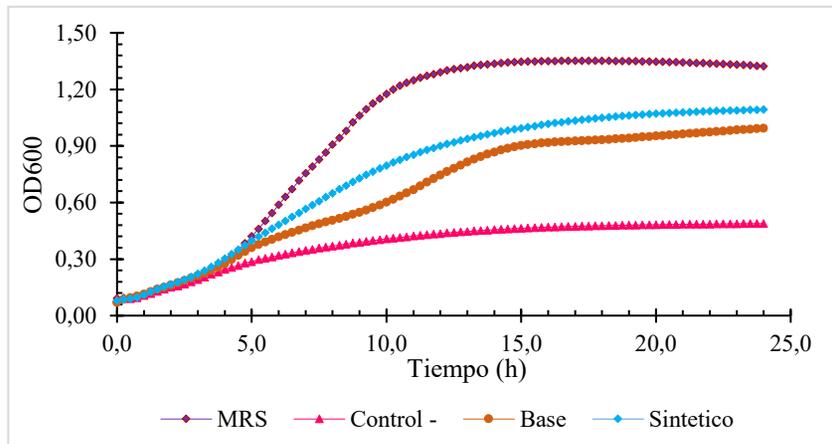
4.3 Proceso de producción de AL y AA con el aislamiento *Weissella soli* en un biorreactor a escala de planta piloto.

4.3.1 Tratamiento con suplementos a base de sales, fuentes de carbono y nitrógeno.

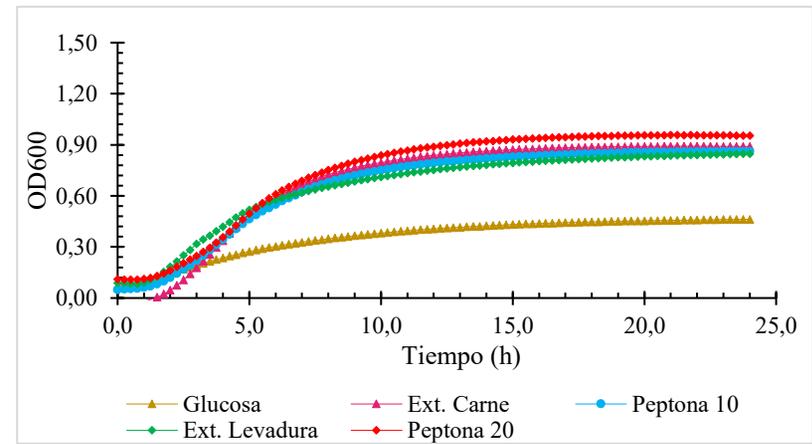
Los valores de la DOM_{\max} y la tasa de crecimiento obtenidas para *W. soli*_31 expuesta a dieciocho tratamientos se muestra en la tabla 13. Las curvas de crecimiento del aislamiento, los controles, el medio sintético y el medio base se muestran en la figura 16.a. Las curvas de crecimiento para fuentes de nitrógeno y carbono se muestran en la figura 16.b y la figura 16.c presenta las curvas de crecimiento para el aislamiento suplementado con sales.

Tabla 13. DOM_{\max} y tasa de crecimiento obtenidos al evaluar 18 tratamientos aplicados a *W. soli* en placa de 96 micropocillos.

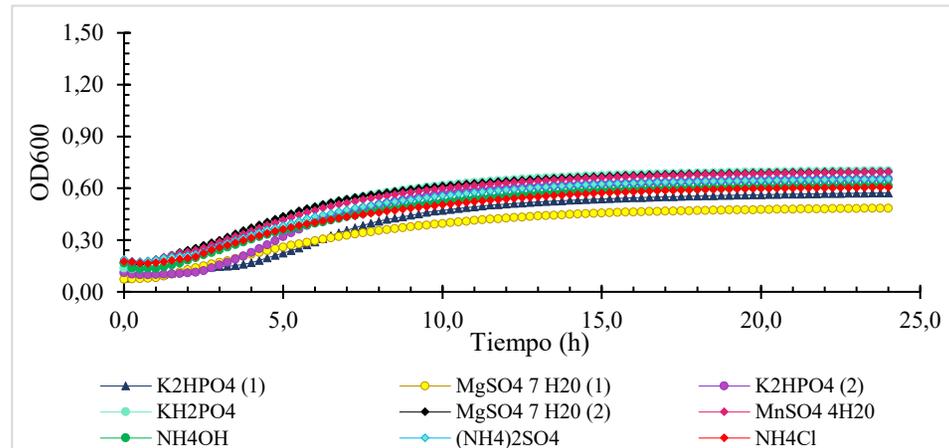
Reactivo	DOM_{\max}	Tasa crecimiento (h^{-1})
MRS	1,354±0,020	0,183±0,010
Medio Sintético	1,093±0,025	0,097±0,003
Medio Base	0,994±0,063	0,083±0,005
Peptona 20	0,957±0,028	0,140±0,013
Ext. Carne	0,892±0,053	0,159±0,010
Peptona 10	0,860±0,063	0,122±0,007
Ext. Levadura	0,847±0,020	0,135±0,008
KH_2PO_4	0,702±0,018	0,073±0,008
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (2)	0,697±0,031	0,072±0,017
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,695±0,036	0,069±0,015
K_2HPO_4 (2)	0,654±0,039	0,100±0,012
$(NH_4)_2SO_4$	0,653±0,009	0,063±0,007
NH_4OH	0,615±0,027	0,062±0,005
NH_4Cl	0,606±0,027	0,063±0,008
Control -	0,596±0,121	0,063±0,011
K_2HPO_4 (1)	0,573±0,024	0,067±0,002
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (1)	0,484±0,049	0,047±0,007
Glucosa	0,463±0,043	0,049±0,005



(a)



(b)



(c)

Figura 16. Curva de crecimiento de *W. soli_31* expuesto a diversos tratamientos, (a) controles, medio base y sintético. (b) suplemento a base de fuentes de nitrógeno y carbono, (c) suplemento de sales.

Tal como se muestra en la tabla 13 y la figura 16.a el control positivo (caldo MRS), presentó la mayor $DO_{m\acute{a}x}$ y tasa de crecimiento ($1,354$ y $0,183\text{ h}^{-1}$), lo cual concuerda con la teoría, dado que es un medio rico en nutrientes y específico para BAL. La curva de crecimiento presentó la mayor pendiente atribuyéndole ser el medio que propició los mejores nutrientes para el crecimiento de *W. soli*, en consecuencia, la fase estacionaria se alcanzó en menor tiempo. El medio sintético fue el segundo medio que obtuvo los mayores valores de $DO_{m\acute{a}x}$ ($1,093$), $\sim 0,261$ por debajo de la $DO_{m\acute{a}x}$ del CMRS por esta razón se eligió como medio alternativo. El medio base tiene una composición similar al CMRS, sin embargo, el aislamiento presentó mayor crecimiento con fuentes de nitrógeno y azúcar que con este medio.

Las curvas de crecimiento de fuentes de nitrógeno (figura 16.b) indican que el aislamiento presentó mayor crecimiento con la peptona al 20%. Sin embargo, su valor está $\sim 0,065$ por encima de los demás suplementos, colocando las cuatro fuentes de nitrógeno como candidatas para su uso como suplemento. La fuente de carbono a base de glucosa presentó la menor $DO_{m\acute{a}x}$ del total de tratamientos con un valor de $0,463$.

Las sales empleadas (figura 16.c) presentaron valores de $DO_{m\acute{a}x}$ por debajo del promedio de los otros suplementos. Las sales a base de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y K_2HPO_4 se evaluaron en dos concentraciones distintas, la mayor concentración propició un mayor crecimiento de la bacteria. El KH_2PO_4 fue la sal con mayor $DO_{m\acute{a}x}$ con un valor de $0,702$, seguido de las sales a base de sulfatos con valores de $DO_{m\acute{a}x}$ de $\sim 0,695$.

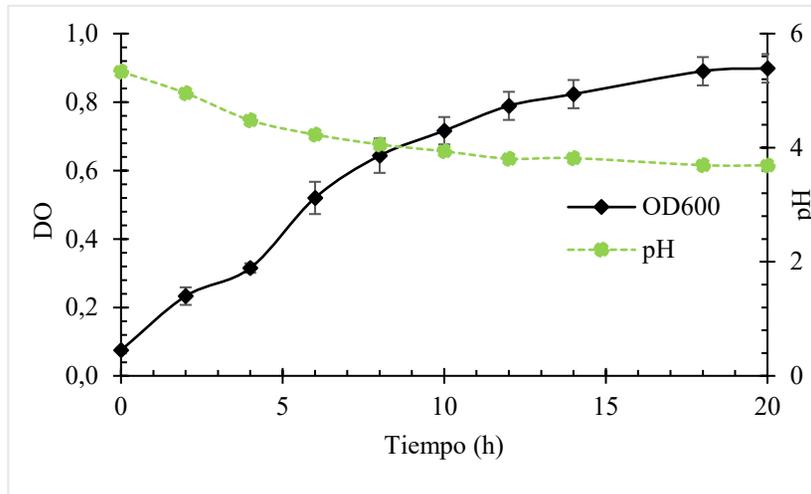
La evaluación de los suplementos en suero de leche consistió en determinar la concentración más adecuada en comparación con las previamente reportadas ($68,122,123$). Chan-Blanco, Y. et al (2003) evaluó banano de desecho para producir AL mediante *L. casei* empleando dos medios, uno con puré de banano y otro enriquecido con sales (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) (68). Alexandri, M. et al. (2019) describieron los principales avances en la producción de AL a partir de residuos agroindustriales incluyendo el suero de leche con K_2HPO_4 , $MgSO_4$ y $MnSO_4$ para apoyar el crecimiento de *L. coryniformis* subsp. *torquens* (122). Olszewska-Widdrat, A. et al. (2020) estudiaron la fermentación por lotes y continua con sustratos múltiples, entre estos el suero de leche con extracto de levadura para el crecimiento de *Bacillus coagulans*- A534 (123).

La elección del segundo medio por emplear se basó en los valores de $DO_{m\acute{a}x}$ y los suplementos reportados en publicaciones previas. En base a estos criterios se seleccionaron como medio el suero de leche suplementado con extracto de levadura y las sales (K_2HPO_4 y KH_2PO_4).

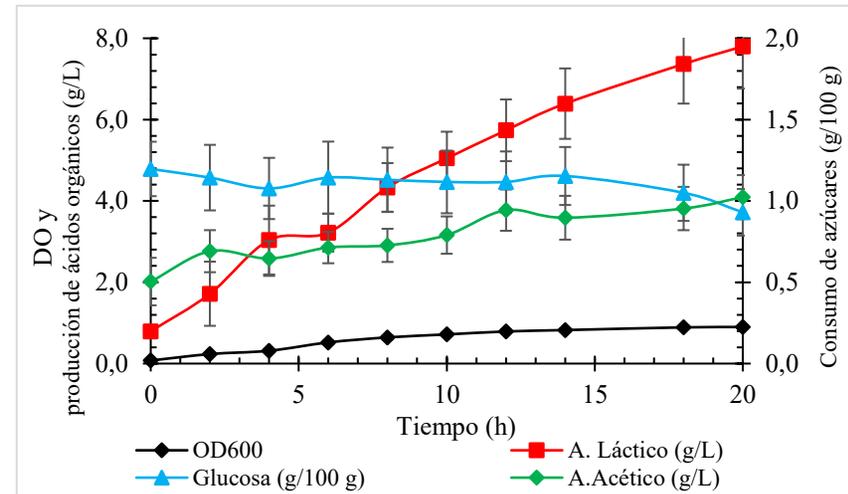
4.3.2 Proceso de fermentación en matraz

4.3.2.1 Proceso de fermentación en un medio sintético

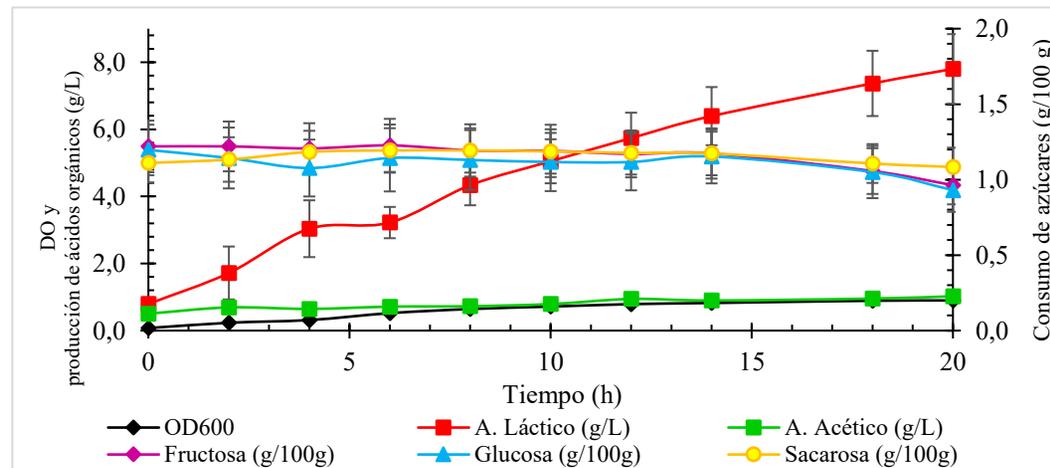
Los valores de DO, pH, producción de metabolitos y consumo de azúcares utilizando medio sintético y fermentado en un matraz se muestran en la tabla A3 (anexo A) y las curvas de crecimiento en la figura 17.a, b y c.



