

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE  
BIOMASA CELULÓSICA DEL AFRECHO DE MALTA MEDIANTE BACTERIAS  
LÁCTICAS**

**MARÍA CATALINA SILVA VARGAS  
JUAN FELIPE SOLER LONDOÑO**

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

**Director del proyecto  
Msc. Ing. Adriana Suesca Díaz  
Ingeniera Química**

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

**2024**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

Adriana Suesca Díaz  
Director de trabajo de grado

---

Jurado 1

---

Jurado 2

Bogotá D.C., Enero de 2024

## **DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro  
**Dr. Mario Posada García-Peña**

Consejero Institucional  
**Dr. Luis Jaime Posada García-Peña**

Vicerrectora Académica  
**Dra. María Fernanda Vega**

Vicerrector Administrativo y Financiero  
**Dr. Ricardo Alfonso Peñaranda Castro**

Vicerrectora de Investigaciones y Extensión  
**Dra. Susan Margarita Benavides Trujillo**

Secretario General  
**Dr. José Luis Macías Rodríguez**

Decana de la Facultad de Ingenierías  
**Ing. Naliny Patricia Guerra Prieto**

Director del Programa de Ingeniería Química  
**Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina**

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

## DEDICATORIA

A la mujer extraordinaria que siempre será mi luz y mi guía, mi querida abuelita, Carmencita, aunque ya no esté físicamente, su amor, sabiduría y cariño perduran en cada recuerdo que compartimos.

A mi amada madre Helena, que, en el transcurso de mi vida, su amor incondicional ha sido mi faro guía. Sus sacrificios, su paciencia, su amor infinito y constante apoyo han sido los pilares que han sostenido cada paso que he dado en este camino. Su fe en mis capacidades ha sido mi mayor impulso, y cada logro alcanzado en este trabajo de grado lleva impresa la marca indeleble de su influencia.

A mi padre, Aníbal, por su amor, apoyo constante y sabiduría. Cada paso de esta trayectoria académica ha sido marcado por sus enseñanzas, valores y su presencia alentadora.

A mi hermano Álvaro, por su apoyo desinteresado y generosidad al compartir su tiempo, conocimiento y amor en cada parte de mi vida. Su habilidad y disposición para brindarme una mano en cada momento, ha hecho que este camino sea más ameno.

A mi hermano Luis, por ser mi fuente constante de inspiración y motivación, por sus consejos, por su habilidad para abordar las complejidades, por su ingenio, por brindarme apoyo y amor siempre, por sus palabras alentadoras y su presencia, que son un recordatorio de la importancia de la familia y el valor de los lazos inquebrantables.

A mi sobrino Simón, que su presencia y alegría de vivir siempre están en mi corazón. Pese a los miles de kilómetros, siento tu energía positiva y el amor que compartimos, creando un vínculo que trasciende la distancia.

A mi sobrino Benjamín, por su alegría contagiosa y su curiosidad inagotable que han sido una constante fuente de motivación en mi vida, recordándome la importancia de perseguir nuestros sueños con la misma inocencia y entusiasmo que lo demuestra.

A mi compañero y confidente, Juan Felipe, por este trayecto académico lleno de amor, paciencia, comprensión y colaboración, que han transformado este desafío en una travesía, llena de aprendizaje y crecimiento mutuo. Cada línea de este trabajo refleja no solo nuestro amor a la investigación, sino también nuestra dedicación compartida a querer construir un futuro mejor y nuestra fortaleza como equipo.

A todos aquellos que quieren cambiar el mundo, con la esperanza de que encuentren inspiración en cada página y crean en un futuro mejor.

*María Catalina Silva Vargas*

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi padre, cuyo recuerdo me inspiró cada día a ser un buen estudiante y más importante, una buena persona. Cada logro de mi vida fue, es y será siempre para él. Espero que su memoria me acompañe por el resto de mi vida y que en dondequiera que esté se sienta orgulloso de la persona que soy.

A mi amada compañera de vida, Catalina. Que me permitió conocer la mejor versión de mí día tras día, su ejemplo y apoyo fueron fundamentales durante todos estos años, al igual que su dedicación. Todo lo que hemos pasado todo este tiempo, tiene un significado que no se borrará nunca ni de mi mente, ni de mi corazón. Espero que el camino que nos trace la vida sea largo y maravilloso como lo ha sido hasta ahora.

*Juan Felipe Soler Londoño*

## AGRADECIMIENTOS

En la culminación de este trabajo, quiero expresar mi agradecimiento a Dios, por las oportunidades brindadas, la sabiduría recibida y su guía constante.

Mi profundo agradecimiento a mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida. A mis padres, cuyo amor y sacrificio han sido la base de mi educación; a mis hermanos, por ser mis aliados y compañeros de vida; a mis sobrinos por su constante amor y por las aventuras juntos.

Este trabajo más que un logro académico; es un tributo a la influencia positiva que han tenido en mi vida.

Mi más sincero agradecimiento a nuestra directora de trabajo de grado, Adriana Suesca, por su dedicación, por su orientación, por su compromiso constante y sus valiosos aportes para nuestro crecimiento académico y profesional.

Gracias a la Universidad de América, por su apoyo, por motivar el amor por la investigación, por su formación como profesional y también como individuo, por su infraestructura y recursos brindados.

Gracias al personal de laboratorio de la Universidad de América, encabezado por la Ingeniera Jenny Hernández, y en especial a las laboratoristas químicas, Sara Rincón y Jeidy Alfonso, por toda su orientación y colaboración.

Gracias a todos los profesores que han contribuido a mi formación académica, por su dedicación y compartir sus conocimientos con pasión.

Gracias a la empresa MERQUIAND®, en especial a la Ingeniera Marla Cristiano, por apoyar la innovación y promover la investigación en la industria. Por brindarnos su apoyo en la obtención del complejo enzimático utilizado en parte fundamental de este trabajo.

Gracias a mi compañero de trabajo de grado, Juan Felipe, por las largas noches de estudio durante estos cinco años, por convertir las dificultades en oportunidades, por su apoyo y amor incondicional; y por compartir cada paso de este camino junto a mí. Agradezco sus palabras de ánimo y su disposición para compartir sus ideas, gracias por superar los desafíos y celebrar los triunfos en cada momento.

Gracias a todos aquellos que, de una manera u otra, han sido parte de este recorrido.

*María Catalina Silva Vargas*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi madre por todo el esfuerzo y sacrificios que ha realizado durante toda mi vida para darme absolutamente todo.

También agradezco a todas las personas cuyo aporte fue de vital importancia para el correcto desarrollo de este trabajo. Principalmente a nuestra directora Adriana Suesca, por su apoyo, disposición y entrega en todo momento; por poner a nuestra disposición los conocimientos, contactos y materiales, obrando más allá de lo que dicta el deber.

Al personal del laboratorio de la Universidad de América en cabeza de la ingeniera Jenny Hernández, y en especial a las laboratoristas Sara Rincón y Jeidy Alfonso por su total colaboración.

Gracias a la empresa MERQUIAND®, representada por la ingeniera Marla Cristiano, por su colaboración fundamental para la obtención del complejo enzimático utilizado.

Por último y más importante, a mi increíble compañera de trabajo María Catalina Silva Vargas. No solo es la mejor compañera de trabajo, sino la mejor compañera de vida que cualquiera podría tener. Gracias por todo el apoyo durante estos cinco años de carrera, por todo el crecimiento personal y profesional, gracias por absolutamente todo. Vamos por mucho más, espero que este sea solo el comienzo.

*Juan Felipe Soler Londoño*

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	17
OBJETIVOS	20
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1. Industria Cervecera en Colombia	21
1.2. Afrecho de malta	22
1.3. Fermentación	24
1.4. Ácido Láctico	26
1.4.1. <i>Propiedades fisicoquímicas del Ácido Láctico</i>	28
1.4.2. <i>Clasificación del Ácido Láctico</i>	28
1.5. Pretratamientos de biomasa lignocelulósica	29
1.6. Fermentación Láctica	30
1.6.1. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	31
1.6.2. <i>Streptococcus thermophilus</i>	32
1.7. Purificación del Ácido Láctico	34
2. HIDRÓLISIS DE AFRECHO DE MALTA	36
2.1. Hidrólisis ácida	37
2.1.1. <i>Cuantificación de azúcares reductores</i>	38
2.2. Hidrólisis enzimática	40
2.2.1. <i>Cuantificación de actividad enzimática</i>	42
2.3. Diagrama de Flujo de Bloques	45
2.4. Resultados y análisis	46
3. FERMENTACIÓN LÁCTICA	53
3.1. Inoculación	55
3.2. Medio de cultivo	56
3.2.1. <i>Cuantificación de biomasa</i>	59
3.2.2. <i>Cuantificación de Ácido Láctico</i>	62
3.3. Fermentación anaerobia mediante el consorcio microbiano con <i>Lactobacillus delbrueckii</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	63
3.4. Diagrama de Flujo de Bloques	67
3.5. Resultados y análisis	68
4. PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	77

4.1. Extracción líquido-líquido	77
4.2. Destilación	78
4.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas	79
4.3.1. <i>Densidad</i>	80
4.3.2. <i>Índice de refracción</i>	80
4.3.3. <i>Punto de ebullición</i>	81
4.4. Diagrama de Flujo de Bloques	83
4.5. Resultados y análisis	84
4.5.1. <i>Diagrama PFD</i>	87
5. CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXOS	99

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Consumo de bebidas alcohólicas en Colombia	21
<b>Figura 2.</b> Aplicaciones del afrecho de malta	23
<b>Figura 3.</b> Estructura de una microfibrilla de celulosa	24
<b>Figura 4.</b> Representación del crecimiento de inóculos	26
<b>Figura 5.</b> Estructuras isoméricas del ácido láctico	27
<b>Figura 6.</b> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	32
<b>Figura 7.</b> <i>Streptococcus thermophilus</i>	33
<b>Figura 8.</b> Montaje del secado del afrecho de malta	37
<b>Figura 9.</b> Montaje hidrólisis ácida	37
<b>Figura 10.</b> Montaje filtración al vacío	38
<b>Figura 11.</b> Montaje Baño María en método DNS	39
<b>Figura 12.</b> Montaje hidrólisis enzimática	41
<b>Figura 13.</b> Reacción química de la hidrólisis enzimática	42
<b>Figura 14.</b> Tubos Eppendorf en incubación	43
<b>Figura 15.</b> Tubos Eppendorf en baño de agua	43
<b>Figura 16.</b> Diagrama de Flujo de Bloques del proceso de hidrólisis del afrecho de malta	45
<b>Figura 17.</b> Curva de calibración de azúcares reductores	46
<b>Figura 18.</b> Actividad enzimática en el proceso de hidrólisis enzimática	52
<b>Figura 19.</b> Consorcio microbiano de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> utilizados	53
<b>Figura 20.</b> Consorcio microbiano de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> observado con el microscopio	54
<b>Figura 21.</b> Tubos de ensayo con el inóculo	55
<b>Figura 22.</b> Resultado del proceso de inoculación	56
<b>Figura 23.</b> Montaje de fermentación de prueba	59
<b>Figura 24.</b> <i>Vortex</i>	60
<b>Figura 25.</b> Suspensiones realizadas para la determinación de la curva de peso seco	61

<b>Figura 26.</b> Montaje filtración para curva de peso seco	62
<b>Figura 27.</b> Montaje fermentación láctica	65
<b>Figura 28.</b> Diagrama de Flujo de Bloques de la fermentación láctica	67
<b>Figura 29.</b> Curva de peso seco	69
<b>Figura 30.</b> Curva de calibración de Ácido Láctico	69
<b>Figura 31.</b> Perfil de concentraciones de biomasa, sustrato y producto	71
<b>Figura 32.</b> Caldos de fermentación centrifugados	77
<b>Figura 33.</b> Montaje de decantación	78
<b>Figura 34.</b> Montaje de destilación simple	79
<b>Figura 35.</b> Determinación del índice de refracción	81
<b>Figura 36.</b> Montaje de determinación del punto de ebullición	82
<b>Figura 37.</b> Diagrama de Flujo de Bloques de la purificación del Ácido Láctico	83
<b>Figura 38.</b> Ácido Láctico purificado	84
<b>Figura 39.</b> Diagrama PFD del proceso de producción de Ácido Láctico	89
<b>Figura 40.</b> Ficha de seguridad del Ácido Láctico	100
<b>Figura 41.</b> Ficha técnica caracterización bagazo de malta realizada en el laboratorio	101
<b>Figura 42.</b> Ficha técnica complejo enzimático de celulasa	102
<b>Figura 43.</b> Ruta metabólica para la producción de Ácido Láctico	113

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Propiedades fisicoquímicas del Ácido Láctico	28
<b>Tabla 2.</b> Caracterización fisicoquímica del afrecho de malta	36
<b>Tabla 3.</b> Muestras empleadas en la curva de calibración de glucosa	40
<b>Tabla 4.</b> Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis ácida	47
<b>Tabla 5.</b> Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis enzimática	48
<b>Tabla 6.</b> Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la cuantificación de actividad enzimática en el primer experimento	49
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la cuantificación de actividad enzimática en el segundo experimento	50
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de actividad enzimática en el primer experimento	51
<b>Tabla 9.</b> Cuantificación de actividad enzimática en el segundo experimento	51
<b>Tabla 10.</b> Medios de cultivo de fermentación prueba	57
<b>Tabla 11.</b> Compuestos de la solución de microelementos	58
<b>Tabla 12.</b> Suspensiones realizadas para la determinación de la curva de peso seco	61
<b>Tabla 13.</b> Concentración de soluciones patrón en cuantificación del Ácido Láctico	63
<b>Tabla 14.</b> Resultados curva de peso seco	68
<b>Tabla 15.</b> Resultados fermentación de prueba	70
<b>Tabla 16.</b> Rendimiento biomasa-sustrato de la fermentación láctica	73
<b>Tabla 17.</b> Rendimiento biomasa-producto de la fermentación láctica	74
<b>Tabla 18.</b> Error relativo en el rendimiento de la fermentación láctica	74
<b>Tabla 19.</b> Productividad en la fermentación láctica	75
<b>Tabla 20.</b> Error relativo en la productividad de la fermentación láctica	76
<b>Tabla 21.</b> Concentración final de Ácido Láctico	84
<b>Tabla 22.</b> Determinación de densidad	85
<b>Tabla 23.</b> Error relativo en la determinación de densidad	86
<b>Tabla 24.</b> Determinación del índice de refracción	86
<b>Tabla 25.</b> Error relativo en la determinación del índice de refracción	86
<b>Tabla 26.</b> Determinación del punto de ebullición	87

<b>Tabla 27.</b> Error relativo en la determinación del punto de ebullición	87
<b>Tabla 28.</b> Identificación de las muestras tomadas en la fermentación láctica	105
<b>Tabla 29.</b> Resultados cuantificación de biomasa, sustrato y producto en fermentación	107
<b>Tabla 30.</b> Resultados comparativos de la extracción de ácido láctico con diferentes solventes	114

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo 1.</b> Ficha de seguridad del Ácida Láctica	100
<b>Anexo 2.</b> Ficha técnica caracterización bagazo de malta realizada en el laboratorio	101
<b>Anexo 3.</b> Ficha técnica complejo enzimático de celulasa	102
<b>Anexo 4.</b> Resultados del cálculo del error relativo de la actividad enzimática	104
<b>Anexo 5.</b> Identificación de las muestras tomadas en la fermentación láctica	105
<b>Anexo 6.</b> Resultados cuantificación de biomasa, sustrato y producto en fermentación	107
<b>Anexo 7.</b> Cálculo del rendimiento biomasa-sustrato	108
<b>Anexo 8.</b> Cálculo del rendimiento producto-sustrato	109
<b>Anexo 9.</b> Tratamiento estadístico realizado a la fermentación láctica	110
<b>Anexo 10.</b> Ruta metabólica para la producción de Ácido Láctico	113
<b>Anexo 11.</b> Resultados comparativos de la extracción de Ácido Láctico con diferentes solventes	114
<b>Anexo 12.</b> Recomendaciones	115

## RESUMEN

El ácido láctico tiene múltiples aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y últimamente, en la producción de bioplásticos; debido a su importancia y su amplia demanda, se presenta una estrategia de aprovechamiento del afrecho de malta para la producción a escala laboratorio de ácido láctico por fermentación mediante un consorcio bacteriano entre las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*.

El proceso productivo constó de tres partes. La primera consiste en un pretratamiento, para la extracción de azúcares reductores, en el que se realizó una hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  0.1M, para la remoción de lignina y hemicelulosa; y una hidrólisis enzimática realizada con un complejo de enzima celulasa, para realizar una ruptura de los enlaces glucosídicos de la celulosa, permitiendo obtener la glucosa empleada como fuente de carbono en la fermentación láctica. En esta etapa se cuantificó el contenido de azúcares fermentables. La segunda parte es el proceso de fermentación láctica, utilizando como fuente de carbono los azúcares fermentables obtenidos en la hidrólisis del afrecho de malta. En esta etapa se realizó un seguimiento a la fermentación determinando el comportamiento del sustrato, la biomasa y el ácido láctico producido. La tercera etapa consiste en el proceso de purificación del ácido láctico obtenido del caldo de fermentación, mediante extracción líquido-líquido con acetato de etilo y posteriormente separando la fase orgánica por destilación simple.

De esta manera, se demostró que es posible producir ácido láctico a partir de la fermentación de biomasa celulósica proveniente del afrecho de malta, mediante bacterias lácticas. El sustrato utilizado en la fermentación tuvo una concentración de azúcares reductores totales de 6 g/L, y en la fermentación realizada por triplicado, se obtuvo ácido láctico con una concentración aproximada de 6.7 g/L, el rendimiento biomasa sustrato fue de 0.3 g/g, mientras que el rendimiento producto sustrato fue de 1.1 g/g y la productividad promedio fue de 0.158 g/Lh. Posterior al proceso de purificación, el ácido láctico se obtuvo en una concentración de 70 g/L, fue determinado y cuantificado, mediante el método de espectrofotometría.

Finalmente, se realizó una comparación de algunas propiedades fisicoquímicas del ácido láctico obtenido, índice de refracción y punto de ebullición. Obteniendo valores de 983.1  $kg/m^3$ , 1.3866 y 108 °C respectivamente y errores relativos en todas las mediciones inferiores al 1%.

**Palabras clave:** Ácido Láctico, Fermentación, Biomasa, Afrecho de Malta, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*.

## INTRODUCCIÓN

La cerveza es una de las bebidas mayormente consumidas en todo el mundo, y por lo tanto, es una bebida que tiene una alta manufactura alrededor del planeta. La elaboración de cerveza es un proceso que data de varios siglos y que naturalmente ha sufrido diversas modificaciones y con la revolución industrial, la producción de cerveza se ha tecnificado e industrializado en gran medida. No obstante, hoy en día es muy común que además de las grandes empresas cerveceras, la cerveza sea fabricada de manera artesanal, aumentando ampliamente el volumen de producción de esta bebida a nivel mundial. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estima que la producción global de cerveza es de aproximadamente 113.654.000 millones de kilogramos al año. [1]

La cerveza es una bebida alcohólica obtenida del proceso fermentativo de un mosto enriquecido en azúcares, generalmente de cebada o trigo y otras materias primas. Los ingredientes típicamente utilizados son agua, malta, lúpulo y una cepa de levadura [2].

La malta requerida para la producción de cerveza es una materia prima, que al terminar el proceso de maceración donde se extraen los azúcares fermentables, se separa del mosto líquido y se desecha tanto en producciones artesanales como industriales, pues ya no tiene ningún valor para el proceso, ni tampoco un valor comercial significativo.

Esta malta residual es considerada como un desecho, que se elimina en todas las productoras de cerveza ya sea de baja o de gran escala productiva. Este residuo genera contaminación y acumulación excesiva, y se convierte en un problema significativo para los productores de cerveza, debido a que aproximadamente el 85% del volumen de los subproductos del proceso de producción es generado por la malta residual, llamado también afrecho de malta [3]. Se estima que por cada cien litros de cerveza producida se desechan veinte kilogramos (20 kg) de bagazo o afrecho de malta (BSG). [1]

Este afrecho se ha venido utilizado como ración para animales o como un compuesto para la fabricación de abono orgánico [4]. Sin embargo, en caso de no mitigar la cantidad de residuo acumulado, se pueden presentar problemas ambientales importantes, pues este desecho orgánico generado durante el proceso de producción de cerveza se presenta en grandes volúmenes, a una velocidad que rebasa la capacidad de degradación natural y tiene una incorrecta disposición.

Actualmente, con el auge del aprovechamiento de la materia prima de origen agroindustrial para la obtención de productos de interés o de alto valor agregado, se plantean diferentes alternativas y operaciones complejas utilizadas en ingeniería química, para poder aprovechar

este afrecho de malta para la producción de sustancias químicas de interés industrial o en la generación de energía. Los tratamientos químicos que se utilizan son basados en la electrólisis para producir lignina, el cual es un componente intermedio en la fabricación de otros productos más complejos. Los métodos mecánicos, se basan en hidrotatamiento o licuefacción, para la obtención de biocombustibles o compuestos previos para la síntesis de biopolímeros, resinas fenólicas y adhesivos. Respecto a tratamientos termoquímicos se llevan a cabo procesos de combustión, pirólisis y gasificación para obtener componentes de valor agregado o energía. Finalmente, en cuanto a tratamientos bioquímicos, se realiza una fermentación aprovechando la biomasa lignocelulósica proveniente del afrecho de malta, utilizando este como fuente de carbono en el medio de cultivo o sustrato para un microorganismo productor de una sustancia química en particular [5].

Debido a su carácter renovable y a ciertos estudios relacionados con la composición química del afrecho de malta, se propone el aprovechamiento de residuo lignocelulósico por vía biotecnológica como alternativa para la obtención de ácido láctico.

El ácido láctico es el hidroxiaácido más sencillo, tiene múltiples aplicaciones, está presente en alimentos como yogur, suero de leche, panes, queso y muchos otros alimentos; así mismo, es uno de los principales intermediarios metabólicos en la mayoría de los organismos vivos, desde procariotas anaerobios hasta humanos [6]. Por lo anterior, su demanda se ha incrementado entre un 5 al 8% anual, especialmente debido al desarrollo del ácido poliláctico (PLA) [6].

El ácido láctico puede obtenerse por síntesis química o por vía biotecnológica. La síntesis química comercial consiste básicamente en la reacción de cianuro de hidrógeno y acetaldehído, usando como catalizador una base, para formar lactonitrilo; posteriormente, es recuperado por destilación e hidrolizado a ácido láctico [6]. La vía de producción biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por hongos o bacterias, en su mayoría. Los sustratos utilizados pueden ser monosacáridos y disacáridos, caracterizados por ser cualquier fuente de carbohidratos que contengan pentosas como la sacarosa y la glucosa; o pueden ser sustratos poliméricos; estos contienen polisacáridos que, en la mayoría de los casos, no pueden ser asimilados de manera directa por los microorganismos, por lo que requieren una etapa previa de hidrólisis [6].