(a)



(b)



(c)

Figura 17. Curvas de crecimiento de *W. soli_31* en matraz y medio sintético (a) DO versus pH, (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, fructosa y sacarosa

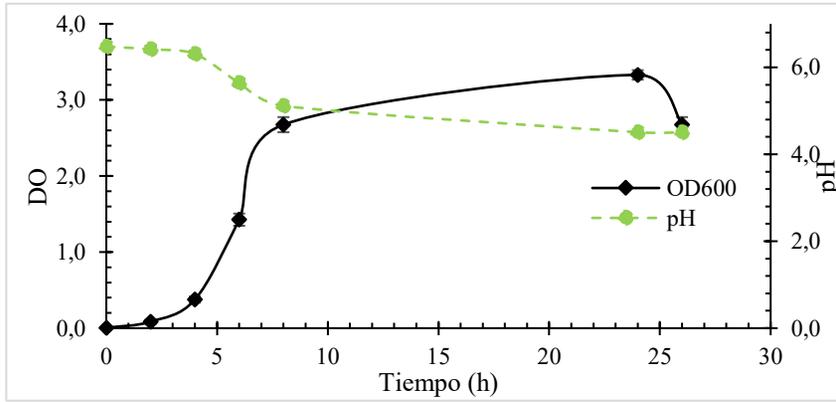
El proceso de fermentación en matraz con medio sintético se desarrolló durante 20 h, alcanzando un valor de DOM_{\max} de $0,898 \pm 0,042$. Como se muestra en la figura 17.a el crecimiento de la bacteria propició la acidificación del medio. La curva de crecimiento presentó un aumento de las 4 a 6 h de fermentación, que puede relacionarse a la fase de adaptación del microorganismo al medio sintético. Durante la fermentación y como parte esencial de su metabolismo, la bacteria consume azúcares que propician su crecimiento, generando a su vez ácidos orgánicos responsables de variar los niveles de pH en el medio. El AL y AA (figura 17.b) alcanzó valores de $7,800 \pm 1,037$ g/L y $1,023 \pm 0,136$ g/L, respectivamente. Estos resultados muestran una baja producción de AA, lo que es atractivo para la industria, dado que implica un menor trabajo y costo para procesos posteriores de purificación del AL.

El consumo de azúcares mostró poca variación, la disminución que se observa en la figura 17.c es irrelevante al inicio de la fermentación. Sin embargo, a partir de las 6 h de fermentación en las curvas de consumo de azúcares se mostró un descenso y una pendiente más pronunciada, al mismo tiempo que la bacteria inicia su fase de crecimiento exponencial y presenta un aumento en la producción de AL. Este comportamiento concuerda con el crecimiento bacteriano, pasada la fase de adaptación al medio de cultivo, la bacteria consume los azúcares presentes e incrementa exponencialmente su crecimiento, a su vez genera ácidos orgánicos como producto secundario.

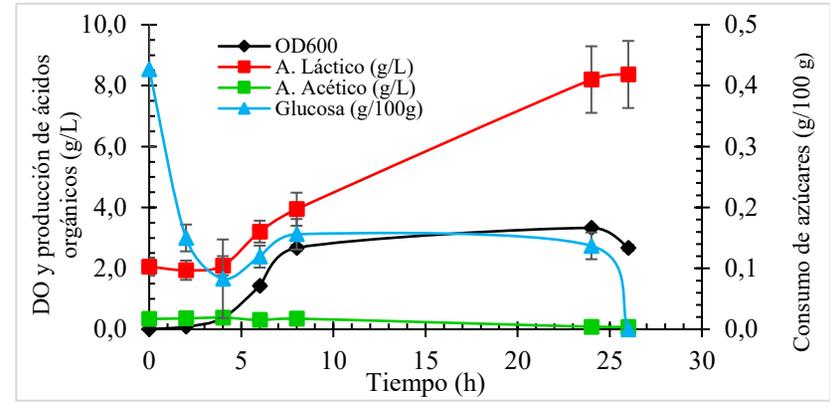
El consumo de la fructosa, glucosa y sacarosa de *W. soli* inició con una concentración similar de 1,220, 1,197 y 1,110 g/100 g, respectivamente. El consumo de fructosa y glucosa fue mayor. Este se cuantificó con un descenso de 0,257 y 0,267 g/100 g, respectivamente. Por el contrario, la sacarosa se mantuvo constante durante las 20 h del proceso, la disminución reportada es de 0,027 g/100 g lo que indica que es una azúcar poco consumida en el medio sintético. La bacteria aumentó el consumo de azúcares a partir de las 14 h, presentando el mayor cambio a las 18 h. Sin embargo, no presentó un aumento significativo en el crecimiento. La OD600 aumentó en 0,008 en las siguientes 2 h de la fermentación lo que indica que la bacteria se encontraba en la fase estacionaria.

4.3.2.2 Proceso de fermentación en suero de leche con suplemento

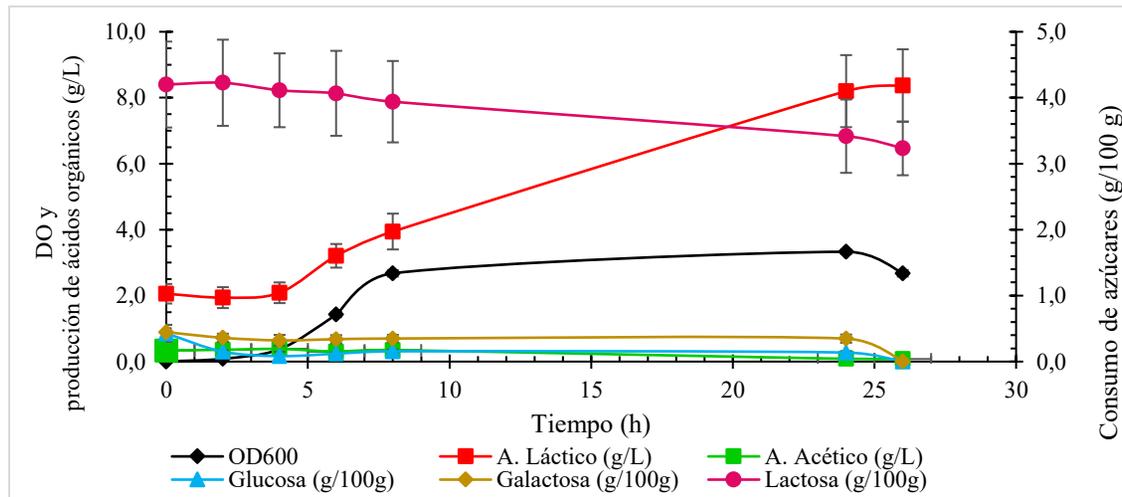
Los valores de OD600, pH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares utilizando suero de leche con suplemento y fermentado en un matraz se muestran en la tabla A4 (anexo A). La figura 18.a muestra la variación del pH y el crecimiento de la bacteria versus tiempo. La figura 18.b muestra la producción de ácidos orgánicos (g/L) y consumo de glucosa (g/100 g) versus tiempo y la figura 18.c ilustra el consumo de glucosa, galactosa, lactosa (g/100 g) y producción de AL y AA (g/L) versus tiempo.



(a)



(b)



(c)

Figura 18. Curvas de crecimiento de *W.soli_31* en matraz y suero de leche suplementado (a) DO versus pH, (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, lactosa y galactosa.

La fermentación en matraces empleando suero de leche como medio de cultivo suplementado con extracto de levadura, K_2HPO_4 y KH_2PO_4 presentó un valor de $DO_{m\acute{a}x}$ de 3,329. En la figura 18.a se muestra una disminución del pH durante las 24 h de fermentación, lo que demuestra la constante acidificación del medio durante todo el proceso de fermentación, que coincide con el crecimiento de la bacteria y producción de ácidos orgánicos. A partir de las 4 h de fermentación la bacteria superó la etapa de adaptación al medio e incrementó su DO en 0,370 y producción de AL en 2,087 g/L.

La fermentación en matraz con un medio de cultivo de suero de leche suplementado proporcionó mejores condiciones de crecimiento en comparación al medio sintético, alcanzando un $DO_{m\acute{a}x}$ por encima de $\sim 2,431$. Comportamiento que podría atribuirse a la presencia de otros componentes en el suero de leche que lo hace un medio rico para el crecimiento de *W. soli*. La concentración inicial de AL (figura 18.b) presentó un valor superior a 2,057 g/L seguido de una disminución de $\sim 0,117$ g/L. Esto podría deberse a la adaptación de *W. soli* al medio. Luego, el AL alcanzó un valor de 8,367 g/L al final de las 26 h de la fermentación. La concentración de AA se mantuvo $\sim 0,300$ g/L durante las primeras 8 h de fermentación, posteriormente disminuyó. Este resultado indica que la bacteria genera una concentración baja de AA, o bien, su metabolismo tarda más de 26 h en aumentar su producción. Al contrario, el proceso de fermentación en matraz con un medio de cultivo sintético reportó un valor de AL superior en $\sim 0,567$ g/L y el AA presentó valores inferiores.

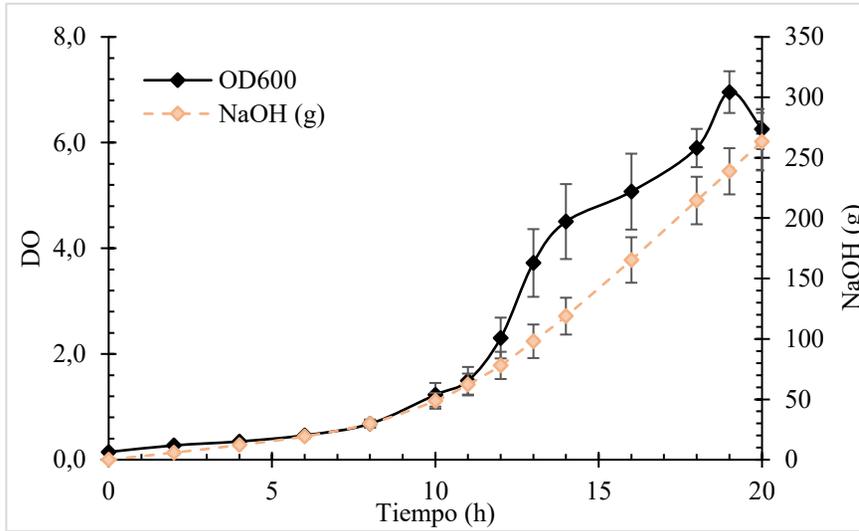
Al considerar el consumo de azúcares (figura 18.c), la concentración inicial de lactosa fue de 4,200 g/100 g y su concentración al final de la fermentación fue de 3,233. El consumo de esta azúcar fue de 0,967 g/100 g. El suero de leche es un medio rico en lactosa (tabla 4), sin embargo, la glucosa y la galactosa, conocidas como azúcares más simples provenientes de la lactosa se consumieron por completo. Este fenómeno se debe a la facilidad de las BAL en metabolizar la glucosa y la galactosa para producir AL, dado que son azúcares más simples (28,124). El microorganismo mostró un comportamiento acorde a la teoría, dado que posterior a las 24 h de fermentación, la glucosa y la galactosa fueron consumidas en su totalidad y la DO disminuyó significativamente ($\sim 0,653$).

El pH para ambas fermentaciones se mantuvo similar, un incremento en la acidez del medio indica la presencia de ácidos orgánicos y por ende el correcto crecimiento de la bacteria. Utilizar suero de leche suplementado permitió un mayor crecimiento de la bacteria, el medio sintético fue el que generó una mayor acidificación que podría deberse a la mayor producción de AA. El consumo de azúcares fue superior para el suero de leche con suplementos, sin embargo, esta variable no es comparable debido a las diferencias en la composición de los medios y los azúcares presentes.

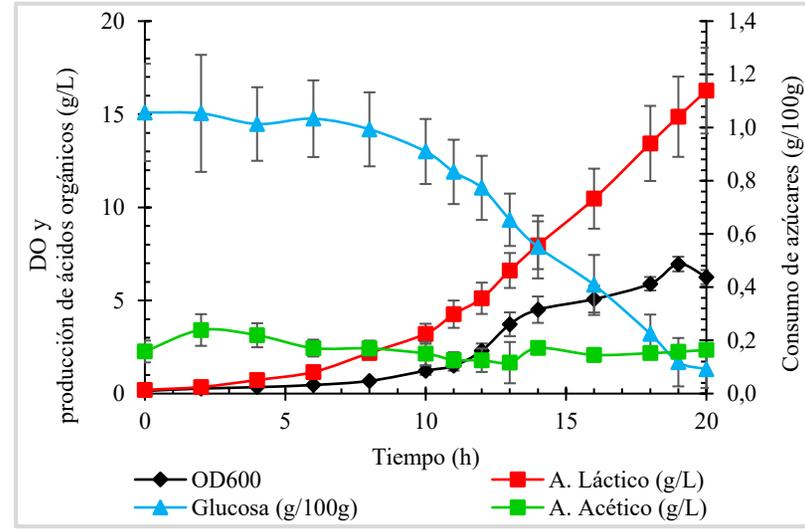
4.3.3 Proceso de fermentación en un biorreactor a escala de planta piloto

4.3.3.1 Proceso de fermentación en un medio sintético

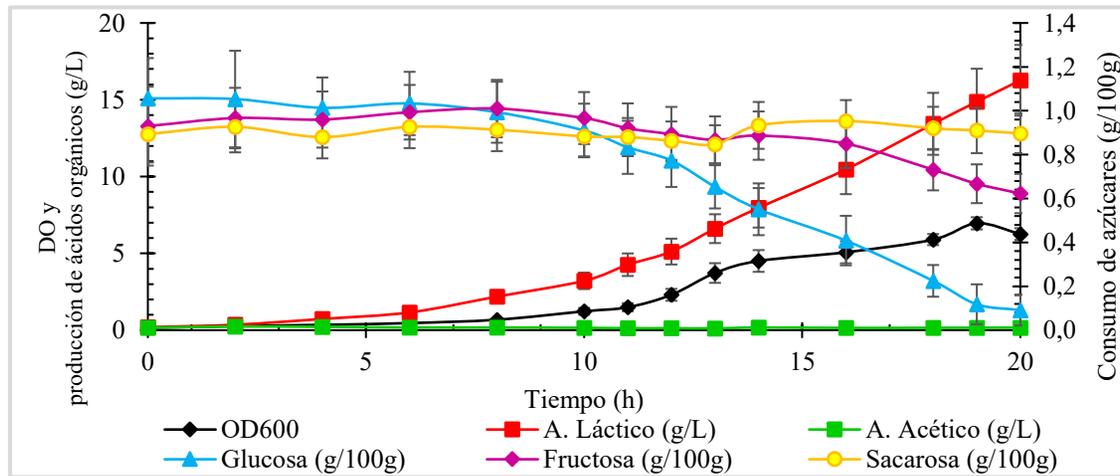
Los datos de DO, el pH, producción de metabolitos como ácidos orgánicos me (g/L), consumo de NaOH (g) y azúcares (g/100 g) utilizados se muestran en la tabla A5 (anexo A). La figura 19.a muestra el consumo de NaOH (g) en relación con el crecimiento de *W. soli* versus tiempo. La figura 19.b muestra la producción de ácidos orgánicos (g/L) y consumo de glucosa (g/100 g) y la figura 19.c presenta el consumo de glucosa, sacarosa, fructosa (g/100 g) y producción de AL y AA (g/L) para un proceso de fermentación de 20 h de duración.



(a)



(b)



(c)

Figura 19. Curvas de crecimiento de *W.soli_31* en biorreactor y medio sintético (a) DO y consumo de NaOH versus tiempo, (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, fructosa y sacarosa.

Los datos mostrados en las figuras 19.a, muestran el crecimiento de *W. soli* y el consumo de NaOH para mantener el pH óptimo en el medio de cultivo. El microorganismo inició su fase de crecimiento exponencial a las 8 h de la fermentación, incrementando la producción de ácidos orgánicos y generando mayor acidificación del medio de cultivo. Provocando un consumo elevado NaOH para estabilizar el pH del medio en 6,8. Comportamiento que se respalda con los valores indicados en la tabla A5 (anexo A), donde *W. soli* pasó de consumir 19,280 g de NaOH a las 6 h, 29,930 g a las 8 h y posteriormente 48,720 g a las 10 h de fermentación. Este incremento se considera acelerado.

La acidificación del medio coincide con la producción de AL (figura 19.a) que aumentó ~1 g/L/h durante la fermentación. La DO aumentó de 0,680 a 1,228 siendo ~50% mayor que la densidad inicial. Sin embargo, la DO_{máx} se cuantificó a las 19 h de iniciada la fermentación. Posteriormente, este valor es de 6,956, lo que indica un descenso. Este comportamiento concuerda con lo descrito por Micanquer-Carlosama et al., (2020) que indica que las bacterias del género *Weissella*, presentan mayor crecimiento durante el proceso de fermentación que no sobrepasa las 20 h (125). Sin embargo, el consumo de NaOH (g) se mantuvo exponencial hasta las 20 h de fermentación lo que implica que la acidificación del medio estuvo en aumento hasta el final del proceso.

La producción de metabolitos como los ácidos orgánicos (figura 19.b) obtuvo un valor máximo de AL y AA de 16,267 g/L y 0,164 g/L respectivamente. El AA incrementó 0,006 g/L durante las 20 h de fermentación lo que indica que en las condiciones empleadas (medio de cultivo, biorreactor, pH, temperatura, aireación, agitación, etc) no son favorables para la producción del AA. Por el contrario, el AL mostró un incremento exponencial durante toda la fermentación. Si bien, no existen estudios que hayan reportado la producción de AL empleando *W. soli*, es posible comparar la obtención de este ácido orgánico con otros estudios que han empleado medios alternativos.

Abdur et al., (2020) estudió la producción de AL de diversas BAL empleando residuos alimenticios como medio de cultivo, obteniendo valores de 17,03 g/L y 14,77 g/L para aislamientos de *L. plantarum* DSM 20174 y *L. lactis* subsp. *lactis* DSM 20481, respectivamente y valores de 7,10 g/L, 9,09 g/L y 7,63 g/L para aislamientos del género *W. cibaria*, *W. confusa* y *W. hellenica*, respectivamente (118). En otro estudio, Jawad et al., (2013) obtuvo 17,484 g/L a partir de residuos de la cáscara de mango (126). Además, Djukić et al., (2013) obtuvo 18,6 g/L usando *L. rhamnosus* ATCC 7469 y vinaza de destilería (127). Finalmente, Abdel et al., (2013) reportaron 18 g/L utilizando *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* ATCC 11842 y harina de trigo, o melaza como sustrato; 16 g/L para *L. rhamnosus* ATCC 10863 utilizando un medio suplementado con glucosa y fructosa (128).

Estas publicaciones obtuvieron valores cercanos a la concentración alcanzada en el presente estudio con valores superiores a 1-2 g/L, a excepción de los aislamientos del género *Weissella*, donde las diferencias reportadas pueden deberse al tipo de aislamiento empleado. Estos resultados indican que el empleo de medios alternativos es una opción viable y reproducible para la producción de metabolitos a un menor costo.

El consumo de azúcares (figura 19.c) presentó el comportamiento esperado para la glucosa y fructosa que son azúcares simples de fácil consumo, presentando una disminución de 0,966 g/100g para la glucosa y 0,307 g/100 g para la fructosa. Conforme la bacteria creció y aumentó la producción de AL se consumieron los azúcares; esto se comprueba en la tabla A5 (anexo A) y figura 30 que presentan los datos de consumo de glucosa a las 10 h debido a que se observa un descenso de ~0,100 g/100 g/h. La lactosa presentó un comportamiento variable, dado que inició con una concentración de 0,894 g/100 g y finalizó con una concentración de 0,897 g/100 g mostrando un aumento de 0,003 g/100 g al final de la fermentación. Durante las primeras 10 h la lactosa aumentó y disminuyó ~0,100 g/100 g, posteriormente se mantuvo constante con valores en un rango de 0,800 g/100 g, y a partir de las 14 h aumentó su concentración. Esta variación no corresponde con el comportamiento esperado. Estos resultados podrían atribuirse a la incertidumbre del experimento y a las diferencias entre los medios de cultivo.

4.3.3.2 Proceso de fermentación en suero de leche con suplemento

Los datos de DO, pH, la producción de ácidos orgánicos, el consumo de NaOH y azúcares utilizados se muestran en la tabla A6 (anexo A). La figura 20.a muestra el consumo de NaOH en relación con el crecimiento de *W. soli*. La figura 20.b muestra la producción de ácidos orgánicos y consumo de glucosa y la figura 20.c presenta el consumo de glucosa, lactosa, galactosa y producción de AL y AA para un proceso de fermentación de 20 h utilizando como medio alternativo el suero de leche suplementado con extracto de levadura, K_2HPO_4 y KH_2PO_4 . Estos resultados se presentan en las figuras en función del tiempo de duración del proceso de fermentación.

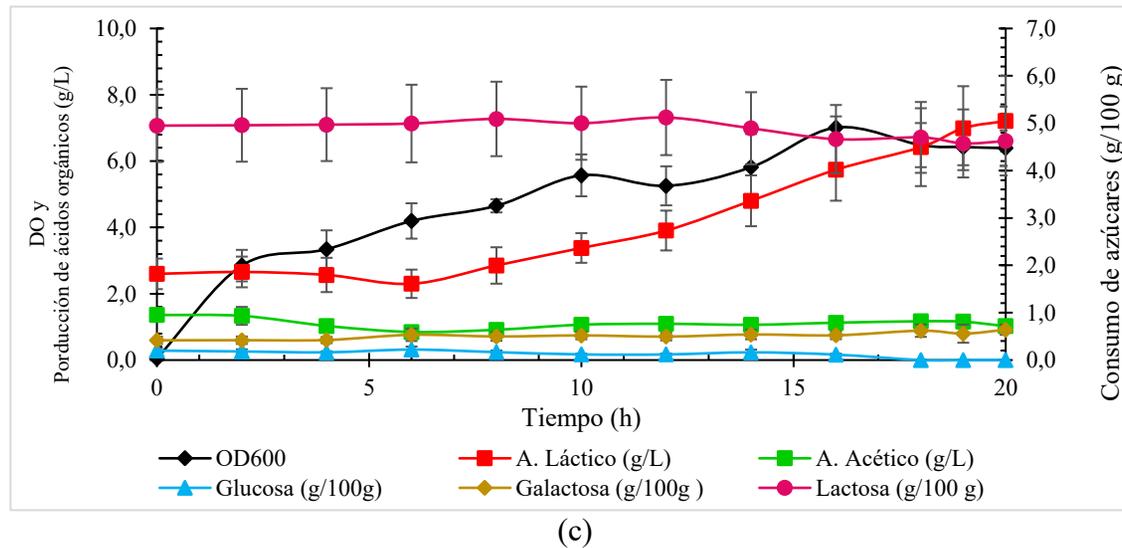
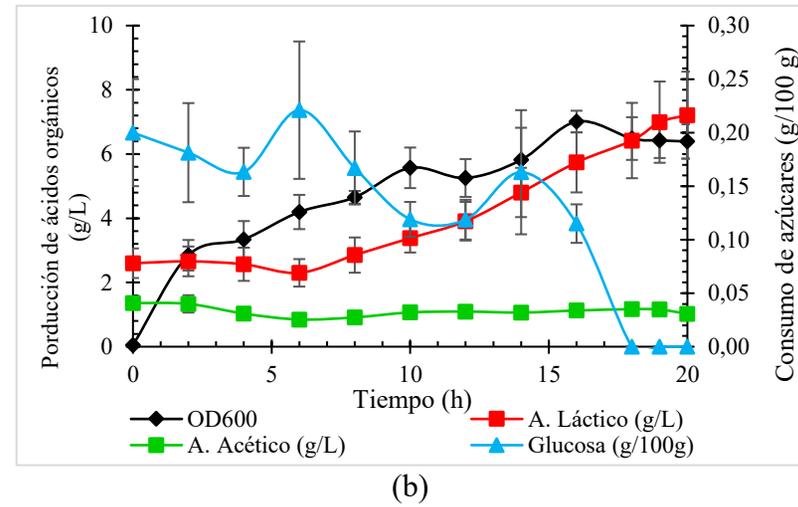
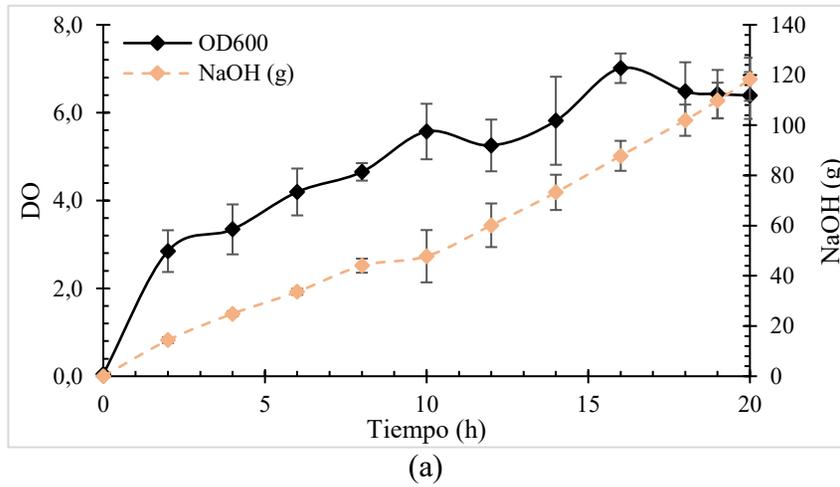


Figura 20. Curvas de crecimiento de *W. soli_31* en biorreactor y suero de leche suplementado (a) DO y consumo de NaOH versus tiempo (b) DO, AL y consumo de glucosa y (c) DO, AL, AA, consumo de glucosa, lactosa y galactosa.

Los datos correspondientes a la fermentación en un biorreactor empleando suero de leche con suplemento (figura 20.a) denotan como la bacteria mantuvo un crecimiento continuo hasta las 12 h del proceso, seguido de una disminución en la DO. Posteriormente, la DO_{máx} aumentó a las 16 h y reportó un valor de 7,012 seguido por un descenso. Este comportamiento con variaciones similares en el crecimiento durante la fermentación se ha obtenido para otras BAL a las mismas condiciones de trabajo que el presente estudio. Aldape et al., (2015) reportó un descenso en el crecimiento de *Lactobacillus paracasei* a las ~10 h de iniciada la fermentación. En este estudio, la siembra del inóculo se hizo con MRS y también empleó suero de leche como medio de cultivo (95). Además, Montero-Lagunes et al., (2009) emplearon *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* y *Bifidobacterium spp* y el crecimiento máximo se alcanzó a las ~15 h de fermentación (129), similar a lo ocurrido con *W. soli*.