La versatilidad de los microorganismos productores presenta una gran alternativa para la obtención del ácido láctico, estudiado en diferentes ocasiones. Una investigación realizada en 2015, en una alianza entre El Instituto de Biotecnología y Agroindustria Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales y El Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los

Materiales, Campus Las Lagunillas, presenta el estudio de una biorrefinería a partir de los residuos de plátano. En la investigación, los autores separan las pentosas de las hexosas y utilizando glucosa como medio de cultivo, se realiza una fermentación a 37°C y se utiliza la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*, para obtener ácido láctico, que es sometido a procesos de separación y purificación para ser obtenido con una pureza del 99,3% [7]. En otra publicación de la revista Waste Management realizada en el año 2016, presentaba un artículo realizado por Djukić, et al., donde se hacía referencia al aprovechamiento de los residuos del bioetanol y del afrecho de malta en la fabricación de cerveza, para producir ácido láctico a partir de una fermentación realizada por la bacteria *Lactobacillus Rhamnosus* a 37°C, en un medio de 200 mL con una concentración de inóculo del 10 % (v/v), en condiciones estáticas anaerobias [8]. *Streptococcus thermophilus* suele utilizarse en conjunto con *Lactobacillus* como cultivo iniciador en diferentes procesos de producción, debido a que cada una estimula el crecimiento de la otra; estas son bacterias lácticas, comúnmente utilizadas en la industria láctea.

En este estudio se lleva a cabo el uso del consorcio bacteriano conformado por *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*, para la obtención de ácido láctico por vía biotecnológica, a partir del aprovechamiento del afrecho de malta.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Producir ácido láctico a partir de fermentación de biomasa celulósica proveniente del afrecho de malta mediante bacterias lácticas.

### **Objetivos Específicos**

- Desarrollar un proceso de hidrólisis del afrecho de malta, para la obtención de azúcares fermentables.
- Elaborar una fermentación con bacterias lácticas, utilizando como medio de cultivo azúcares fermentables.
- Realizar un proceso de purificación del producto fermentado.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Industria Cervecera en Colombia

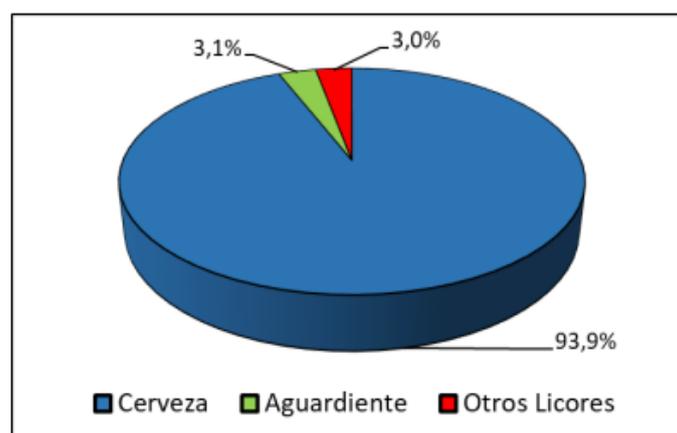
A finales del siglo XIX comenzó la industrialización de la cerveza en Colombia y se construyeron las primeras cervecerías modernas con un peso de carácter industrial importante. Un siglo después, los productores de cerveza más importantes del país en ese momento, las empresas Bavaria de Bogotá y Continental de Medellín, decidieron fusionarse para formar el Consorcio de Cervecerías Bavaria S.A. [9].

Actualmente, la industria cervecera en Colombia está conformada por unas 200 micro cervecerías, que producen alrededor del 1% del mercado, y por las dos malterías y seis cervecerías de Bavaria que controlan el resto del mercado [10].

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida en el país como se muestra en la Figura 1 y su mercado crece cada vez más, en gran medida por las innovaciones en diferentes estilos, niveles de precios, envases, sabores, aromas y las experiencias que traen consigo los distintos productos. Además de su facilidad y versatilidad para ser tomada en cualquier ocasión.

**Figura 1.**

*Consumo de bebidas alcohólicas en Colombia.*



*Nota.* La figura representa el panorama del consumo de las bebidas alcohólicas en Colombia, en el año 2021.

Lo anterior, reafirma las grandes cantidades de cerveza anual que se producen en Colombia, generando a su vez distintos problemas y afectaciones al medio ambiente, entre los cuales están la cantidad de subproductos generados. Se denominan subproductos de cervecería a las materias primas que resultan del proceso de la elaboración de la cerveza (molienda y maceración, elaboración del mosto y fermentación). Se estima que el 85% del volumen de los residuos originados por la industria cervecera son de malta residual, también conocida como afrecho de malta o bagazo de malta (BSG) [3], generado en la etapa posterior a la cocción del mosto, pues el mosto es enfriado para ser fermentado y el afrecho es desechado.

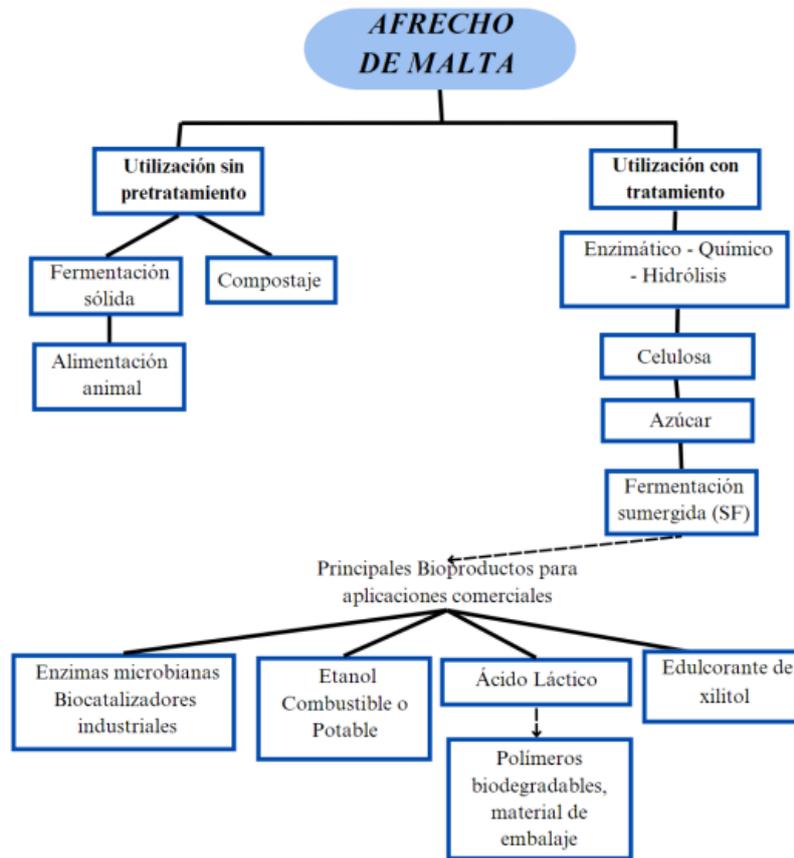
## **1.2. Afrecho de malta**

El afrecho de malta es definido como “El residuo seco extraído de la sola Malta de Cebada o mezclada con otros granos cereales o productos de granos, resultante de la manufactura del mosto o de la cerveza, y que puede contener residuos de lúpulo gastado en una cantidad que no excede el 3%; uniformemente distribuido” [11]. Por su potencial como residuo agroindustrial y la inherente necesidad de aplacar su desperdicio, se han venido examinando diferentes opciones o alternativas disponibles para el reciclado de este mismo en diferentes bioprocesos que resulten en un producto de valor agregado.

Por lo tanto, la mayoría de las grandes empresas ya no consideran los residuos como un desecho, sino como una materia prima para su uso en otros procesos [4], esto siguiendo los principios de la sostenibilidad, así como, los de economía circular.

El método tradicional utilizado en diferentes investigaciones es el compostaje, que es un tratamiento sencillo para la utilización del afrecho de malta. Sin embargo, solamente el compostaje no abastece la demanda requerida, puesto que solamente en Colombia se producen aproximadamente 271645.35 toneladas de malta residual [12]. Es por ello que se ha utilizado el afrecho de malta como fuente de carbono en la fermentación, como se puede evidenciar en la Figura 2, para el cultivo de biomasa microbiana, para la producción de enzimas microbianas, azúcares, proteínas, ácidos orgánicos, antioxidantes y aditivos alimentarios [13].

**Figura 2.**  
Aplicaciones del afrecho de malta.



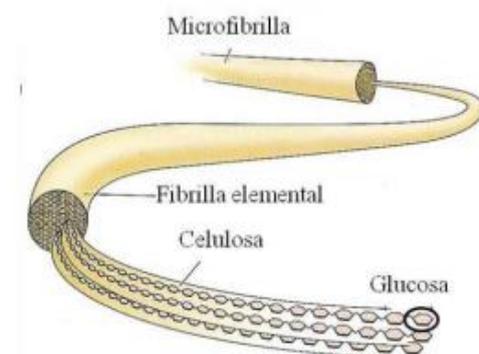
*Nota.* La figura representa los diferentes caminos de bioprocesos que se pueden seguir aprovechando el afrecho de malta o bagazo de malta como materia prima.

El gran potencial del afrecho de malta proviene de las características de su composición química, pues es considerado como una fuente de biomasa con alto contenido de humedad y residuos glucoproteicos, que brindan un medio de cultivo óptimo para la proliferación de microbiota bacteriana [1].

Entre los compuestos más relevantes que posee el afrecho de malta, se destaca la celulosa, siendo esta la molécula biológica más numerosa y que constituye el mayor porcentaje de los biopolímeros existentes. Su estructura es lineal y está formada por 2000 a 14000 unidades de  $\beta$ -(1,4) glucosa en cadenas no ramificadas, unidas entre sí con enlaces tipo puente de hidrógeno [14]. La celulosa se encuentra en las paredes de las células vegetales y no es fácilmente accesible, debido a que se encuentra ligada finalmente a otros polímeros como la lignina [15].

**Figura 3.**

*Estructura de una microfibrilla de celulosa.*



*Nota.* La figura representa la estructura de una microfibrilla formada por cadenas de celulosa. Tomado de: M. Barroso, “Pretratamiento De Biomasa Celulósica Para La Obtención De Etanol En El Marco De Una Biorrefinería”. Universidad Politécnica De Madrid, 2010. Accessed: Apr. 08, 2023 [15].

### 1.3. Fermentación

Debido a la celulosa presente en el afrecho de malta, la cual contiene diferentes monómeros de azúcar (hexosas y pentosas), su uso es ideal para el proceso de fermentación. La glucosa, que es un azúcar utilizado por todos los organismos capaces de fermentar cualquier hidrato de carbono, es utilizada como fuente de carbono en un sustrato potencialmente fermentable por algún microorganismo [15].

Existen tres modalidades básicas del metabolismo energético: fermentación, respiración y fotosíntesis. La fermentación puede definirse como un proceso metabólico generador de energía, donde el sustrato da lugar a una mezcla de productos finales. Los carbohidratos son por esta razón muy buenos sustratos para estos procesos, debido a que los sustratos fermentables están al mismo nivel de oxidación que el material celular y al tiempo sirven como principal fuente de carbono para las biosíntesis [16].

La fermentación es definida desde un punto de vista bioquímico, como el proceso metabólico de generación de energía en el que los compuestos orgánicos actúan tanto como donadores como de aceptores terminales de electrones. Desde el punto de vista de la microbiología, una fermentación consiste en todo proceso utilizado para la elaboración de productos mediante cultivo de microorganismos [17]. Los microorganismos que típicamente

realizan fermentaciones son hongos y bacterias, estos mediante un proceso natural obtienen energía en condiciones de limitación de oxígeno a partir de una fuente de carbono.