El consumo de NaOH se mantuvo exponencial hasta las 20 h de fermentación. Este resultado implica que la acidificación del medio aumentó hasta el final del proceso. La producción de AA (figura 20.b) disminuyó 0,337 g/100 g mostrando un comportamiento similar a la fermentación en matraz que podría atribuirse al medio de cultivo. El AL inició su fase de producción exponencial a partir de las 6 h alcanzando un valor máximo de 7,210 g/L.

Diversas publicaciones han utilizado el suero de leche como medio de cultivo para la producción de AL. Entre estas, Abdel et al., (2011-2013) menciona una producción de 7,9 g/L con *Lb. delbrueckii sp. bulgaricus 5085*. El uso de *Lb. helveticus ATCC 15009*, *L. lactis WS 1042*, *L. lactis sp. Lactis 2432* y *Lb. acidophilus R* reportan valores de 8,9 g/L, 11 g/L, 8,3 g/L y 8,6 g/L, respectivamente (128,130). Plessas et al., (2008) indica que con *L. helveticus* y *L. bulgaricus* obtuvieron valores de 6,9 g/L y 6,4 g/L, respectivamente (131). Y Vodnar et al., (2008) reportó valores de 6,08 g/L y 6,16 g/L al emplear aislamientos de *L. plantarum* y *L. casei* (120), respectivamente. Estos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud que los que se obtuvieron en el presente estudio.

Durante la fermentación, la glucosa se consumió en su totalidad a las ~18 h de iniciado el proceso (figura 20.c) Sin embargo, su concentración inicial (0,200 g/100g) estuvo por debajo de las otras azúcares, lo que podría indicar que el consumo total se debió a la poca concentración. La lactosa presentó la mayor concentración en el medio de cultivo, con un valor inicial de 4,949 g/100 g que a partir de las 8 h aumentó y a las 12 h disminuyó hasta un valor final de 4,623 g/100 g. Si bien su descenso fue de 0,326 g/100 g, se debe destacar que es un azúcar simple, fácilmente metabolizada por las BAL y su consumo fue mayor al de la glucosa. La galactosa por el contrario aumentó 0,223 g/100 g obteniendo una concentración final en el medio de 0,640 g/100 g.

Al comparar los medios utilizados en las fermentaciones ejecutadas, el medio sintético obtuvo mejores resultados. Si bien, su DO_{máx} fue inferior al valor obtenido con el medio a base de suero de leche con suplemento, la producción de AL fue 9 g/L superior, haciendo este medio atractivo debido a su productividad.

Las curvas de crecimiento, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares estuvieron más marcadas y siguieron el comportamiento reportado en la literatura. El suero de leche suplementado con extracto de levadura, K₂HPO₄ y KH₂PO₄ obtuvo valores inferiores, sin embargo, es una alternativa viable y de menor costo para la producción de metabolitos de interés tal es el caso del AL y AA. Además, este representa una opción más económica, consecuente con el medio ambiente

y contribuye con la economía circular al revalorizar productos catalogados como residuos de la industria de productos lácteos. Es por este motivo que a partir de este trabajo de investigación se realizó un artículo científico titulado “Assessment of different lactic acid bacteria from agro-industrial residues: first report of the potential role of *Weissella soli* for lactic acid production from milk whey” que ya fue previamente aceptado por la revista.

Al comparar los resultados obtenidos a partir de ambas fermentaciones la producción de metabolitos es un factor de interés. Además, el costo del proceso es otro factor determinante durante un proceso de investigación que determina la viabilidad de continuar y escalar el proyecto. Por ende, la tabla 14 muestra los costos de la ejecución de cada fermentación según el medio de cultivo empleado.

Tabla 14. Costo de fermentación de *W. soli* en biorreactor de 7 L empleando diversos sustratos

Medio de cultivo	Costo insumos inóculo (\$)	Costo insumos biorreactor (\$)	Costo uso de equipo (\$)	Costo total 1 biorreactor (\$)	Costo total 3 biorreactores (\$)	Costo total 3 biorreactores (€)
MRS	6,66	66,62	96,99	171,00	352,75	225 828
Sintético	4,46	44,57	96,99	146,00	279,97	179 234
Base	3,70	36,98	96,99	138,00	254,93	163 206
Suero de leche suplementado	1,05	7,19	98,20	106,00	158,85	101 693

Para el presente estudio, en total se utilizaron 3 biorreactores (tabla 14). Al efectuar un análisis de costos por fermentación y comparar diversos sustratos el caldo MRS presenta el mayor costo. Si bien este es un medio rico en nutrientes y específico para BAL, su costo es elevado, por lo cual el empleo de medios alternativos resulta atractivo. El medio sintético y medio base formulados a partir de sustratos comerciales presentaron un costo similar entre sí con una diferencia de €16 028, pero con resultados más prometedores para el medio sintético, siendo este último €46 000 más económico en comparación con el CMRS.

Sin embargo, al considerar el suero de leche suplementado el ahorro representa aproximadamente un 45% del costo total. Esta disminución de costos se debe a la obtención del sustrato (suero de leche) de forma gratuita de empresas lecheras en el país, que, si bien es previamente tratado, estas actividades junto con el suplemento no implican un costo económico relevante colocándolo como el sustrato más económico de los 4 evaluados. Al comparar los costos por etapa los insumos requeridos para el preinóculo, inóculo y fermentación para el suero de leche con un suplemento son inferiores en todos los casos. Como única desventaja se identifica que el costo en el uso del equipo es superior debido a la necesidad de centrifugar el suero de leche previo a su uso. Este proceso no se realiza para la preparación de los otros medios.

6. CONCLUSIONES

1. La cinética de crecimiento bacteriano de los aislamientos *Lactiplantibacillus pentosus* código (70-1, 19-2 y 71-6) presentaron los valores máximos de DO del total de los 30 aislamientos estudiados con valores de $1,662 \pm 0,011$, $1,563 \pm 0,091$ y $1,554 \pm 0,051$, sin embargo, *L. pentosus*_70-1 presentó diferencias significativas.
2. Los aislamientos de *W. soli*_29, *L. pentosus*_70-1 y *L. pentosus*_69 presentaron la mayor producción de AL en un biorreactor con valores de $20,833 \pm 2,731$ g/L, $20,100 \pm 2,754$ g/L y $20,100 \pm 2,562$ g/L. Mientras que la producción de AA fue de $4,023 \pm 0,680$ g/L, $4,367 \pm 0,626$ g/L y $4,115 \pm 0,660$ g/L. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre las muestras evaluadas y los valores de AL y AA obtenidos.
3. A partir de la prueba de fermentación de carbohidratos (API 50 CH), *L. pentosus*_17-2, *W. soli*_29 y *W. soli*_31 fermentaron la mayor cantidad de azúcares del panel evaluado. Siendo capaces de transformar azúcares monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Sin embargo, *W. soli*_31 fue el único aislamiento capaz de fermentar la sal *gluconato potásico* estableciéndolo como un aislamiento de alta adaptabilidad a medios alternativos.
4. Este estudio propone el aislamiento *W. soli* como una alternativa para la producción de AL. *W. soli*_31 se caracterizó como el aislamiento más promisorio en base a los valores de $DO_{m\acute{a}x}$, y la capacidad fermentativa de diversos carbohidratos para su empleo en medios de crecimiento alternativos. Además, los estudios desarrollados con el uso de este aislamiento son limitados. Las pruebas de cinética de crecimiento empleando 18 medios de cultivo indicaron que el medio de cultivo sintético reportó la mayor $DO_{m\acute{a}x}$ y μ (h^{-1}) con valores de $1,093 \pm 0,025$ y $0,097 \pm 0,003$, siendo elegido el primer medio alternativo.
5. Las fermentaciones en un matraz y en un biorreactor indicaron que el medio sintético fue el de mayor producción de AL y tuvo un comportamiento estable durante el periodo evaluado. Sin embargo, el suero de leche suplementado es una alternativa viable y de menor costo para la producción de metabolitos de interés. Además, este medio es una opción más económica y consecuente con el medio ambiente, al revalorizar productos catalogados como residuos.
6. El presente estudio desarrolla una metodología que incorpora la aplicación del suero de leche como medio de cultivo alternativo para el crecimiento de BAL. El suero de leche es un residuo de la industria de los productos lácteos. Por lo tanto, este estudio presenta una alternativa para el uso de este residuo, lo revaloriza y contribuye con la economía circular.
7. El total de aislamientos utilizados en el presente estudio se aislaron de residuos agroindustriales de diferentes procedencias. En consecuencia, el aislamiento de las BAL

previamente identificadas contribuye con la caracterización de la microflora de los residuos de la agroindustria a nivel nacional, dan un valor agregado a estos residuos y contribuye con la economía circular.

8. El presente estudio brinda dos alternativas para el uso de residuos agroindustriales. La primera consiste en la extracción y aislamiento de las BAL y la segunda es el uso del suero de leche como un medio de cultivo alternativo para las BAL.
9. Desde el marco de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), este trabajo busca la revalorización de materiales reconocidos como residuos de la agroindustria al explotar y extraer productos aprovechables a nivel comercial e industrial. Buscando desarrollar procesos que cumplan con la economía circular, promoviendo la agricultura sostenible y la mejora de la nutrición, contribuyendo con el objetivo de hambre cero.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar una investigación que utilice otros de los aislamientos con alto potencial biotecnológico no empleadas en este trabajo con el objetivo de conocer su producción de AL y capacidad de adaptabilidad a medios alternativos.
2. Estudiar otros residuos agroindustriales como sustrato, fuente de carbono y azúcares para una fermentación más económica y comparar su productividad con los medios empleados en este trabajo.
3. Realizar una fermentación semicontinua o fed-batch a mayor escala que impulse el crecimiento de las BAL y producción de metabolitos de interés tales como el AL.
4. Realizar estudios que fomenten una fermentación multiproducto e incluyan la obtención de bacteriocinas, ácido lipoteicoico y otros metabolitos de interés a nivel industrial.
5. Estudiar la capacidad antagonista y de producción de bacteriocinas de aislamientos aislados de residuos agroindustriales y su implementación en la generación de nuevos productos y materias primas.
6. Desarrollar una metodología que incluya el diseño experimental, las variables dependientes e independientes y las unidades básicas para realizar el ajuste de un modelo primario (Gompertz y/o Baranyi) de crecimiento de microorganismos en este caso las BAL.
7. Desarrollar una metodología para la obtención de un modelo secundario en base a la concentración de azúcar o de sal del medio de cultivo.
8. Estudiar las curvas de crecimiento de las BAL mediante cinéticas de crecimiento en microplaca en un periodo de 48 h que permita identificar y comparar las 4 fases del crecimiento bacteriano
9. Suplementar el suero de leche con un mayor porcentaje de glucosa para incentivar la producción de metabolitos secundarios tales como el AL y AA.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ibarra JAG. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación [Internet]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2007. Disponible en: <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/handle/123456789/10742>
2. Garcia CA, Arrázola GS, Durango AM. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrar*. 2010;15(2):9–26.
3. Liu J, Chan SHJ, Chen J, Solem C, Jensen PR. Systems biology - A guide for understanding and developing improved strains of lactic acid bacteria. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2022 May 22];10(APR):876. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00876/full>
4. Mazzoli R, Bosco F, Mizrahi I, Bayer EA, Pessione E. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries [Internet]. Vol. 32, *Biotechnology Advances*. Elsevier; 2014 [cited 2022 May 22]. p. 1216–36. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975014001104?via%3Dihub>
5. Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M, et al. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* [Internet]. 2020;6(1):23. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/1/23>
6. Heer G. *Microbiología de la leche* [Internet]. Ecuador; 2007. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/39703317/microbiologia-de-la-leche-facultad-de-ciencias-veterinarias>
7. Ramírez Ramírez J, Rosas Ulloa P, Velázquez González M, Arce Romero F. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Rev Fuente* [Internet]. 2011;2(7):44–51. Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
8. Clavel Maqueda M. Condiciones microbiológicas y aislamiento de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales del Estado de Hidalgo. [Internet]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006. Disponible en: [http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10896/Condiciones microbiologicas y aislamiento.pdf?sequence=1](http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10896/Condiciones%20microbiologicas%20y%20aislamiento.pdf?sequence=1)
9. Eş I, Mousavi Khaneghah A, Barba FJ, Saraiva JA, Sant’Ana AS, Hashemi SMB. Recent advancements in lactic acid production - a review. Vol. 107, *Food Research International*. Elsevier; 2018. p. 763–70.
10. Baiano A. Recovery of biomolecules from food wastes - A review [Internet]. Vol. 19, *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014 [cited 2022 May 22]. p. 14821–42. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14821>
11. Tsegaye B, Jaiswal S, Jaiswal AK. Food waste biorefinery: Pathway towards circular bioeconomy [Internet]. Vol. 10, *Foods*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021

- [cited 2022 May 22]. p. 1174. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1174>
12. Nación PE de la, Rectores CN de. Estado de la Nación 2021: Versión Completa [Internet]. CR; 2021. Disponible en: <https://estadonacion.or.cr/informes/>
 13. Instituto Nacional de estadística y Censos I. Simposio: Una visión del sector agropecuario e indicadores de gestión ambiental en Costa Rica [Internet]. San José; 2016. Disponible en: https://inec.cr/sites/default/files/presentacion-multimedia/ansimposiocenagro_felixzumbado.pdf
 14. SEPSA. Informe de Gestión del Sector Agropecuario y Rural: Mayo 2014 a Abril 2018. 2018;155. Disponible en: www.sepsa.go.crwww.infoagro.go.cr
 15. Vargas Corredor YA, Pérez Pérez LI. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Rev Fac Ciencias Básicas*. 2018;V(1):59–72.
 16. Estela W, Rychtera M, Melzoch K, Quillama E, Egoavil E. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Rev Peru Biol*. 2007;14(2):271–5.
 17. John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. Vol. 74, *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 2007. p. 524–34.
 18. Ahmad A, Banat F, Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges [Internet]. Vol. 20, *Environmental Technology and Innovation*. Elsevier; 2020 [cited 2022 May 22]. p. 101138. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352186420314383?via%3Dihub>
 19. Pires AF, Marnotes NG, Rubio OD, Garcia AC, Pereira CD. Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey [Internet]. Vol. 10, *Foods*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021 [cited 2022 May 22]. p. 1067. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/5/1067>
 20. León-López A, Pérez-Marroquín XA, Campos-Lozada G, Campos-Montiel RG, Aguirre-Álvarez G. Characterization of whey-based fermented beverages supplemented with hydrolyzed collagen: Antioxidant activity and bioavailability. *Foods* [Internet]. 2020 Aug 12 [cited 2022 May 22];9(8):1106. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/8/1106>
 21. Barba FJ. An Integrated Approach for the Valorization of Cheese Whey. *Foods* 2021, Vol 10, Page 564 [Internet]. 2021 Mar 9 [cited 2022 May 22];10(3):564. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/3/564>
 22. Balderas MO. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2011.
 23. López Seijas J. Biodiversidad de bacterias ácido lácticas asociada a la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.) cultivada en Val do Salnés . Estudio de sus Jacobo López Seijas. Universidad de Vigo; 2017.

24. Peñaflor NM, Guerrero AG. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2007.
25. Ramírez M. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos [Internet]. Universidad autónoma del Estado del Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2009. Disponible en: http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/236/Actividad_inhibitoria_de_cepas_de_bacterias.pdf?sequence=1
26. Matamoros-Tinoco M, Quizhpe-Mogrovejo M. “Determinación de *Lactobacillus spp.* en productos cárnicos terminados empacados al vacío e identificación de la fuente de contaminación en la cadena de producción.” Universidad de Cuenca; 2018.
27. Sánchez Martínez J. Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Universidad de Oviedo; 2005.
28. Parra Huertas R. Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos. Biotecnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial BSAA. 2010;8(1):93–105.
29. Sánchez L, Tromps J. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. Rev Salud Anim. 2014;36(2):124–9.
30. Serna-Jiménez J. Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. Universidad de La Sabana. Universidad de La Sabana; 2012.
31. Jurado-Gámez H, Gúzman-Insuasty M, Jarrín-Jarrín V. Determinación De La Cinética, Pruebas De Crecimiento Microbiano. Rev la Fac Med Vet y Zootec [Internet]. 2015;62(2):40–56. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/51993>
32. Suarez DA. Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Universidad EAFIT; 2007.
33. Olivera J. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche . Universidad de la República; 2011.
34. Catrejon J. Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de Mexico [Internet]. Universidad Autónoma del Estado de México; 2017. Disponible en: http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/69916/Tesis_Jesi_Weissella_febrero-2018.pdf?isAllowed=y&sequence=1
35. Fusco V, Quero GM, Cho GS, Kabisch J, Meske D, Neve H, et al. The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front Microbiol [Internet]. 2015;6(MAR). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4362408/pdf/fmicb-06-00155.pdf>
36. Teixeira CG. Biodiversity and Technological potential of the *Weissella* strains isolated from different regions producing artisanal cheeses in Brazil [Internet]. Universidad Federal de Vicosa; 2018. Disponible en: https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/26794/1/texto_completo.pdf

37. Säde E, Björkroth J. Introduction to the Genera *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, and *Carnobacterium*. In: Lactic Acid Bacteria. 5th ed. 2020. p. 65–85.
38. Magnusson J, Jonsson H, Schnürer J, Roos S. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol [Internet]. 2002;52(3):831–4. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/52/3/0520831a.pdf?expires=1644893211&id=id&accname=guest&checksum=08380DAF0C16A94938C9E503E78B98E1>
39. DuconSosa VC, Ravelo JDR. Modelado e implementacion de la Tinción de Gram [Internet]. Pontifica Universidad Javeriana; 2010. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/7011/tesis459.pdf?sequence=>
40. Rodríguez PA, Arenas R. Hans Christian Gram y su tinción. Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica [Internet]. 2018;16(2):166–7. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
41. Mora X. Diferenciando Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas. 2012;25. Disponible en: <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>
42. Santambrosio E, Ortega M, Garibaldi P. Tinción y observación de microorganismos. [Internet]. 2009. Disponible en: http://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf
43. González MR. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Universidad Autónoma de Barcelona; 2009.
44. Pérez M, Mota M. Morfología y estructura bacteriana. Rev Actual Clínica Investig [Internet]. 2010 [cited 2020 Oct 17];49:1–9. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
45. Jiménez GA, Vélez A. Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. Med Lab [Internet]. 2012;18(11–12):557–73. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2012/myl1211-12d.pdf>
46. Esaú López-Jácome L, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología www.medigraphic.org.mx Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investig en Discapac Medigraphic [Internet]. 2014 Jan [cited 2020 Oct 17];3(1):10–8. Disponible en: www.medigraphic.org.mx
47. Gallegos C, González V, Aguilar C, Rodríguez R. Biofertilizantes microbianos. J Chem Inf Model. 2014;(August):363.
48. Zúñiga-García D, Montaleza-Auquilla M, Andrade D, León-Vizñay J, Ramírez P, Criollo-Ayala A, et al. Cinética de fermentación láctica natural de col blanca (*Brassica oleracea* L. capitata). Maskana [Internet]. 2020;11(1):57–68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18537/mskn.11.01.05>
49. Quintero M. JE, Acosta C. A, Mejía G. C, Ríos E. R, Torres L. AM. Lactic acid production

- via cassava-flour-hydrolysate fermentation. *Vitae*. 2012;19(3):287–93.
50. Castañeda MT. Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano. 2019.
 51. González DA, García AH. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Rev CENIC* [Internet]. 2013;44(1):1–18. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181226886003.pdf>
 52. Salgado L, Hernández C. Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control. *Sci Tech* [Internet]. 2014;19(1):5. Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/download/8897/5705%0A>
 53. Díaz C. Adherencia y Colonización de *Pseudomonas Fluorescens* sobre sustratos sólidos: Influencia de la topografía y composición química de la superficie [Internet]. Universidad Nacional de la Plata; 2011. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2685>
 54. Calderón Vargas JF. Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo [Internet]. Vol. 66. Fundación Universidad de América; 2017 [cited 2019 Oct 27]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6598/1/6121940-2017-2-IQ.pdf>
 55. Santolini A. Estudio de Adaptación bacteriana a concentraciones subinhibitorias de antibióticos [Internet]. Universidad de la Laguna; 2021. Disponible en: [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/25109/Estudio de adaptacion bacteriana a concentraciones subinhibitorias de antibioticos. .pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/25109/Estudio%20de%20adaptacion%20bacteriana%20a%20concentraciones%20subinhibitorias%20de%20antibioticos.%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
 56. Agudelo C, Ortega R, Hoyos JL. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* a6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. *Determ parámetros cinéticos dos inóculos lácticos Lact Plant a6 y Bact ácido lácticas yogurt*. 2010;8(2):08–16.
 57. Ozgun D, Vural HC. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. 2011;3(March):46–9.
 58. BioMérieux. API 50 CHL Medium Ref: 50 410. 2001;10–3.
 59. Ruíz C. Activación e identificación bioquímica de los conglomerados de bacterias probióticas Abt-5, Aby-3 Y Bc-7 utilizando el kit rápido API 50 CH. *Delos* [Internet]. 2012;5(13):16. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/delos/13/cr.pdf>
 60. Tovar RET. Obtención de ácido láctico por fermentación de almidón de ñame espino mediante el *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus* para su uso en la producción de ácido poliláctico. Universidad de Cartagena - Universidad Nacional de Colombia; 2015.
 61. Arroyo ELL. Utilización de *Lactobacillus acidophilus* como agente antagónico para el control de *Salmonella enteritidis* en pescado. Instituto Tecnológico de Costa Rica; 2002.
 62. Gutiérrez Cortés C. Utilización de un co - cultivo en la producción de bacteriocinas con potencial aplicación en alimentos. 2018;133.
 63. Serna-Cock L, Stouvenel AR. Producción Biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte.

- Cienc y Tecnol Aliment. 2005;5(1):54–65.
64. Araya-Cloutier C. Desarrollo de un proceso de fermentación para la producción de ácido láctico, utilizando un sustrato a base de un desecho de piña (*Ananas comosus*) y el microorganismo *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*. Universidad de Costa Rica; 2010.
 65. Torre Pascual I. Producción biotecnológica de ácido D-Láctico a partir de residuos de naranja [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2019. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/58053/1/T41519.pdf>
 66. Santos Corona AM. Caracterización de desperdicios de alimentos y su reúso en la obtención de ácido láctico. [Internet]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2020. Disponible en: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/4926/FIQ-M-2020-1265.pdf?sequence=1
 67. Guauque Torres M, Liliana Gómez S. Ácido Láctico: Una revisión sobre los métodos de determinación y purificación. *Biociencias*. 2019 Dec 2;14(2):149–75.
 68. Chan-Blanco Y, Bonilla-Leiva AR, Velázquez AC. Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2003 Aug 9 [cited 2021 Jul 25];63(2):147–52. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-003-1374-8>
 69. Gao C, Ma C, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2011;29(6):930–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>
 70. Ferrari A, Vinderola G, Weill R. Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura [Internet]. 1st ed. 2020. Disponible en: https://www.danoneinstitute.org/wp-content/uploads/2020/12/Book-Fermented-Food-2020_sp.pdf
 71. Quintero GIP. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Cenicafé* [Internet]. 2010; Disponible en: <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0402.pdf>
 72. Zamora JPM. Establecimiento y verificación del proceso de esterilización para el control y aseguramiento de la calidad biotecnológica de sistemas de biorreactores encaquetados [Internet]. Universidad de Costa Rica; 2014. Disponible en: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/xmlui/handle/123456789/2425>
 73. Mignone C, Yantorno O, Birabén RCE. *Microbiología industrial* [Internet]. OEA, editor. 2006. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/favela/Microbiologia_Industrial_Libro.pdf
 74. Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M, et al. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review [Internet]. Vol. 6, *Fermentation*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020 [cited 2021 Jul 25]. p. 23. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/1/23/htm>
 75. Tixicuro JMF, Chanfrau JMP, Céspedes ISS de, Fiallos MVL, Pérez JN. Optimización estadística de un bioproceso de ácido láctico a partir de lactosuero. *Cienc Lat Rev Científica*