Es el mecanismo que les permite la obtención de energía a nivel celular (en forma de ATP), para poder continuar con su ciclo de vida. Existen diversos tipos de fermentaciones, y se clasifican, en gran medida, en función del producto que se obtiene. A grandes rasgos, a continuación, se presentan los principales tipos de fermentación:

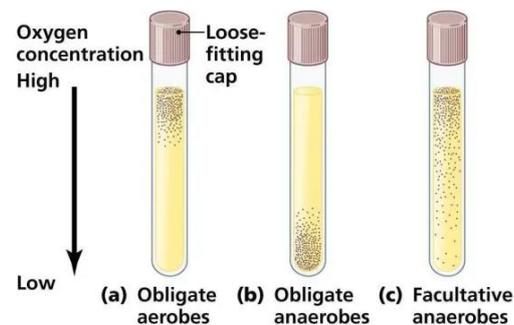
- *Fermentación alcohólica*: Es aquel proceso biológico realizado en ausencia de oxígeno (anaerobio), en el que los microorganismos descomponen o degradan carbohidratos (principalmente hexosas), para obtener etanol y dióxido de carbono [18].
- *Fermentación butírica*: Proceso anaeróbico realizado principalmente por bacterias del género *Clostridium*, en el cual a partir de una fuente de carbono compuesta principalmente por carbohidratos se produce ácido butírico (o ácido butanoico), además de dióxido de carbono [19].
- *Fermentación acética*: Esta es una fermentación aerobia, debido a que se realiza en exceso de oxígeno, pues se lleva a cabo una oxidación, en la cual bacterias del género *Acetobacter*, toman como fuente de carbono el alcohol etílico y lo degradan produciendo ácido acético y agua [20].
- *Fermentación láctica*: Consiste en un proceso aerobio o anaerobio, en el cual, a partir de una fuente de carbono, como por ejemplo pentosas y hexosas (principalmente hexosas) un microorganismo, denominado como bacteria láctica o bacterias ácidolácticas (LAB por sus siglas en inglés), degradan la fuente de carbono para obtención de energía y producen en el proceso ácido láctico [21].

La respiración puede definirse como un proceso metabólico productor de energía, en el que compuestos orgánicos o inorgánicos sirven como dadores de electrones y el O<sub>2</sub> como aceptor final. Sin embargo, existe una excepción para esta definición, y son las respiraciones anaerobias, realizadas por ciertas bacterias, en las que compuestos inorgánicos oxidados (sulfatos, nitratos y carbonatos), sustituyen al O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones [16]. Los requerimientos de O<sub>2</sub> de los microorganismos reflejan el mecanismo utilizado para sus necesidades energéticas, de esta manera, se clasifican dependiendo de sus requerimientos de oxígeno a grandes rasgos.

- **Aerobios estrictos**: Se caracterizan por un requerimiento estricto de oxígeno para crecer [16].

- Anaerobios estrictos: No pueden crecer en presencia de oxígeno, no utilizan el O<sub>2</sub> libre como aceptor final de electrones, utilizan moléculas inorgánicas como nitrato, nitrito y sulfato [16].
- Anaerobios facultativos: Son capaces de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, en ausencia de oxígeno realizan procesos fermentativos [16].

**Figura 4.**  
*Representación del crecimiento de inóculos.*



**Nota.** La figura representa la manera en que en un tubo de cultivo que contiene caldo nutritivo, y se observan que los aerobios estrictos crecen lo más cerca de la superficie; los anaerobios estrictos crecen cerca del fondo del tubo donde casi no les llega oxígeno y los anaerobios facultativos están dispersos y se difunden en el medio.

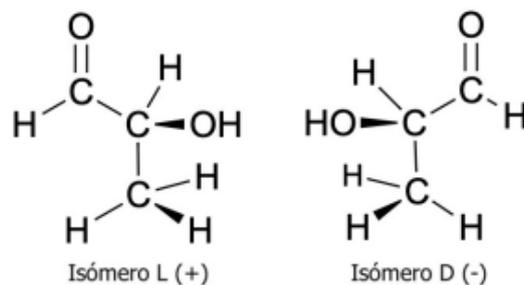
Tomado de: M.T. Madigan, J.M. Martinko, K.S. Bender, D.H. Buckley, D.A. Stahl, Brock Biología de los Microorganismos, 14a edición, (pp. 1131). 2015. Pearson Educación S.A. [22].

#### 1.4. Ácido Láctico

El ácido láctico, también llamado ácido 2-hidroxiopropanoico, es un ácido orgánico, de origen natural, formado por los grupos funcionales alcohol y carboxilo, cuya fórmula molecular es C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, y tiene una masa molar de 90.08 g/mol. Fue aislado por primera vez por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele, en el año 1780 [23] [24]. En cuanto a su peligrosidad es catalogado como una sustancia corrosiva, sin embargo, no se identifica como cancerígeno, ni presenta un riesgo toxicológico (para más detalles consultar Anexo 1).

**Figura 5.**

*Estructuras isoméricas del ácido láctico.*



**Nota.** La estructura fue realizada en el software ChemDraw.

Según se puede apreciar en la Figura 5, el ácido láctico presenta un carbono asimétrico esto implica que se presenta una actividad óptica. De modo que existen dos isómeros ópticos, los cuales son: el D(-) láctico y el L(+) láctico; también se puede presentar una forma racémica, constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-), la cual se reconoce como DL.

De estos dos isómeros, se prefiere la producción del L(+), ya que esta es la forma que es metabolizada por el cuerpo humano, no obstante, el isómero D(-) es utilizado en otros sectores industriales. Esto es relevante, ya que es un compuesto *commodity* muy importante, debido a que se utiliza en la industria química, farmacéutica, alimenticia y en los últimos años se ha estudiado su uso como materia prima o precursor para la producción de plástico biodegradable, específicamente PLA, que significa ácido poliláctico, el cual es un polímero biodegradable, con un uso potencial en la industria y la medicina [25].

Detallando un poco más el uso del ácido láctico, en la industria farmacéutica se utiliza como un electrolito y como fuente de minerales relevantes. En la industria cosmética, actúa como un *buffer*, tiene propiedades antimicrobianas y también es un rejuvenecedor de la piel. En la industria química se utiliza como agente limpiador, neutralizante y solvente. En la industria alimenticia, que es donde tiene una mayor aplicación, se emplea como antimicrobiano, acidulante y preservante. Su presencia se puede apreciar en los productos procesados, como por ejemplo productos de panadería, sopas, lácteos, cerveza, mermeladas, salsas, entre muchos otros productos [24].

La demanda de ácido láctico ha crecido año tras año, y actualmente teniendo una cifra superior a las 200000 toneladas métricas al año en todo el mundo [26]; de esta cantidad, aproximadamente el 85% se emplea en la industria alimenticia y el 15% en las industrias restantes [27]. Las empresas colombianas importan ácido láctico de diferentes países,

especialmente Brasil, Bélgica, Francia e India. Para el año 2020, se importaron más de 100 toneladas de este compuesto y se compró por un valor superior a los 500000000 COP [28].

La producción de ácido láctico se puede realizar de dos maneras. La primera de ellas es por ruta química, la cual implica una reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico para producir lactonitrilo. Este es un compuesto que puede ser hidrolizado para obtener ácido láctico [29] y la otra es por vía bioquímica o biotransformación, que consiste principalmente en una fermentación láctica.

La ruta química tiene una desventaja, debido a que el ácido láctico obtenido es una mezcla de los dos isómeros D(-) y L(+) de ácido láctico. Es por este motivo que la producción química, solamente implica un 10% de la producción global de ácido láctico. Mientras que el otro 90% se obtiene mediante procesos bioquímicos y biotecnológicos como lo es, la fermentación [30].

#### 1.4.1. Propiedades fisicoquímicas del Ácido Láctico

El ácido láctico es el ácido hidroxicarboxílico más simple. Algunas propiedades fisicoquímicas se muestran en detalle en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

*Propiedades fisicoquímicas del Ácido Láctico*

Propiedad	Valor
Densidad a 20 °C	1249 kg/m <sup>3</sup>
Punto de ebullición	120 - 140 °C a presión atmosférica
Índice de refracción a 20 °C	1.4392
Color	Líquido inodoro, de incoloro a ligeramente amarillo claro.
Olor	Inodoro, olor débil.
Solubilidad	Miscible en agua, miscible en etanol, éter dietílico y otros disolventes miscibles con agua.

*Nota.* Las propiedades dependen de la pureza del ácido láctico. Los valores de la tabla corresponden a una solución con una pureza del 95%.

Tomado de: Centro Nacional de Información Biotecnológica. Resumen de compuestos de PubChem para CID 612, ácido láctico. 2023.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-Acid>. [31].

#### 1.4.2. Clasificación del Ácido Láctico

- **Ácido Láctico de grado crudo o técnico:** Rangos entre 20 y 80% de pureza, suele ser muy utilizado en la industria de cueros y textiles [32].

- **Ácido Láctico de grado reactivo:** Rangos entre 80 y 95% de pureza. Debido a su alta pureza es utilizado en aplicaciones del laboratorio, industriales y de fabricación como aditivo, agentes humectantes o acidificantes [33].
- **Ácido Láctico de grado plástico:** Debe ser de alta pureza entre 90 y 97% y transparente, generalmente se refina del grado comercial para la producción de PLA [34].
- **Ácido Láctico de grado farmacéutico:** Debe presentar una pureza del 88% o superior, se utiliza en procedimientos de hemofiltración y diálisis peritoneal para pacientes con insuficiencia renal, para tratamientos de trastorno de piel seca, anemia, hipertensión y osteoporosis [25].
- **Ácido Láctico de grado alimenticio:** Debe tener una pureza del 80% y se encuentra presente en productos como la leche y sus derivados, así como en encurtidos, granos fermentados, la cerveza y la carne [25].

### 1.5. Pretratamientos de biomasa lignocelulósica

Como se ha mencionado con anterioridad, la fuente de carbono para el medio de cultivo en la fermentación láctica debe ser un monosacárido, por ejemplo, la glucosa. El afrecho de malta está compuesto mayoritariamente por celulosa, lignina y hemicelulosa, estas últimas deben ser removidas para poder aprovechar la glucosa contenida en la celulosa.

Por esta razón, no se puede utilizar directamente el afrecho de malta recién se obtiene del proceso de maceración y es necesario un proceso de adecuación, antes de que se pueda emplear para realizar la fermentación.

Debido a la dificultad de separar los componentes del material lignocelulósico, se necesita aplicar métodos de fraccionamiento o métodos de hidrólisis, que básicamente solubilizan los polisacáridos retirando la lignina, la hemicelulosa y rompiendo los enlaces  $\beta$  o enlaces glucosídicos de la celulosa, permitiendo obtener únicamente glucosa potencialmente aprovechable para un medio de cultivo en una fermentación [14].

La hidrólisis es descrita como una reacción química que ocurre cuando un grupo neutrófilo como lo es el agua o el ion  $\text{OH}^-$ , ataca a un grupo electrófilo rompiendo sus enlaces y formando una nueva especie química [35].

Existen diferentes tipos de hidrólisis, las cuales dependen del componente que se adiciona para aumentar el rendimiento del proceso permitiendo el intercambio iónico de manera adecuada. Se presentan a continuación:

- **Hidrólisis ácida:** Técnica en la cual la sustancia que cataliza la reacción es un ácido, entre los más utilizados se encuentran el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

En esta, el ácido empleado generalmente se encuentra diluido, ya que puede ocasionar daños en la muestra [36]. Es un proceso aplicado para la producción de productos químicos de valor agregado a partir de biomasa lignocelulósica. No se usa mayormente a escala industrial, debido a que el uso de un ácido implica costos adicionales en protección anticorrosiva para los equipos [37].