- Multidiscip [Internet]. 2021;5:3259–75. Disponible en: <https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/530>
76. Deltalab. Placa de 96 pocillos estándar [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 21]. Disponible en: <https://www.deltalab.es/producto/placa-de-96-pocillos-estandar/>
 77. Applikon Biotechnology. Cultivation Systems from Discovery to Production [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.vertex.es/wp-content/uploads/2016/11/Applikon-Biotechnology-Cultivation-Systems-2019.pdf>
 78. Rojas TS, Acosta MP. Transformación de una autoclave obsoleta en un biorreactor piloto para la investigación de la degradación microbiana de un sustrato orgánico y la obtención de energía renovable [Internet]. Cartago; 2014. Disponible en: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/3373/transformación-autoclave-obsoleta-biorreactor-piloto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 79. Applikon Biotechnology. Control for Autoclavable Bioreactors 1 - 20L [Internet]. 2008. Disponible en: https://archive-resources.coleparmer.com/Manual_pdfs/99206-xx.pdf
 80. Loera P. Simulación estocástica y control óptimo de procesos para el tratamiento de aguas residuales de excretas porcinas [Internet]. 2003. p. 16–30. Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/1608/capitulo2.pdf>
 81. BURKERT IBÉRICA. Fermentation: Basic principles & processes explained simply [Internet]. 2013 [cited 2022 Feb 25]. Disponible en: <https://www.burkert.es/es/Servicio-Asistencia/Prestacion-de-servicios/Glosario/Fermentacion-conceptos-basicos-procedimientos-y-control-de-gases>
 82. Sevilla JMF. Cultivos por lotes, continuos y semicontinuos [Internet]. Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. 2014 [cited 2022 Feb 25]. Disponible en: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-5-modos-de-cultivo.html>
 83. De MAN JC, ROGOSA M, SHARPE ME. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. J Appl Bacteriol [Internet]. 1960 Apr;23(1):130–5. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
 84. BRITANIA. M.R.S. CALDO [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 27]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd4f4357a.pdf
 85. Britania. M.R.S. Agar [Internet]. 2021 [cited 2022 Feb 27]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd2543f1d.pdf
 86. Sreenath HK, Moldes AB, Koegel RG, Straub RJ. Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. J Biosci Bioeng [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2022 Feb 28];92(6):518–23. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172301803091>
 87. Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Bioresour Technol [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2021 Jul 5];96(1):63–7. Disponible en:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852404001038?via%3Dihubv>
88. Rojas-Garbanzo, Araya-Cloutier, Velázquez-Carrillo. Effect of Initial Sugar Concentration on the Production of L (+) Lactic Acid by Simultaneous Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of an Agro-Industrial Waste Product of Pineapple (*Ananas comosus*) Using *Lactobacillus casei* Subspecies *rhamnosus*. *Int J Biotechnol Wellness Ind.* 2012;(June):90–100.
 89. Valbuena E, Barreiro J, Sánchez E, Castro G, Kutchinskaya V, Briñez W. Predicción del crecimiento de *lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche descremada estéril en función a la temperatura. *Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia.* 2008;18(6):745–58.
 90. Choque EC. Influencia de la temperatura, porcentaje de grasa y sólidos no grasos en el crecimiento cinético de bacterias acidolácticas del yogur. Universidad Nacional del Altiplano; 2014.
 91. Rivas B, Moldes AB, Domínguez JM, Parajó JC. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2022 Feb 28];97(1):93–8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160504002788?via%3Dihub>
 92. Rivas B, Moldes AB, Domínguez JM, Parajó JC. Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: A mathematical interpretation. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2004 Jun 8 [cited 2022 Feb 28];34(7):627–34. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022904000766>
 93. Saavedra S, Alejandro-Paredes L, Flores-Santos JC, Flores-Fernández CN, Arellano-García H, Zavaleta-Pesantes AI. Optimization of lactic acid production by *lactobacillus plantarum* strain huil in a medium containing sugar cane molasses. *Agron Colomb.* 2021;39(1):54–63.
 94. Kwon S, Lee PC, Lee EG, Keun Chang Y, Chang N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin- supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2022 Feb 28];26(2–4):209–15. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022999001349?via%3Dihub>
 95. Aldape S, Iliná A, Rodríguez R, Ventura J, Segura P, Martínez JL. Factibilidad del empleo de suero de leche como medio de crecimiento de *Lactobacillus paracasei*. 2015;188837. Disponible en: https://smbb.mx/congresos_smbb/guadalajara15/PDF/XVI/trabajos/III/IIIC-79.pdf
 96. Jakymec M, Morán H, Páez G, Ferrer JR, Mármol Z, Ramones E. Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia.* 2001;11(1):53–9.
 97. Rojas AM, Montaña L, Bastidas M. Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp . *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* Production of lactic acid from whey using *Lactobacillus delbrueckii subsp . bulgaricus* and Produção de ácido láctico d. *Rev Colomb Química* [Internet]. 2015;44(3):5–10. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309044719001%0ACómo>

98. Arellano Arriaga A. Evaluación del proceso de obtención y separación de suero lácteo mediante tecnología de membrana. 2013;124.
99. Escobar LF, Rojas CA, Giraldo G, Padilla L. Evaluación del Crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de Ácido láctico usando como sustrato el suero de leche vacuno. Rev invest Univ Quindío - Colomb. 2010;20:42–9.
100. Chacón Gurrola L, Rentería-Monterrubio A, Rodríguez-Figueroa J. PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO: USOS, RELACIÓN CON LA SALUD Y BIOACTIVIDADES. Interciencia [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 2];42:712–8. Disponible en: <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/11/712-CHAVEZ-42-11.pdf>
101. Huertas RAP. Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. Rev Fac Nac Agron Medellín [Internet]. 2009 Apr 16 [cited 2022 Mar 5];62(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>
102. Poveda E. E. Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. Rev Chil Nutr [Internet]. 2013 Dec [cited 2022 Mar 5];40(4):397–403. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/469/46929416011.pdf>
103. Esaú López-Jácome L, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. 2014;3. Disponible en: www.medigraphic.org.mx
104. Quintanilla JRP, Hernández EAR. Aislamiento y caracterización de bacterias acidolácticas (BAL) obtenidas de *Oreochromis niloticus* (Tilapia) cultivadas en jaulas flotantes en el lago de Ilopango El Salvador [Internet]. Universidad de El Salvador; 2019. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/20217/1/16103762.pdf>
105. ABIS Encyclopedia. *Lactobacillus (Lactiplantibacillus) pentosus* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 30]. Disponible en: <https://www.tgw1916.net/Lactobacillus/pentosus.html>
106. Amorocho CM. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Universidad Politécnica de Valencia. 2011. 1–253 p.
107. Zapata S, Muñoz J, Ruiz OS, Montoya OI, Gutiérrez PA. Isolation of *Lactobacillus plantarum* LPBM10 and partial characterization of its bacteriocin. Vitae. 2009;16(1):75–82.
108. Sala BG. Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino: Caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35 [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2013. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/23425/1/T34859.pdf>
109. Vargas DR. Producción y obtención de ácido láctico, bacteriocinas y biomasa a partir de bacterias ácido lácticas. Universidad de Costa Rica; 2021.
110. Thi LN, Champagne CP, Lee BH, Goulet J. Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey. Int J Food Microbiol [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2022 May 7];89(1):67–75. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160503001090?via%3Dihub>

111. Dey DK, Koo BG, Sharma C, Kang SC. Characterization of *Weissella confusa* DD_A7 isolated from kimchi. LWT [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 May 7];111:663–72. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819305146>
112. Ye K, Liu J, Liu M, Huang Y, Wang K, Zhou G. Effects of two *Weissella viridescens* strains on *Listeria monocytogenes* growth at different initial inoculum proportions. CYTA - J Food [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 May 7];16(1):299–305. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2017.1401667>
113. Rivera de la Cruz JF, Villegas de Gante A, Miranda Romero LA, García Cué JL. Identificación de bacterias acidolácticas antagonicas de *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* aisladas de queso artesanal. Rev Mex Ciencias Agrícolas [Internet]. 2017 Aug 4 [cited 2022 May 7];8(4):785–97. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000400785&lng=en&nrm=iso&tlng=es
114. Andreevskaya M, Jääskeläinen E, Johansson P, Ylinen A, Paulin L, Björkroth J, et al. Food spoilage-associated *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* species display different survival strategies in response to competition. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 May 7];84(13). Disponible en: <https://journals-asm-org.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/doi/full/10.1128/AEM.00554-18>
115. Nguyen-Sy T, Yew GY, Chew KW, Nguyen TDP, Tran TNT, Le TDH, et al. Potential cultivation of *Lactobacillus pentosus* from human breastmilk with rapid monitoring through the spectrophotometer method. Processes. 2020;8(8):1–9.
116. Dimov S, Kirilov N, Peykov S, Ivanova I. Growth characteristics of twenty *Lactobacillus delbrueckii* strains isolated from bulgarian home made yoghurts. Biotechnol Biotechnol Equip [Internet]. 2014 [cited 2022 May 8];21(2):172–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817439>
117. Montero-Zamora J, Cortés-Muñoz M, Esquivel P, Mora-Villalobos JA, Velázquez C. Growth conditions and survival kinetics during storage of *Lactobacillus rhamnosus* GG for the design of a sustainable probiotic whey-based beverage containing Costa Rican guava fruit pulp. J Food Sci [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Jul 25];85(10):3478–86. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.15430>
118. Rawoof SAA, Kumar PS, Devaraj K, Devaraj T, Subramanian S. Enhancement of lactic acid production from food waste through simultaneous saccharification and fermentation using selective microbial strains. Biomass Convers Biorefinery. 2020;5–10.
119. Paulova L, Chmelik J, Branska B, Patakova P, Drahokoupil M, Melzoch K. Comparison of Lactic Acid Production by *L. casei* in Batch, Fed-batch and Continuous Cultivation, Testing the use of Feather Hydrolysate as a Complex Nitrogen Source. Agric Agribus Biotechnol [Internet]. 2020;63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2020190151>
120. Vodnar DC, Paucean A, Dulf FV, Socaciu C. HPLC Characterization of Lactic Acid Formation and FTIR Fingerprint of Probiotic Bacteria during Fermentation Processes. Not Bot, Hort Agrobot Cluj [Internet]. 2010;38(1):109–13. Disponible en:

<https://www.notulaebotanicae.ro/>

121. Drosinos EH, Mataragas M, Nasis P, Galiotou M, Metaxopoulos J. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. J Appl Microbiol [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2022 May 8];99(6):1314–23. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02735.x>
122. Alexandri M, Schneider R, Mehlmann K, Venus J. Recent advances in d-lactic acid production from renewable resources: Case studies on agro-industrial waste streams. Food Technol Biotechnol. 2019;57(3):293–304.
123. Olszewska-Widdrat A, Alexandri M, López-Gómez JP, Schneider R, Venus J. Batch and continuous lactic acid fermentation based on a multi-substrate approach. Microorganisms [Internet]. 2020 Jul 21 [cited 2021 Jul 25];8(7):1–14. Disponible en: <https://europepmc.org/articles/PMC7409180>
124. Contreras Estrada MI, Baltazar RG, Cortes SL, Rodríguez GA, Santacruz GH. Autocuidado de la salud en trabajadoras del sector informal en Guadalajara (México) Una perspectiva de género. Salud Uninorte [Internet]. 2014 [cited 2022 May 14];30(1):1–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.14482/>
125. Micanquer-Carlosama A, Cortés-Rodríguez M, Serna-Cock L. Formulation of a fermentation substrate from pineapple and sacha inchi wastes to grow *Weissella cibaria*. Heliyon [Internet]. 2020;6(4):0–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020306356>
126. Jawad AH, Alkarkhi AFM, Norulaini NAN, Ogugbue JC, Easa AM. Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. J King Saud Univ - Sci [Internet]. 2013;25(1):39–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2012.04.001>
127. Djukić-Vukovic AP, Mojovic L V, Jokic BM, Nikolic SB. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. Bioresour Technol. 2013;135:454–8.
128. Abdel-rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnol Adv [Internet]. 2013;31(6):877–902. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
129. Montero-Lagunes M, Juárez-Lagunes FI, García-Galindo HS. Suero de leche fermentado con Lactobacilos para la alimentación de becerros en el trópico. Agrociencia. 2009;43(6):585–93.
130. Abdel-rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. J Biotechnol [Internet]. 2011;156(4):286–301. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>
131. Plessas S, Bosnea L, Psarianos C, Koutinas A, Marchant R, Banat I. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. Bioresour Technol. 2008;99:5951–5.

ANEXOS A

Tabla A1. Nomenclatura de las bacterias en estudio

Código de aislamiento	Especie de la bacteria	Procedencia
2A2-B	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
IA2-P	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
II-C1-C	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
11-C2-C	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
11-C1-B	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
I-C2	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
16	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Broza de café
17-1	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Broza de café
17-2	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Broza de café
18	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Broza de café
19-1	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	Broza de café
19-2	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Broza de café
29	<i>Weissella soli</i>	Residuos de zanahoria
30-2	<i>Weissella soli</i>	Residuos de zanahoria
31	<i>Weissella soli</i>	Residuos de zanahoria
66-2	<i>Leuconostoc falkenbergense</i>	Residuos de naranja-banano
68-1	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Residuos de naranja-banano
68-3	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Residuos de naranja-banano
69	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Residuos de naranja-banano
70-1	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Residuos de naranja-banano
70-2	<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i>	Residuos de naranja-banano
71-6	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Residuos de naranja-banano
P2	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
P4	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
P6	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
P7	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	Aguas mieles de café
P8	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
P9	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
P10	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café
P13	<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i>	Aguas mieles de café

Tabla A2. DOMáx y tasa de crecimiento ((h^{-1})) de las bacterias del ácido láctico