- **Hidrólisis básica o alcalina:** En esta, la sustancia empleada para catalizar la reacción química es una base, generalmente hidróxidos, como hidróxido de sodio (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH). Se utilizan soluciones de una concentración considerablemente alta [38]. El proceso se realiza para la saponificación de ésteres, o reacciones de sustitución. Es mayormente utilizado industrialmente, puesto que presenta menores efectos corrosivos para los equipos empleados [39].
- **Hidrólisis con organosolvente:** La sustancia que se emplea para facilitar la reacción química es un solvente orgánico, entre los más utilizados se encuentra el etanol. El compuesto orgánico puede utilizarse en adición con una sustancia ácida o básica para mejorar el rendimiento. Es un procedimiento que se realiza para la deslignificación de muestras orgánicas, es decir, elimina el contenido de lignina en muestras orgánicas. Se realiza mayormente a escala laboratorio, sin embargo, su rendimiento es bastante elevado según se muestra en estudios comparativos [40].
- **Hidrólisis con exposición de vapor:** El tratamiento se ve catalizado por vapor de agua, el cual puede ser de alta o de baja presión, según se requiera. El agua empleada puede contener sustancias ácidas o básicas para favorecer la reacción, sin embargo, no es muy común. Se emplea como un tratamiento térmico para el acondicionamiento de materiales. No es un procedimiento realizado ampliamente, debido a sus altos costos operativos [41].
- **Hidrólisis enzimática:** La sustancia utilizada es un catalizador biológico, también conocido como enzima, que posee la función específica de romper de enlaces, facilitando la extracción. La enzima utilizada debe ser totalmente pura y el medio preparado debe tener un pH fijo para aumentar el rendimiento enzimático [42]. Se emplea como un método de sacarificación de biomasa, como mecanismo previo a una fermentación. Se emplea a escala laboratorio y relativamente a escala industrial, debido a que presenta rendimientos altos y no requiere de condiciones extremas [43].

## 1.6. Fermentación Láctica

La fermentación láctica puede ser realizada por hongos, los mayoritariamente empleados son mohos y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas*, *Saccharomyces* y

*Kluiveromyces* [44]. Su uso es beneficioso puesto que estos microorganismos no requieren fuente de nitrógeno orgánico para su crecimiento, además, tienen la habilidad de producir directamente grandes cantidades de L(+) ácido láctico y los procesos de separación y purificación son relativamente sencillos [45]. Asimismo, la fermentación fúngica tiene la ventaja de requerir un medio simple para producir ácido láctico, pero también tiene requerimientos elevados de aireación [25].

No obstante, el estudio de las bacterias es más amplio, por tanto se presenta la categorización de LAB (*Lactic acid bacteria*) las cuales deben ser microorganismos termófilos, Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles, forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares y pueden ser homofermentativos o heterofermentativos (según la cantidad y la presencia del ácido), que fermenten rápida y completamente los sustratos baratos, con adición mínima de nutrientes nitrogenados, que crezcan en valores bajos de pH, que presenten poca producción de biomasa y una despreciable cantidad de subproductos [25] [46]. El rango de temperatura óptimo para su crecimiento es entre 20 y 40°C y tienen la capacidad de tolerar un pH inferior a 5 (por lo tanto, se les puede considerar acidófilas). Los géneros de bacterias que componen la lista de las LAB, son: *Lactobacillus (Lb)*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc (Leu)*, *Pediococcus (Pd)*, *Streptococcus (Str)*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus (Lc)*, *Vagococcus*, *Enterococcus (Ent)*, *Aerococcus* y *Weissella* [30].

La mayoría de las bacterias ácido-lácticas, producen únicamente una forma isomérica del ácido láctico. Por ejemplo, las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*; *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus* producen únicamente isómeros L(+), mientras las especies del género *Leuconostoc* producen únicamente isómeros D (-). De igual manera, algunos géneros producen formas racémicas DL, como por ejemplo el caso de los *Lactobacillus* [47].

### **1.6.1. *Lactobacillus delbrueckii***

Uno de los microorganismos mayormente utilizados para la producción de ácido láctico por vía fermentativa es el *Lactobacillus delbrueckii*, una bacteria Gram positiva, la cual lo hace a través de la vía de Embden-Meyerhof. Esto se debe a que produce únicamente isómeros L(+), consume eficientemente glucosa y es un microorganismo termófilo con temperatura óptima de crecimiento 41.5°C, lo cual reduce costes de enfriamiento y esterilización, así como los riesgos de contaminación microbiológica en el fermentador. De igual manera, es un microorganismo que crece bien a un pH entre 5.5 y 6.8 [25].

Este microorganismo pertenece al reino bacteria, su división es Firmicutes, de la clase Bacilli, cuyo orden es *Lactobacillales*, de la subespecie *Bulgaricus*, pertenece al género *Lactobacillus*, su especie es *Lactobacillus delbrueckii*, y pertenece a la familia *Lactobacillaceae* [48].

**Figura 6.**

*Lactobacillus delbrueckii*.



**Nota.** Cultivo con varios especímenes de *Lactobacillus delbrueckii*, observados con microscopio.

Tomado de: Y. Shao, S. Gao, H. Guo and H., “Influence of Culture Conditions and Preconditioning on Survival of *Lactobacillus delbrueckii* Subspecies *Bulgaricus* ND02 During Lyophilization”. American Dairy Science Association, 2014. Accessed: Apr. 08, 2023 [49].

Esta bacteria se utiliza en otros procesos, principalmente en la industria alimenticia, mayoritariamente en la manufactura de productos lácteos como queso y yogur, pues para este último ayuda a contribuir con el sabor [50].

Aunque este microorganismo se emplea en mayor medida para la producción de ácido láctico, también es capaz de producir otros compuestos químicos de interés, como por ejemplo acetaldehído, acetona, acetoína y diacetilo, pero en bajas concentraciones [51].

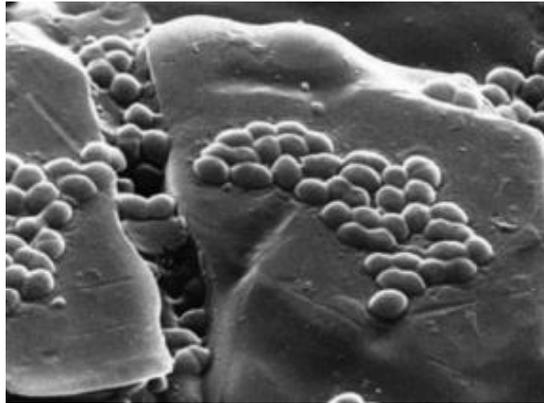
### **1.6.2. *Streptococcus thermophilus***

De igual manera, *Streptococcus thermophilus* pertenece al grupo de las bacterias lácticas y suele utilizarse en conjunto con *Lactobacillus*, como cultivo iniciador en diferentes procesos de producción. Este microorganismo pertenece al dominio bacteria, su división o filo es Firmicutes, de la clase Bacilli, cuyo orden es *Lactobacillales*, pertenece a la familia *Lactobacillaceae*, del género *Streptococcus*, su especie es *Streptococcus thermophilus* y es aislado generalmente en ambientes lácteos [52].

*Streptococcus thermophilus* es una bacteria Gram positiva de forma esférica a ovoide, anaeróbica facultativa. La temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria es de 40-45 °C, la mínima de 20-25°C y la máxima de 47-50 °C. El pH óptimo de crecimiento es de 6.5-7. Fermenta azúcares, como la lactosa, la fructosa, la sacarosa y la glucosa [53][54]. *Streptococcus thermophilus* puede producir el isómero L(+), al igual que la mezcla racémica DL, siendo el isómero L(+) producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de Embden-Meyerhof [55].

**Figura 7.**

*Streptococcus thermophilus*.



**Nota.** Cultivo con varios especímenes de *Streptococcus thermophilus*, observados con microscopio.

Tomado de: J. Harnett, G. Davey, A. Patrick, C. Caddick, and L. Pearce, “Lactic Acid Bacteria *Streptococcus thermophilus*,” *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, pp. 143–148, Jan. 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00268-5.

Accessed: May. 31, 2023 [54]

Los microorganismos descritos anteriormente, además de su capacidad para la producción de ácido láctico, son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, pues tienen un papel fundamental en el cultivo de elaboración de productos fermentados como el yogur, quesos, mantequilla, entre otros, y se caracterizan por ser microorganismos probióticos, que se utilizan para mejorar la salud intestinal y estimular el sistema inmunológico [55].

En adición, se suelen realizar consorcios microbianos que contienen tanto *Streptococcus thermophilus* como *Lactobacillus delbrueckii*, debido a que comparten la característica de promover su crecimiento mutuamente [54].

## 1.7. Purificación del Ácido Láctico

Una vez el proceso de fermentación concluye, es necesario realizar una purificación ya que el ácido láctico aún contiene numerosas impurezas orgánicas e inorgánicas provenientes de las sales empleadas en el medio de cultivo y posibles subproductos, los cuales imposibilitan una aplicación directa del ácido láctico debido a su baja pureza [56]. Existen diversas técnicas para purificar el ácido láctico, las cuales se presentan a continuación:

- **Precipitación:** Es uno de los métodos mayormente utilizados a escala laboratorio y a escala industrial. Consiste en añadir carbonato de calcio al caldo de fermentación regulando el pH entre 5 y 6, obteniendo lactato de calcio. Posteriormente, se utiliza ácido sulfúrico para precipitar el sulfato de calcio formando un yeso, del cual luego de ser filtrado, se obtiene el ácido láctico libre y puro. Se han estudiado diferentes sustancias para utilizar en el proceso de precipitación, como hidróxido de amonio o hidróxido de sodio, para mejorar el rendimiento, no obstante, el proceso no presenta mayor variación [56].
- **Destilación:** La destilación a grandes rasgos es una técnica de separación, que utiliza la diferencia de volatilidad de diferentes sustancias para ebullición la más volátil. La destilación del ácido láctico se puede realizar a presión atmosférica generando buenos rendimientos, teniendo en cuenta que la temperatura de ebullición del ácido láctico es de aproximadamente 120°C, es un producto que se obtiene por los fondos. Pese a esto, no es la técnica que se aplica mayormente a escala industrial [56].
- **Extracción líquido-líquido:** Este método se considera como una mejora al proceso de precipitación y consiste en que uno o más solutos son removidos de una mezcla líquida. Esta mezcla presenta una diferencia en la solubilidad al adicionar un solvente, formándose dos fases en la que el soluto o solutos son más afines al solvente. Algunos factores que se tienen en cuenta para la elección del solvente son: costo, selectividad, estabilidad química, afinidad con el ácido láctico y nula afinidad con el agua, no tóxico o viscoso y que se pueda recuperar una vez separados los analitos. Entre los solventes mayoritariamente empleados, se encuentran: éter etílico, acetato de etilo, hexanol, alcohol isoamílico, octanol y furfural. Siendo el acetato de etilo el que se utiliza con más frecuencia, por su afinidad y la fácil separación con el ácido láctico [56].
- **Procesos con membranas:** Consiste en la transferencia de solutos a través de una barrera física permeable que separa dos fases, restringiendo el paso de componentes de una fase a otra. Las membranas son materiales que pueden ser homogéneos o heterogéneos, simétricos o asimétricos, sólidos o líquidos, cargados eléctricamente o neutros. Entre los factores para tener en cuenta, están todo lo relacionado con el transporte de moléculas si se da por fenómenos de

convección o difusión y si puede ser causado por diferenciales originados por campos eléctricos o por diferencias en concentración, presión o temperatura. Dependiendo del tamaño de los poros de las membranas, se puede realizar una distinción entre microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración. Es una técnica que no se realiza ampliamente debido a los altos costos de las membranas [56].

## 2. HIDRÓLISIS DE AFRECHO DE MALTA

Se utilizó afrecho de malta proveniente de la cervecería artesanal Terra Cruz, ubicada en la ciudad de Bogotá. La muestra de afrecho de malta era una mezcla de malta *Pale Ale* y malta caramelo, las cuales son los tipos de malta mayormente utilizadas para la producción de cerveza.

En la Tabla 2, se presenta la caracterización del afrecho de malta utilizado en el proceso realizado en este trabajo, en la que se aprecian los porcentajes de hemicelulosa, celulosa, lignina, cenizas; el porcentaje restante corresponde a proteínas y lípidos. La caracterización fue realizada por el laboratorio de análisis químico Agrilab® (para más detalles consultar Anexo 2).

**Tabla 2.**

*Caracterización fisicoquímica del afrecho de malta*

<b>Componente</b>	<b>Porcentaje en peso (%)</b>
Lignina	7.97
Celulosa	15.7
Hemicelulosa	21.6
Cenizas	2.75
Humedad	5.95

*Nota.* La caracterización fue realizada conforme a la normatividad establecida.

Estos valores coinciden con algunas caracterizaciones reportadas en literatura [57] [58]. Es importante destacar, que en algunas ocasiones y dependiendo del tipo de malta que se analice, es posible encontrar un pequeño porcentaje de compuestos fenólicos.

En primer lugar, se realiza un secado del afrecho de malta, debido a que en el proceso de macerado es mezclado con agua para extraer azúcares para la fermentación alcohólica propia del proceso de producción de cerveza, así que, es necesario eliminar el contenido de humedad para poder realizar un correcto aprovechamiento y para evitar que el afrecho se descomponga durante su almacenamiento.

El afrecho se dispuso en bandejas metálicas y se secó en los hornos de convección forzada, en los laboratorios de la Universidad de América a una temperatura de 70°C durante 5 días, posteriormente se retiró y se almacenó.

**Figura 8.**

*Montaje del secado del afrecho de malta.*



*Nota.* Horno de convección forzada.

## 2.1. Hidrólisis ácida

La primera hidrólisis que se llevó a cabo fue una de tipo ácida, para eliminar el contenido de lignina y de hemicelulosa presente en la muestra obtenida del afrecho de malta.

La hidrólisis ácida se realizó con un volumen total de 700 mL, a las siguientes condiciones reportadas en [10]: 30% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M, 2% de afrecho de malta y lo restante, agua destilada. Lo anterior, se coloca en un Baño María a  $70^\circ\text{C}$  y mediante un agitador mecánico con hélices de oreja de elefante, se agitó a 290 rpm durante una hora. El montaje se muestra en la Figura 9.

**Figura 9.**

*Montaje hidrólisis ácida.*



*Nota.* En la imagen de la izquierda se aprecia el montaje completo y en la imagen de la derecha se aprecia a detalle el contenido del *beaker*.

Finalizado el tiempo, se retiró del baño María y se dejó enfriar durante 10 minutos. Posteriormente, la fase líquida se separó de la fase sólida por medio de una filtración al vacío. El montaje consistió en un Erlenmeyer de 500 mL con desprendimiento lateral, un embudo

Büchner, membrana de filtración cualitativa con un tamaño de poro de 8  $\mu\text{m}$  y una bomba de vacío. El contenido del hidrolizado se vertió lentamente sobre la membrana de filtro, colocado con anterioridad en el embudo. El papel filtro utilizado se pesó previamente a cada filtración, en una balanza analítica.

**Figura 10.**

*Montaje filtración al vacío.*



*Nota.* Se utilizaron diferentes bombas de vacío, no obstante, el montaje fue el mismo.

La fracción líquida se almacenó en frascos Schott bajo refrigeración, aproximadamente a  $0^{\circ}\text{C}$ , para determinar la cantidad de azúcares reductores; mientras que la fracción sólida fue lavada con agua desionizada hasta que se obtuvo con un pH de 7, eliminando de la muestra de afrecho hidrolizado cualquier contenido de ácido remanente.

La fracción sólida con el papel filtro utilizado, se secó en un horno de convección forzada a  $50^{\circ}\text{C}$  durante un día. Seguido a esto, el afrecho seco se almacenó para su uso posterior y el papel filtro seco se pesó en una balanza analítica.

Este procedimiento se realizó nueve veces, debido a que era necesario contar con 80 g de fracción sólida hidrolizada para realizar el siguiente procedimiento.

### **2.1.1. Cuantificación de azúcares reductores**

Se realizó la determinación de azúcares reductores por el método del 3,5-dinitrosalicílico, también conocido como DNS, propuesto por Miller [59]. En este procedimiento, se prepara en un tubo de ensayo una solución denominada como blanco, la cual contiene 500  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS y 500  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. Para la preparación de las muestras, se disponen en tubos de ensayo 500  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS, 350  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 150  $\mu\text{L}$  de muestra. Todos los tubos de ensayo se introducen en un *beaker* con agua ebullendo, durante cinco minutos en los cuales el DNS reacciona con los azúcares reductores generando un cambio de color; cuya

presencia se detecta en la lectura de la absorbancia en el rango del espectro a una longitud de onda de 540 nm, la intensidad del color está relacionada con la concentración de azúcares reductores en la muestra.

**Figura 11.**

*Montaje Baño María en método DNS.*



*Nota.* Se deben disponer los tubos de ensayo, cuando el agua comience a cambiar de fase.

Transcurridos los cinco minutos, se retiran los tubos de ensayo y se enfrían en un baño con hielo. Cuando los tubos estén fríos, se agregan 5 mL de agua desionizada a cada tubo de ensayo, se agitan vigorosamente y se dejan reposar durante 15 minutos.

Seguidamente, se realiza la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro, para determinar la concentración de azúcares reductores de la muestra medida a partir de la ley de Beer-Lambert [59]. La ley de Beer-Lambert es generalmente válida en el rango lineal de absorbancia, normalmente hasta alrededor de 2.0 unidades de absorbancia. Valores mayores a 2.0 pueden producir desviaciones debido a las limitaciones de la ley, principalmente, la no linealidad en la relación entre la absorbancia y la concentración; es aconsejable entonces, para que las mediciones sean más precisas y fiables, tomar rangos de 0.1 a 1.5, si las muestras superan estos es necesario diluir la muestra [60].

Para poder determinar la relación entre la absorbancia de la luz en la muestra a una longitud de onda de 540 nm y la concentración de azúcares reductores de la misma, es necesario realizar una curva de calibración de glucosa [59].

En primer lugar, se preparó una solución de 6 g/L de glucosa y se prepararon ocho soluciones patrón diluyendo en agua desionizada la solución de glucosa según se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.**

*Muestras empleadas en la curva de calibración de glucosa*

Muestra	Glucosa (mL)	Agua desionizada (mL)	Concentración (g/L)
1	9	0	6.0
2	7	2	4.7
3	6	3	4.0
4	5	4	3.3
5	4	5	2.7
6	3	6	2.0
7	2	7	1.3
8	0	9	0

*Nota.* Es importante conocer el valor de la concentración de cada muestra para poder realizar de manera correcta la regresión.

A todas estas soluciones se les realiza la prueba de DNS y se grafica la absorbancia en el eje de las ordenadas contra la concentración en el eje de las abscisas, obteniendo así, la curva de calibración.

A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, es posible determinar la concentración de azúcares reductores con base en la absorbancia medida a 540 nm, según el método descrito anteriormente.

## 2.2. Hidrólisis enzimática

La fracción sólida obtenida de la hidrólisis ácida es un afrecho de malta con un alto contenido de celulosa y contenido despreciable de lignina y hemicelulosa. Con el fin de extraer azúcares fermentables que se puedan emplear como fuente de carbono en una fermentación láctica, se realizó una hidrólisis enzimática con el propósito de romper los enlaces  $\beta$ -1,4 de la celulosa, obteniendo azúcares fermentables en una mayor concentración.

Para ello se empleó el complejo de enzima celulasa FoodPro® CBL, obtenido de la empresa Merquiand SAS y se siguió la metodología reportada por Alvarado [61].

En un Baño María a 60°C se dispusieron dos *beakers* de 1000 mL, en cada uno se añadieron 400 mL de una solución *buffer* de citrato preparada con citrato de sodio ácido cítrico, cuyo pH

fue de 4. Seguidamente, se adicionaron 40 g del afrecho de malta proveniente de la hidrólisis ácida y 4 mL de la enzima celulasa FoodPro® CBL. Las condiciones de pH y temperatura se fijaron según la ficha técnica de la enzima para favorecer el rendimiento de esta (para más detalle ver Anexo 3).

En el montaje se implementó un motor de agitación mecánica con hélices de oreja de elefante, se agitó a 290 rpm durante cinco horas, así como se muestra en la Figura 12.

**Figura 12.**

*Montaje hidrólisis enzimática.*



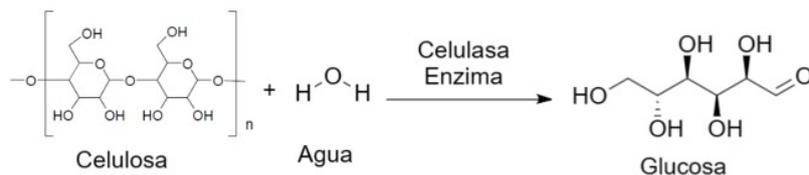
**Nota.** Se garantizó un comportamiento igual en la frecuencia de agitación para no modificar las condiciones de operación del duplicado.

Se tomaron muestras de 2 mL de ambos *beakers* cada hora, así como, una muestra inicial y final para realizar la cuantificación de la actividad enzimática, las cuales se almacenaron en tubos Eppendorf; y al finalizar el tiempo de hidrólisis, se realizó una filtración al vacío empleando el mismo montaje de la Figura 10, con el fin de separar la fracción sólida de la fracción líquida. La fracción sólida se eliminó y el líquido se almacenó bajo refrigeración aproximadamente a 0°C para su uso posterior.

Durante este proceso, la reacción química que se lleva a cabo está presente en la Figura 13, la reacción consiste en que las enzimas celulíticas, celulasas, catalizan la ruptura de la celulosa en unidades de glucosa.

**Figura 13.**

*Reacción química de la hidrólisis enzimática.*



**Nota.** La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la ruptura de las moléculas de celulosa en azúcares más simples, la presente ecuación química es la forma simplificada del proceso.

Previo a la cuantificación de la actividad enzimática, se realizó la determinación de azúcares reductores por medio de la técnica del DNS a la fracción líquida del hidrolizado.

### 2.2.1. Cuantificación de actividad enzimática

Para la cuantificación de actividad enzimática se siguió el procedimiento realizado por Suesca [62].

En primera instancia, todas las muestras de la hidrólisis enzimática recogidas en los tubos Eppendorf se llevaron a centrifugar, a 7000 rpm durante 10 minutos, en seguida se recogió el sobrenadante en otro tubo Eppendorf y el precipitado se eliminó.

Paralelamente, se prepararon 100 mL de una solución 0.1 M de ácido cítrico monohidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) y 100 mL de una solución 0.2 M de fosfato dibásico de potasio ( $K_2HPO_4$ ), que posteriormente se mezclaron para formar una solución *buffer* de pH 5.0. De esta solución amortiguadora, se reservaron 100 mL en un *beaker*, se denominó como *Buffer* citrato-fosfato, mientras que con los 100 mL restantes se preparó una solución con Avicel al 2% y se denominó como *Buffer* citrato-fosfato-Avicel.

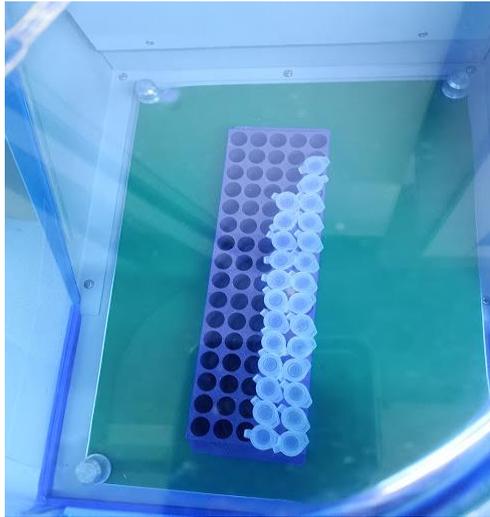
Con posterioridad, se procedió a la preparación de los blancos. Para el primero, se adicionó 1 mL de *buffer* citrato-fosfato a un tubo Eppendorf. Para el segundo, se adicionó 1 mL de *buffer* citrato-fosfato-Avicel a un tubo Eppendorf.