Aislamiento	OD600 máximo	Tasa de crecimiento (h^{-1})
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _70-1	1,662 ± 0,011 ^a	0,139±0,013 ^{i,j,k,l}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _19-2	1,563± 0,091 ^{a,b,c}	0,267±0,016 ^{a,b}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _71-6	1,554± 0,051 ^{a,b,c}	0,238±0,011 ^{b,c,d,e}
<i>Lactobacillus harbinensis</i> _P7	1,542±0,023 ^{a,b,c}	0,196±0,008 ^{d,e,f,g,h}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P6	1,510±0,014 ^{a,b,c}	0,182±0,003 ^{e,f,g,h,i,j}
<i>Weissella soli</i> _31	1,504±0,059 ^{a,b,c}	0,256±0,021 ^{a,b,c}
<i>Weissella soli</i> _29	1,500±0,045 ^{a,b,c}	0,229±0,014 ^{b,c,d,e,f}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _17-2	1,492±0,039 ^{a,b,c}	0,224±0,013 ^{b,c,d,e,f}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P8	1,490±0,057 ^{a,b,c}	0,194±0,023 ^{d,e,f,g,h,i}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P2	1,488±0,104 ^{a,b,c}	0,176±0,034 ^{f,g,h,i,j,k}
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> _66-2	1,477±0,058 ^{a,b,c}	0,225±0,049 ^{b,c,d,e,f}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P10	1,471±0,028 ^{a,b,c}	0,201±0,033 ^{c,d,e,f,g}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _I-C2	1,470±0,061 ^{a,b,c}	0,189±0,014 ^{e,f,g,h,i,j}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _68-3	1,469±0,035 ^{a,b,c}	0,231±0,044 ^{b,c,d,e,f}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _69	1,457±0,086 ^{a,b,c}	0,225±0,019 ^{b,c,d,e,f}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _II-C2-C	1,453±0,118 ^{a,b,c}	0,191±0,008 ^{d,e,f,g,h,i,j}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P9	1,448±0,137 ^{a,b,c}	0,157±0,031 ^{g,h,i,j,k}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _IA2-P	1,448±0,040 ^{a,b,c}	0,197±0,022 ^{d,e,f,g,h}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _2A2-B	1,427±0,031 ^{a,b,c}	0,167±0,044 ^{g,h,i,j,k}
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> _19-1	1,420±0,091 ^{b,c}	0,247±0,032 ^{b,c,d}
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> _18	1,413±0,121 ^c	0,163±0,087 ^{g,h,i,j,k}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _II-C1-B	1,412±0,101 ^c	0,157±0,020 ^{g,h,i,j,k}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P13	1,399±0,105 ^c	0,183±0,029 ^{e,f,g,h,i,j}
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> _16	1,389±0,131 ^c	0,210±0,020 ^{c,d,e,f,g}
<i>Levilactobacillus brevis</i> _68-1	1,383±0,202 ^c	0,162±0,057 ^{g,h,i,j,k}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _P4	1,352±0,019 ^{c,d}	0,137±0,012 ^{j,k,l}
<i>Lactiplantibacillus argentoratensis</i> _70-2	1,332±0,105 ^{c,d}	0,160±0,021 ^{g,h,i,j,k}
<i>Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans</i> _II-C1-C	1,116±0,666 ^{d,e}	0,115±0,081 ^{k,l}
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> _17-1	0,970±0,066 ^e	0,142±0,011 ^{h,i,j,k,l}
<i>Weissella soli</i> _30-2	0,401±0,226 ^f	0,048±0,024 ^m

Los datos se muestran como media ± desviación estándar, los valores se obtuvieron por triplicado en los experimentos. Las letras en cada columna indican diferencias significativas.

Tabla A3. DO, pH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en matraz utilizando medio sintético.

t (h)	DO	pH	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)	A. Láctico (g/L)	A. Acético (g/L)
0	0,075±0,009	5,333±0,042	1,220±0,171	1,197±0,167	1,110±0,129	0,793±0,109	0,504±0,146
2	0,233±0,026	4,957±0,038	1,220±0,165	1,143±0,202	1,133±0,147	1,717±0,789	0,691±0,129
4	0,315±0,014	4,480±0,072	1,207±0,167	1,077±0,188	1,183±0,140	3,037±0,847	0,646±0,107
6	0,520±0,047	4,230±0,053	1,227±0,176	1,143±0,222	1,193±0,147	3,220±0,466	0,713±0,097
8	0,643±0,050	4,057±0,049	1,193±0,173	1,130±0,198	1,193±0,147	4,333±0,598	0,727±0,102
10	0,716±0,040	3,937±0,042	1,190±0,173	1,117±0,193	1,187±0,147	5,047±0,656	0,790±0,115
12	0,789±0,041	3,807±0,031	1,170±0,155	1,117±0,188	1,177±0,143	5,737±0,759	0,943±0,127
14	0,823±0,041	3,817±0,040	1,173±0,167	1,153±0,178	1,173±0,144	6,393±0,866	0,897±0,135
18	0,890±0,041	3,693±0,029	1,057±0,152	1,050±0,173	1,107±0,129	7,367±0,973	0,953±0,133
20	0,898±0,042	3,690±0,035	0,963±0,127	0,930±0,143	1,083±0,128	7,800±1,037	1,023±0,136

Tabla A4. DO, pH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en matraz utilizando suero de leche suplementado.

t (h)	OD600	pH	Glucosa (g/100g)	Galactosa (g/100g)	Lactosa (g/100g)	A. Láctico (g/L)	A. Acético (g/L)
0	0,003±0,001	6,477±0,096	0,427±0,128	0,446±0,111	4,200±0,651	2,057±0,297	0,338±0,069
2	0,085±0,029	6,417±0,076	0,150±0,022	0,360±0,062	4,227±0,653	1,940±0,317	0,358±0,056
4	0,376±0,040	6,307±0,075	0,083±0,065	0,321±0,083	4,113±0,560	2,087±0,314	0,383±0,078
6	1,42 6±0,080	5,643±0,083	0,119±0,018	0,339±0,061	4,067±0,644	3,207±0,359	0,304±0,050
8	2,676±0,099	5,113±0,021	0,156±0,025	0,349±0,057	3,940±0,617	3,943±0,543	0,349±0,048
24	3,329±0,062	4,507±0,015	0,137±0,022	0,348±0,062	3,417±0,556	8,200±1,093	0,083±0,015
26	2,676±0,099	4,507±0,015	0,000±0,000	0,000±0,000	3,233±0,408	8,367±1,101	0,079±0,011

Tabla A5. DO, NaOH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en biorreactor utilizando medio sintético.

t (h)	OD600	NaOH (g)	Fructosa (g/100g)	Glucosa (g/100g)	Sacarosa (g/100g)	A. Láctico (g/L)	A. Acético (g/L)
0	0,146±0,013	0,000±0,000	0,930±0,180	1,057±0,183	0,894±0,129	0,196±0,030	0,158±0,041
2	0,271±0,009	5,900±1,588	0,967±0,138	1,053±0,220	0,927±0,116	0,354±0,216	0,239±0,060
4	0,346±0,006	12,120±1,113	0,960±0,128	1,013±0,138	0,880±0,097	0,730±0,103	0,219±0,045
6	0,462±0,014	19,280±1,443	0,993±0,124	1,033±0,144	0,927±0,097	1,157±0,156	0,171±0,032
8	0,680±0,070	29,930±3,288	1,010±0,131	0,993±0,139	0,913±0,097	2,183±0,310	0,170±0,029
10	1,228±0,224	48,720±6,485	0,967±0,119	0,910±0,122	0,883±0,091	3,213±0,537	0,150±0,044
11	1,494±0,262	62,263±9,019	0,920±0,114	0,833±0,121	0,880±0,087	4,263±0,734	0,126±0,029
12	2,303±0,386	78,090±11,256	0,893±0,124	0,773±0,121	0,863±0,088	5,117±0,841	0,125±0,044
13	3,723±0,641	98,060±13,897	0,867±0,108	0,653±0,099	0,847±0,087	6,610±0,939	0,116±0,078
14	4,506±0,709	118,860±15,267	0,887±0,110	0,551±0,118	0,933±0,107	7,967±1,285	0,171±0,022
16	5,073±0,718	165,337±18,834	0,850±0,111	0,408±0,113	0,953±0,095	10,467±1,612	0,145±0,025
18	5,898±0,362	214,573±19,668	0,731±0,094	0,225±0,072	0,920±0,098	13,433±2,017	0,152±0,022
19	6,956±0,395	238,787±19,118	0,667±0,088	0,118±0,091	0,910±0,103	14,867±2,155	0,157±0,021
20	6,258±0,380	263,325±23,865	0,623±0,089	0,091±0,070	0,897±0,090	16,267±2,301	0,164±0,022

Tabla A6. DO, NaOH, producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares para una fermentación en biorreactor utilizando suero de leche suplementado.

Tiempo	OD600	NaOH (g)	Glucosa (g/100g)	Galactosa (g/100g)	Lactosa (g/100g)	A. Láctico (g/L)	A. Acético (g/L)
0	0,050±0,000	0,000±0,000	0,200±0,050	0,417±0,078	4,949±0,769	2,600±0,460	1,360±0,200
2	2,849±0,475	14,370±1,160	0,181±0,046	0,419±0,078	4,957±0,769	2,657±0,463	1,333±0,271
4	3,344±0,569	24,890±0,990	0,163±0,023	0,423±0,065	4,970±0,769	2,567±0,517	1,030±0,143
6	4,195±0,534	33,657±1,218	0,221±0,064	0,533±0,131	4,993±0,819	2,300±0,428	0,847±0,141
8	4,652±0,199	44,053±2,800	0,167±0,034	0,498±0,092	5,090±0,786	2,853±0,549	0,913±0,119
10	5,571±0,632	47,820±10,417	0,119±0,016	0,520±0,082	5,000±0,772	3,380±0,447	1,067±0,192
12	5,254±0,589	60,143±8,693	0,119±0,019	0,496±0,080	5,120±0,794	3,907±0,601	1,093±0,162
14	5,816±1,002	73,257±7,026	0,163±0,058	0,540±0,100	4,893±0,761	4,803±0,767	1,063±0,145
16	7,012±0,337	87,810±5,974	0,115±0,018	0,523±0,081	4,663±0,722	5,740±0,935	1,127±0,165
18	6,482±0,665	101,997±6,222	0,000±0,000	0,621±0,131	4,700±0,748	6,420±1,174	1,170±0,162
19	6,425±0,548	109,810±7,126	0,000±0,000	0,557±0,192	4,573±0,718	6,993±1,266	1,157±0,198
20	6,392±0,534	118,300±8,558	0,000±0,000	0,640±0,107	4,623±0,726	7,210±1,355	1,023±0,152

ANEXOS B.



Figura B1. Microbiorreactor y cassette empleados



Figura B2. Muestras para HPLC previamente filtradas.



Figura B3. API 50 CHL *medium*



Figura B4. Kit API 50 CH.

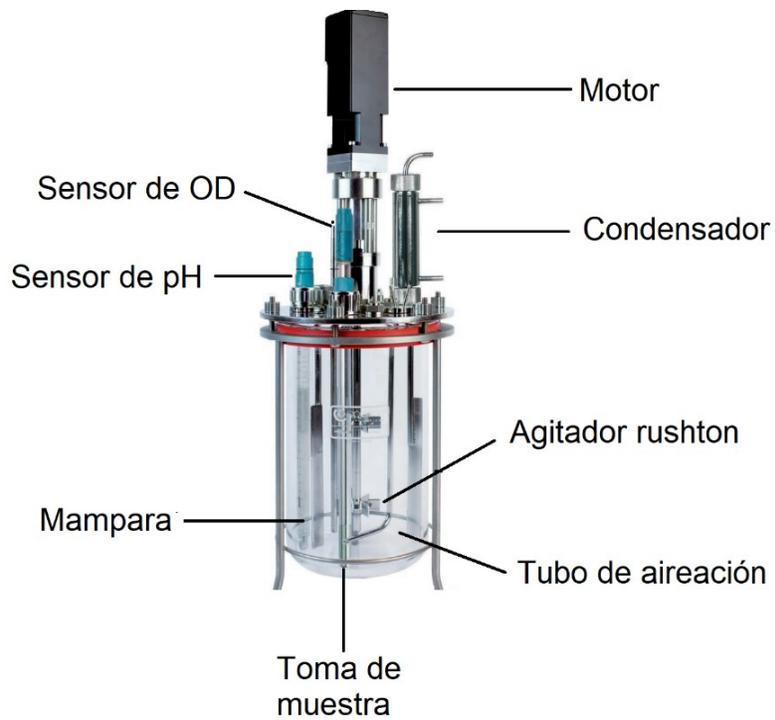


Figura B5. Partes de un biorreactor Applikon Biotechnology de 7 L.

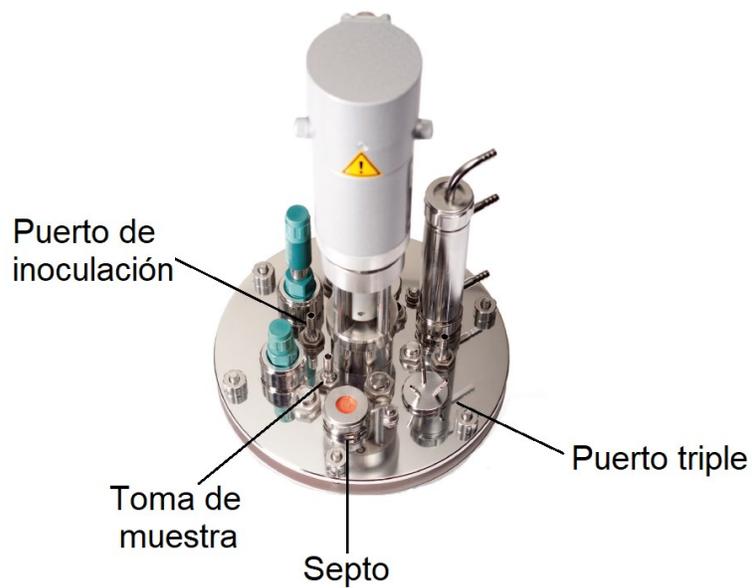


Figura B6. Partes de la tapa de un biorreactor Applikon Biotechnology de 7 L.