De igual manera, para cada muestra se requiere preparar un blanco que contenga 0.5 mL de muestra del hidrolizado y 0.5 mL de *buffer* citrato-fosfato. Finalmente, para la preparación de las muestras se agregaron 0.5 mL de muestra de hidrolizado y 0.5 mL de *buffer* citrato-fosfato-Avicel.

Todas las muestras, incluyendo los blancos, se llevaron a incubación a 50°C durante 60 minutos en una gradilla para tubos Eppendorf.

**Figura 14.**

*Tubos Eppendorf en incubación.*



**Nota.** La incubación se realizó sin agitación.

Pasado este tiempo, se detuvo la reacción de crecimiento enzimático llevando todos los tubos Eppendorf a un baño termostático a 90°C, durante 10 minutos.

**Figura 15.**

*Tubos Eppendorf en baño de agua.*



**Nota.** Los tubos deben asegurarse con firmeza a la gradilla garantizando que el agua cubra la muestra y deben taparse muy bien para evitar que se puedan destapar.

Finalmente, se realizó el procedimiento de determinación de azúcares reductores por el método DNS descrito anteriormente.

Conociendo la concentración de azúcares se puede calcular la actividad enzimática de la celulasa (U). Una unidad de actividad enzimática (1 U), se define como 1  $\mu\text{mol}$  de azúcares

reductores equivalentes a glucosa obtenidos por minuto [62]. El cálculo se realiza empleando la ecuación 1:

$$U = \frac{(C_m - C_b) \cdot 10^6}{MM \cdot t_R} \cdot D \quad (1)$$

Donde,

$C_m$  es la concentración de azúcar en la muestra en g/L

$C_b$  es la concentración de azúcar en el blanco en g/L

$MM$  es la masa molecular del azúcar patrón en g/mol

$t_R$  es el tiempo de reacción en minutos

$D$  es la dilución

$U$  es actividad enzimática en U/L

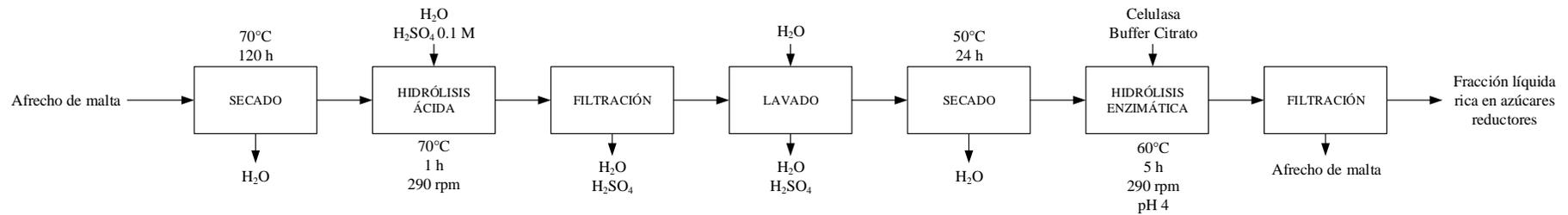
Es importante mencionar que el azúcar patrón es glucosa, cuya masa molecular es de 180 g/mol; que el tiempo de reacción fue de 60 minutos y que no se llevó a cabo dilución, por lo cual el factor de dilución es 1.

### 2.3. Diagrama de Flujo de Bloques

En la Figura 16 se presenta el Diagrama de Flujo de Bloques (BFD) para la Hidrólisis del afrecho de malta, consta de: secado, hidrólisis ácida, filtración, lavado, secado, hidrólisis enzimática y filtración. Adicionalmente, se especifica la temperatura de trabajo.

**Figura 16.**

*Diagrama de Flujo de Bloques del proceso de hidrólisis del afrecho de malta.*



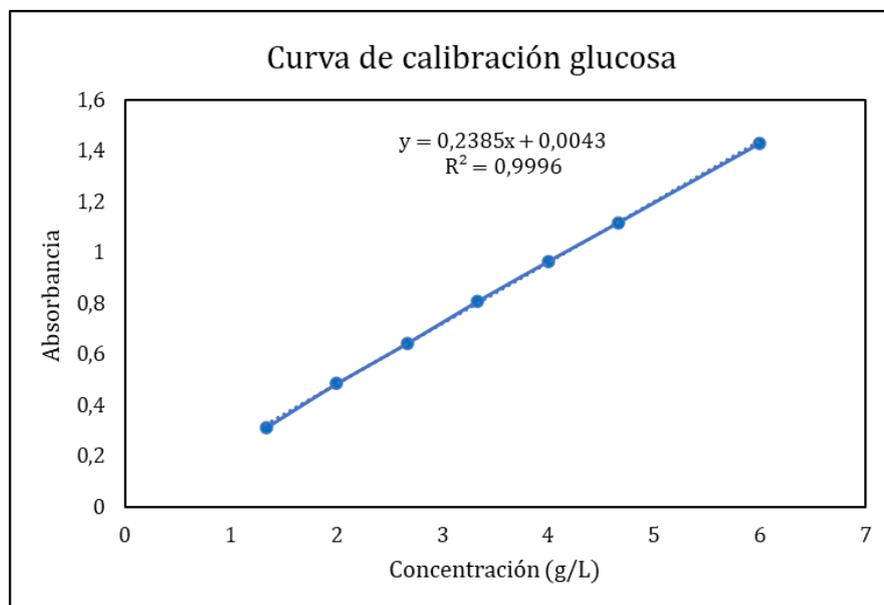
**Nota.** Se presenta el BFD del proceso descrito anteriormente, la Hidrólisis del afrecho de malta con las operaciones correspondientes.

## 2.4. Resultados y análisis

A todas las muestras reportadas en la Tabla 3, se les realiza la prueba de determinación de azúcares reductores descrita anteriormente, y se relacionó la absorbancia medida con la concentración, obteniendo la curva de calibración presentada en la Figura 17.

**Figura 17.**

*Curva de calibración de azúcares reductores.*



**Nota.** Los valores de absorbancia deben ser menores a 1.500, para garantizar una relación lineal entre absorbancia y concentración.

A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, es posible determinar la concentración de azúcares reductores con base en la absorbancia medida a 540 nm, según el método descrito anteriormente.

Así pues, al finalizar la hidrólisis ácida se cuantificó la concentración de azúcares reductores mediante el método de Miller, los resultados se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4.***Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis ácida*

<b>Hidrólisis</b>	<b>Absorbancia 540 nm</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
1	0.503	2.091
2	0.586	2.439
3	0.522	2.171
4	0.421	1.747
5	0.409	1.697
6	0.459	1.906
7	0.408	1.693
8	0.437	1.814
9	0.451	1.873

*Nota.* La cuantificación se realizó para conocer el resultado de la hidrólisis enzimática, sin embargo, no se empleó la fracción líquida de la hidrólisis ácida en ningún otro procedimiento.

Se puede apreciar que la hidrólisis ácida del afrecho de malta permite la obtención de azúcares reductores susceptibles al proceso de fermentación, puesto que la fracción líquida puede ser empleada como fuente de carbono en una fermentación líquida, no obstante, la concentración de glucosa es relativamente baja. Esto se debe a que la hidrólisis ácida elimina el contenido de lignina y hemicelulosa del afrecho, sin embargo, no genera un alto rompimiento de los enlaces glucosídicos de la celulosa, por lo cual no se obtiene una cantidad significativamente alta de azúcares reductores para realizar una fermentación láctica.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó una hidrólisis enzimática con la fracción sólida de la hidrólisis ácida siguiendo la metodología descrita. La concentración de azúcares reductores extraídos en este procedimiento se cuantificó mediante el método de Miller, y los resultados se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5.**

*Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis enzimática*

<b>Hidrólisis</b>	<b>Absorbancia 540 nm</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
1	1.487	6.216
2	1.429	5.973

*Nota.* La tabla presenta la concentración de azúcares reductores totales obtenidos en la hidrólisis enzimática.

Claramente se evidencia un aumento en la concentración de glucosa, posibilitando el uso del líquido hidrolizado como fuente de carbono y como parte del medio de cultivo en la fermentación láctica. De igual manera, se aprecia que la técnica adecuada para la extracción de azúcares reductores es una hidrólisis ácida, seguida de una hidrólisis enzimática.

En la cuantificación de actividad enzimática, luego de realizar todo el proceso descrito en la sección anterior, se determinó la concentración de glucosa según el método de DNS. Los valores para todos los blancos y todas las muestras tomadas cada hora en el primer experimento se presentan en la Tabla 6, mientras que los resultados para el segundo experimento se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 6.**

*Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la cuantificación de actividad enzimática en el primer experimento.*

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia 540 nm</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Blanco Buffer citrato- fosfato	0.007	0.011
Blanco Buffer citrato- fosfato Avicel	0.015	0.045
Blanco de muestra a 0 h	0.064	0.250
Blanco de muestra a 1 h	0.514	2.137
Blanco de muestra a 2 h	0.632	2.632
Blanco de muestra a 3 h	0.694	2.892
Blanco de muestra a 4 h	0.788	3.286
Blanco de muestra a 5 h	1.134	4.737
Muestra a 0 h	0.147	0.598
Muestra a 1 h	0.622	2.590
Muestra a 2 h	0.764	3.185
Muestra a 3 h	0.844	3.521
Muestra a 4 h	0.958	3.999
Muestra a 5 h	1.336	5.584

**Nota.** La tabla presenta los resultados de la prueba con DNS para el primer experimento en la cuantificación de actividad enzimática.

**Tabla 7.**

*Cuantificación de azúcares reductores obtenidos en la cuantificación de actividad enzimática en el segundo experimento.*

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia 540 nm</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Blanco Buffer citrato- fosfato	0.007	0.011
Blanco Buffer citrato- fosfato Avicel	0.015	0.045
Blanco de muestra a 0 h	0.062	0.242
Blanco de muestra a 1 h	0.472	1.961
Blanco de muestra a 2 h	0.547	2.275
Blanco de muestra a 3 h	0.672	2.800
Blanco de muestra a 4 h	0.87	3.630
Blanco de muestra a 5 h	0.993	4.145
Muestra a 0 h	0.151	0.615
Muestra a 1 h	0.588	2.447
Muestra a 2 h	0.689	2.871
Muestra a 3 h	0.832	3.470
Muestra a 4 h	1.046	4.368
Muestra a 5 h	1.193	4.984

*Nota.* La tabla presenta los resultados de la prueba con DNS para el segundo experimento en la cuantificación de actividad enzimática.

Se aprecia que la cantidad de azúcares obtenidos se incrementa con el paso del tiempo en el proceso de la hidrólisis enzimática, esto es un resultado esperado, puesto que la reacción de

rompimiento de los enlaces glucosídicos cuanto más duradera es, permite la obtención de una mayor concentración de glucosa.

Teniendo en cuenta estos resultados y las consideraciones respecto al factor de dilución, la masa molecular y el tiempo de reacción, se procede a realizar el cálculo de la actividad enzimática siguiendo la ecuación 1. De modo que los resultados de la cuantificación de la actividad enzimática se presentan en la Tabla 8 para el primer experimento y en la Tabla 9 para el segundo.

**Tabla 8.**

*Cuantificación de actividad enzimática en el primer experimento.*

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad enzimática (U/L)</b>
0	32.223
1	41.929
2	51.246
3	58.234
4	65.999
5	78.422

*Nota.* La tabla presenta la actividad enzimática en el primer experimento.