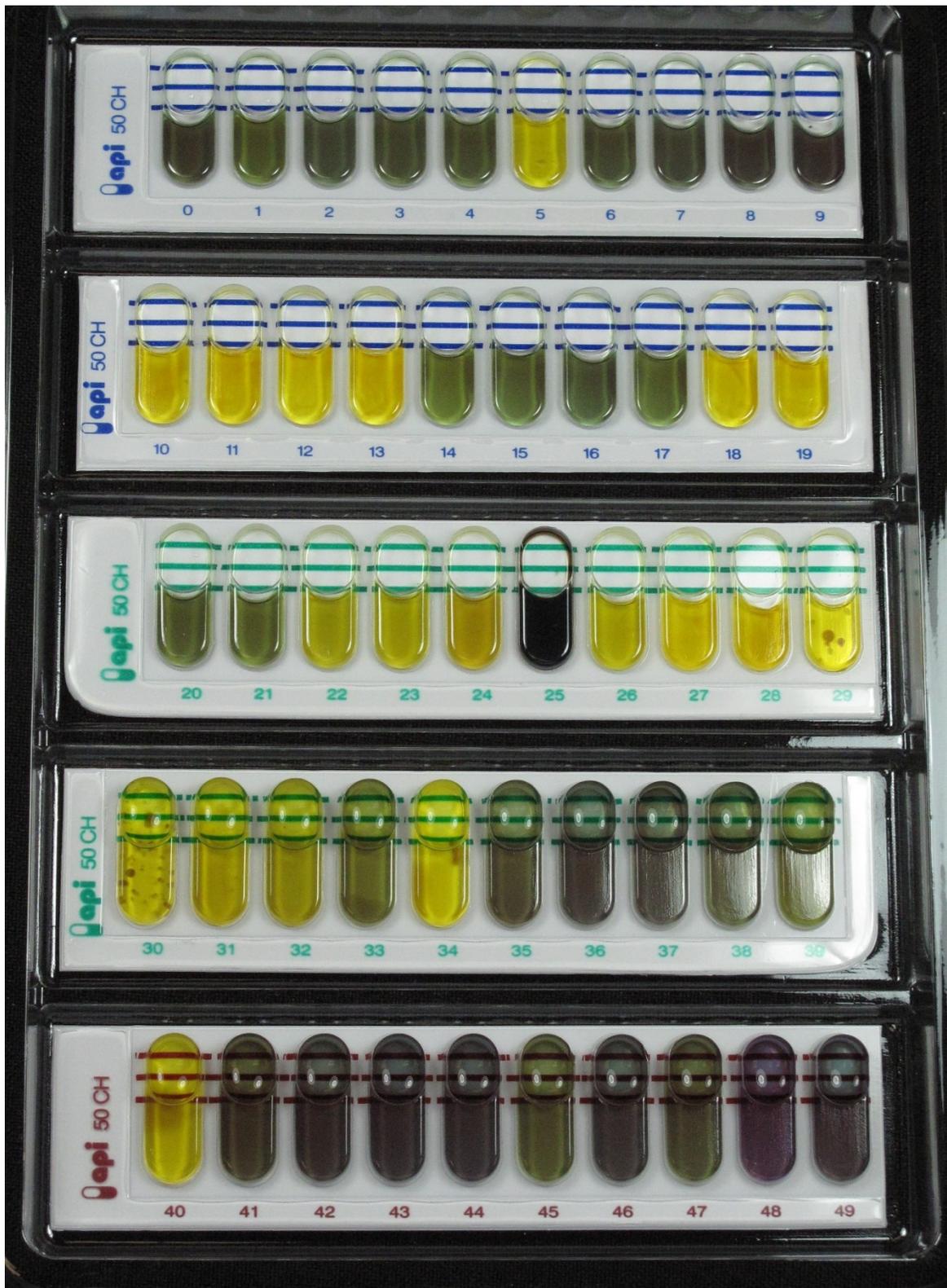


Figura B7. Coloración de la Prueba API para el aislamiento *L. pentosus*_69

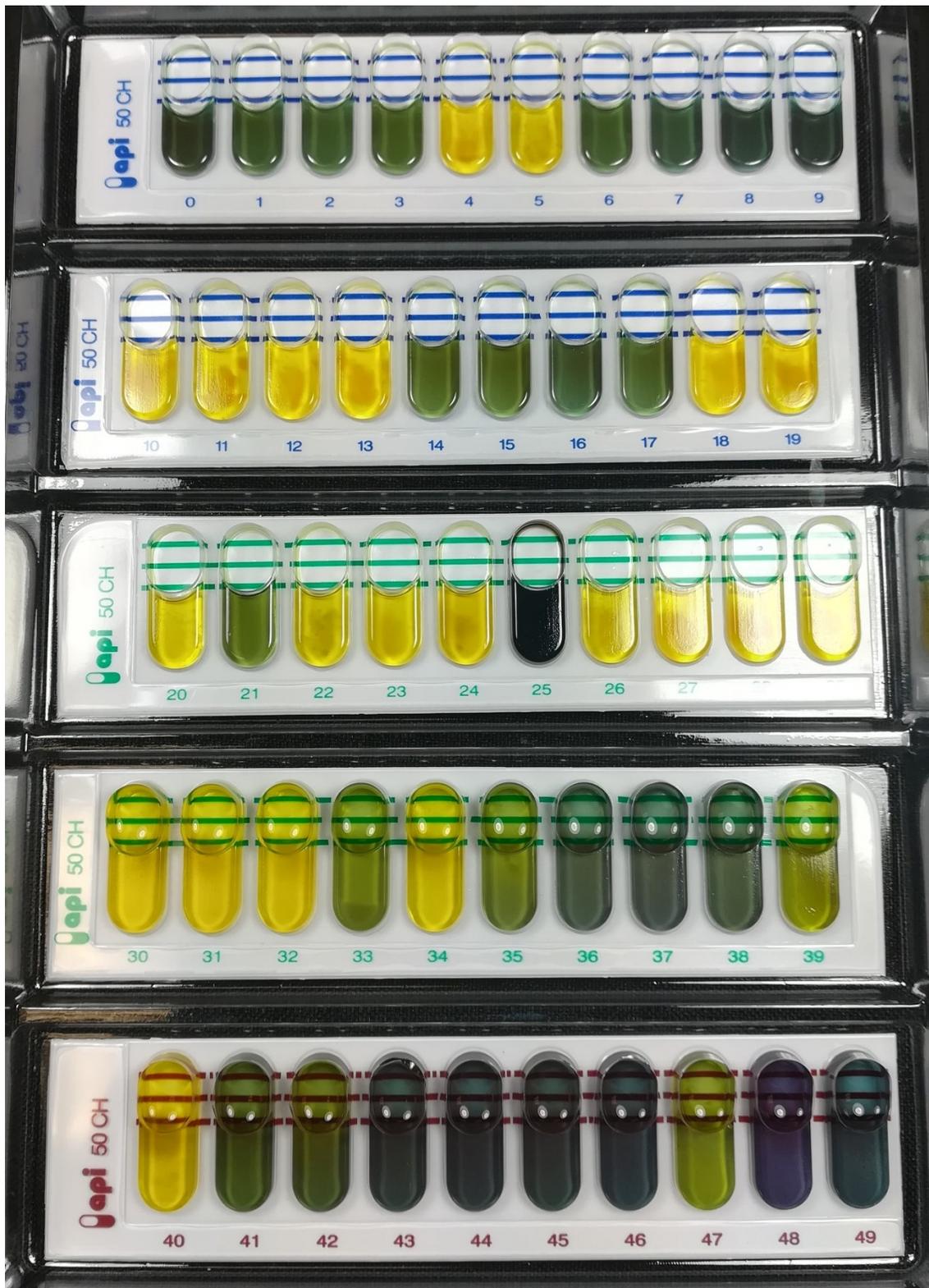


Figura B8. Coloración de la Prueba API para el aislamiento *W. soli*_31

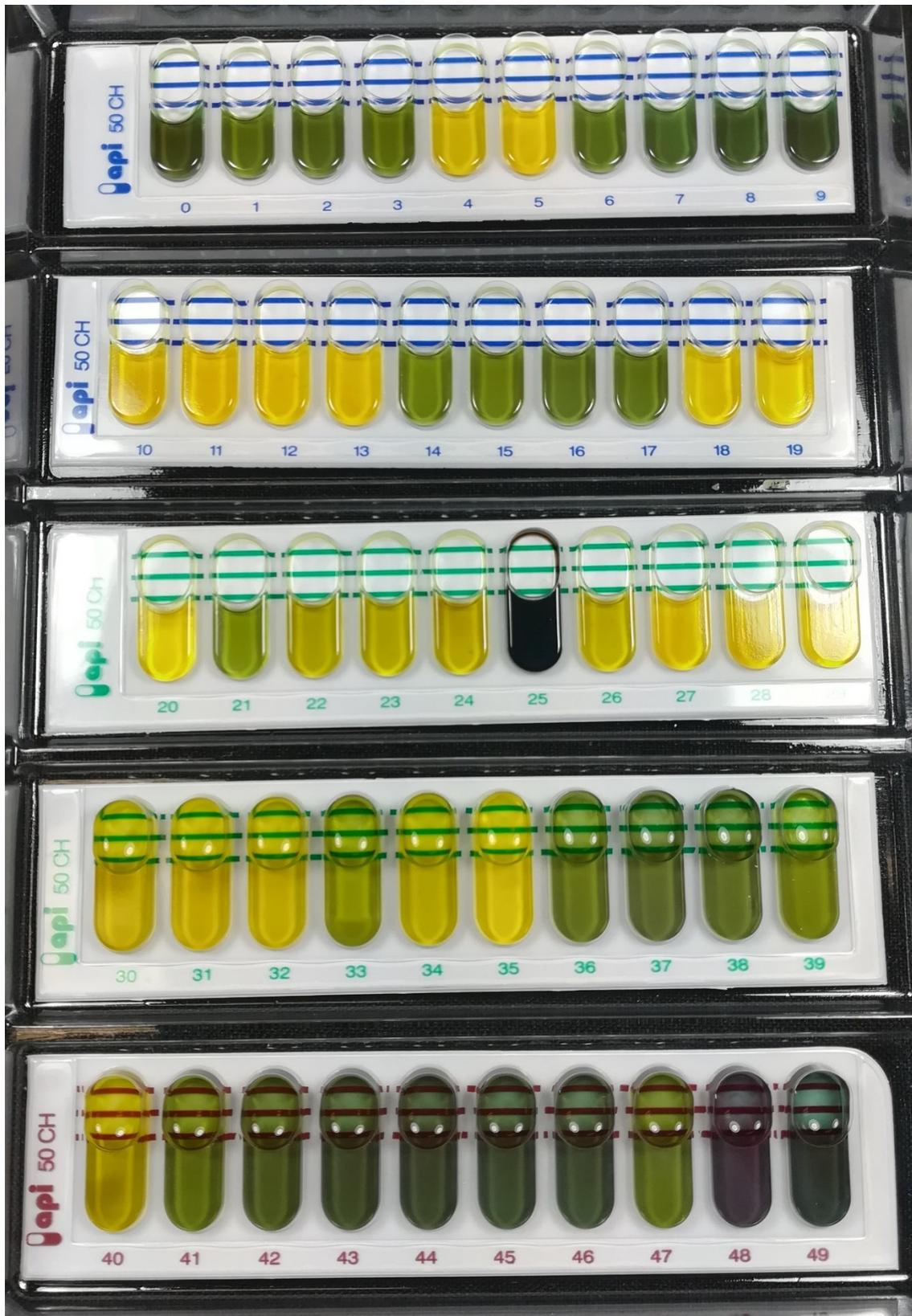


Figura B9. Coloración de la Prueba API para el aislamiento *L. pentosus* _68-3



Figura B10. Coloración de la Prueba API para el aislamiento *L. pentosus* _70-1



Figura B11. Coloración de la Prueba API para el aislamiento *L. falckenbergense*_66-2



Figura B12. Coloración del medio API 50 CHL Medium™ posterior a la inoculación.

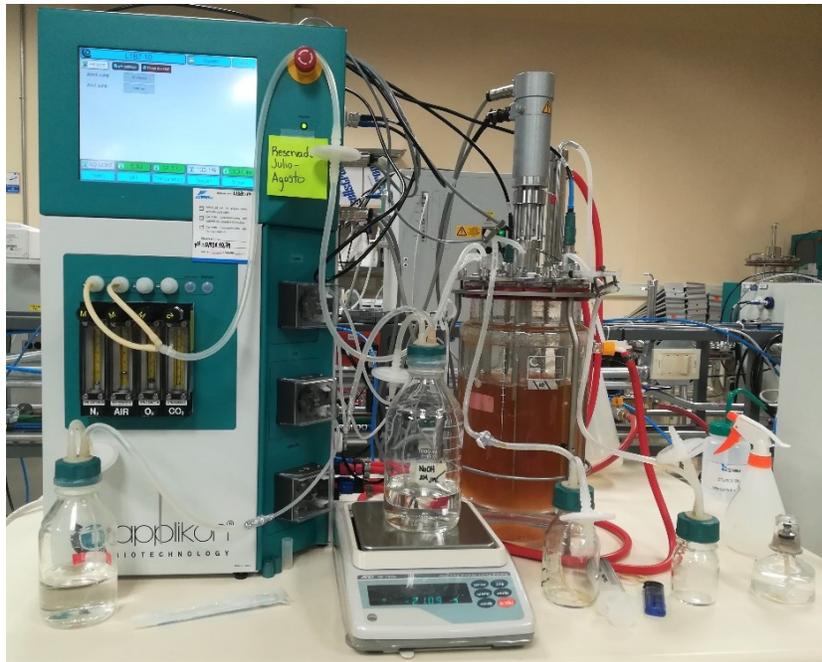


Figura B13. Fermentación de *W. soli*_31 en medio sintético.



Figura B14. Fermentación de *W. soli*_31 en suero de leche suplementado.