**Tabla 9.**

*Cuantificación de actividad enzimática en el segundo experimento.*

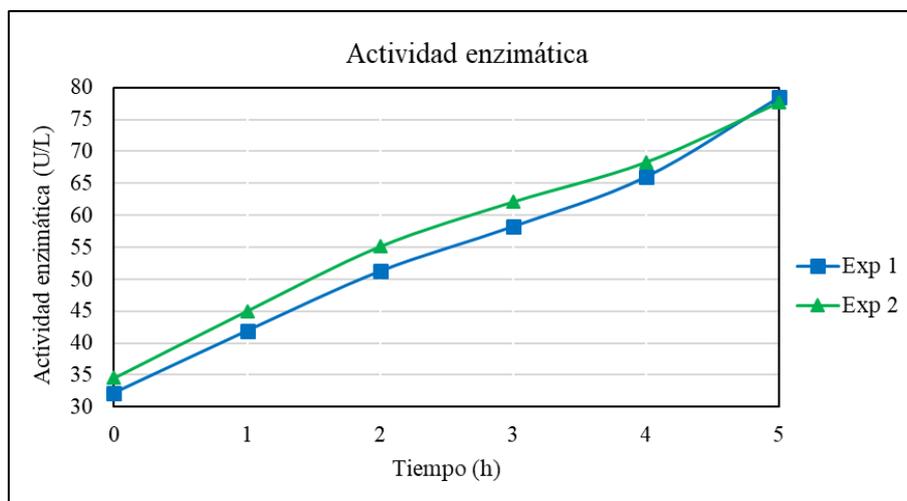
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Actividad enzimática (U/L)</b>
0	34.552
1	45.035
2	55.129
3	62.117
4	68.328
5	77.646

*Nota.* La tabla presenta la actividad enzimática en el segundo experimento.

Con el fin de apreciar la diferencia entre los dos experimentos realizados y el seguimiento de la actividad enzimática se realiza la gráfica que se aprecia en la Figura 18.

**Figura 18.**

Actividad enzimática en el proceso de hidrólisis enzimática.



*Nota.* La figura muestra la actividad enzimática en los dos ensayos realizados.

Se evidencia que la actividad enzimática aumenta en las muestras cuya concentración de glucosa es mayor, de manera que la actividad enzimática aumenta en el tiempo de medición, lo cual permite que el rompimiento de los enlaces glucosídicos aumente, favoreciendo la obtención de azúcares reductores totales.

De igual manera, para determinar la diferencia entre los experimentos, se realizó el cálculo del error relativo con la ecuación 5. El valor medido corresponde al valor de la muestra y el valor real es el promedio de las muestras tomadas en el mismo tiempo. La máxima diferencia se encontró a las dos horas. Dado que el valor máximo fue de 3.65%, se determina que los datos son reproducibles y fiables. Todos los cálculos referentes al modelo matemático se detallan en el Anexo 4.

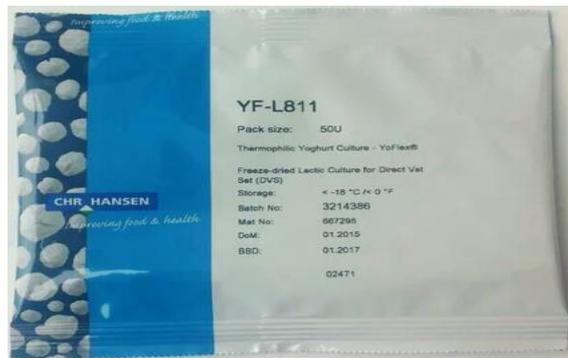
El tiempo de la hidrólisis es el adecuado para aprovechar al máximo la enzima, debido a que, si este tiempo fuera mayor, la actividad de la enzima comenzaría a disminuir, perjudicando el proceso de rompimiento de hidrólisis. En adición, se evidenció que la viscosidad del medio aumentó, por lo cual, en caso de que el tiempo de hidrólisis fuese mayor, se requiere de un aumento en las revoluciones de agitación, lo cual modifica las condiciones de operación.

### 3. FERMENTACIÓN LÁCTICA

El consorcio microbiano que se utilizó para realizar la fermentación láctica fue suministrado por la empresa CHR HANSEN, el cual contiene un cultivo de cepas mixtas de los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* de manera liofilizada y en presentación en forma de pellets.

**Figura 19.**

*Consortio microbiano de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus delbrueckii utilizados.*



*Nota.* Imagen de referencia.

Tomado de: BeerLab. Yogurt Culture YF-L811.

Accessed: Oct. 07, 2023. [Online]. Available:

<https://www.beerlab.co.za/products/yogurtcultureyf-1811> [63]

Este consorcio se almacenó en un congelador, según especificación, a una temperatura promedio de  $-14^{\circ}\text{C}$  para garantizar su calidad. Por lo tanto, fue necesario realizar la activación del microorganismo.

Para esto, se esterilizaron a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 psi durante 15 minutos, cajas de Petri y asas redondas, junto con una solución de Agar Sabouraud. En la cabina de flujo laminar, con el correcto protocolo de limpieza, se agregaron 20 mL de dicha solución a cada caja de Petri y se realizó el sembrado por estrías. Las placas de Petri con el microorganismo sembrado se cerraron y aseguraron con papel Parafilm, para evitar la contaminación de cualquier otro microorganismo. Posteriormente, se colocaron cuidadosamente en la incubadora a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  y se dejaron crecer, hasta apreciar visiblemente el cultivo del consorcio bacteriano crecido, siguiendo la forma en la que fue dispuesto utilizando las asas de punta redonda, es decir durante 48 horas.

Luego, se tomó una muestra del medio sólido para realizar la prueba de tinción con azul de lactofenol para determinar hongos y levaduras. Para esta prueba de tinción con azul de lactofenol, se depositó una gota de la muestra en el centro de una lámina portaobjetos, se le

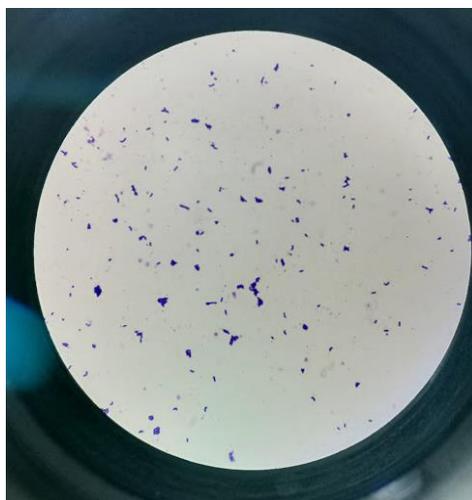
agregaron dos gotas de azul de lactofenol y se tapó con un cubreobjetos. Finalmente, se observó con el microscopio con un objetivo de 40X. Esta prueba tuvo un resultado negativo, de modo que en el cultivo sólido realizado en las cajas de Petri no existió presencia de hongos ni levaduras.

De igual manera, se realizó la prueba de tinción de Gram, para ello se depositó en el centro de una lámina portaobjetos una gota de la muestra y se fijó con ayuda del mechero, luego se agregó 1 gota de cristal violeta sobre la muestra y se esperó durante 1 minuto. Seguidamente, se retiró con agua destilada el exceso, se agregó 1 gota de lugol y se esperó por 1 minuto. Nuevamente, se retiró con agua destilada el exceso, se agregó 1 gota de alcohol acetona y se esperó por 30 segundos. Luego, se retiró con agua destilada el exceso de alcohol, se agregaron 2 gotas de fucsina y se esperó por 1 minuto. Con agua destilada se retiró el exceso, se secó y se fijó con ayuda del mechero la muestra. Finalmente, se observó con el microscopio con un objetivo de 100X colocando aceite de inmersión.

El resultado de la tinción se evidencia en la Figura 20, donde se observan cocos y bacilos; no obstante, se ve una mayoría de cocos, correspondientes al *Streptococcus thermophilus*. Son las bacterias lácticas de interés, debido a que la coloración de las bacterias de la prueba de Gram es púrpura, lo que indica bacterias grampositivas, como lo son: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*.

**Figura 20.**

*Consortio microbiano de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus delbrueckii observado con el microscopio.*



*Nota.* El objetivo del microscopio es de 100X.

### 3.1. Inoculación

Para este procedimiento se probaron 3 medios: caldo Nutritivo, caldo MRS y caldo Sabouraud. Se evidenció crecimiento, únicamente, en el caldo Sabouraud, este último no tenía presencia de Cloranfenicol. Pese a que es un medio destinado principalmente para el cultivo de hongos, se realizó en varias oportunidades la prueba de azul de lactofenol, con el propósito de evidenciar la presencia de hongos o levaduras, y sus resultados fueron siempre negativos. Lo anterior, puede deberse a que *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*, tienen la capacidad para crecer en ambientes ácidos.

Al establecer el medio de crecimiento, se preparó una solución de caldo Sabouraud, la cual se agregó a tubos de ensayo con tapa rosca, esterilizados previamente a 121°C y 15 psi, durante 15 minutos junto con asas de punta redonda. En la cabina de flujo laminar, con el correcto protocolo de limpieza, se realizó la inoculación transfiriendo con el asa metálica pequeñas cantidades de cultivo del medio sólido a cada tubo de ensayo, que contenían la solución del caldo Sabouraud.

**Figura 21.**

*Tubos de ensayo con el inóculo.*

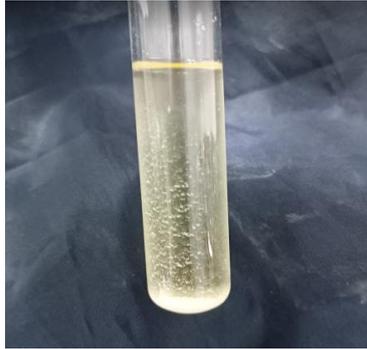


**Nota.** Se prepararon tubos de más para seleccionar aquellos en los que se evidencie un mayor crecimiento.

Estos tubos de ensayo se ubicaron en la incubadora durante 6 horas a 30°C, para permitir el crecimiento microbiano.

**Figura 22.**

*Resultado del proceso de  
inoculación.*



*Nota.* Para cada fermentador un volumen de inóculo que corresponde al 10% del volumen del medio de cultivo de la fermentación.

En la Figura 22 se evidencia el crecimiento del consorcio bacteriano, puesto que, la turbidez del líquido es mayor que en la Figura 21 y la posición que ocupan los microorganismos a lo largo del tubo de ensayo, coincide con la descripción realizada en la Figura 4. Lo anterior, confirma que son bacterias lácticas, caracterizadas por ser anaerobias facultativas.

### **3.2. Medio de cultivo**

Para la determinación del medio de cultivo adecuado, se realizó una revisión de literatura de trabajos similares para el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*. Se decidió evaluar los dos medios reportados en [64], para tener un mejor crecimiento del microorganismo, lo que indica una mayor producción del compuesto de interés.

**Tabla 10.***Medios de Cultivo de Fermentación Prueba*

Medio de cultivo	Componente	Cantidad	pH
1	Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	10 g/L	6.8
	Acetato de sodio (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	5 g/L	
	Fosfato diácido de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3 g/L	
	Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O)	0.2 g/L	
	Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O)	0.05 g/L	
	Sulfato de manganeso heptahidratado (MnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O)	0.02 g/L	
	Extracto de levadura	2 g/L	
2	Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	10 g/L	6.8
	Acetato de sodio (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	5 g/L	
	Fosfato diácido de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3 g/L	
	Extracto de levadura	2 g/L	
	Solución de microelementos	1 mL	

**Nota.** La tabla presenta los medios de cultivo en los que se realizó una fermentación de prueba. Tomado de: Z.P. Xue, X. Cu, K. Xu, J.H. Peng, H.R. Liu, R.T. Zhao, Z. Wang, T. Wang, Z.S. Xu, "The effect of glutathione biosynthesis of *Streptococcus thermophilus* ST-1 on cocultured *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842", *Journal of Dairy Science*, Volume 106, Issue 2, 2023, Pages 884-896, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22123>. [64].

La solución de microelementos empleada en el medio de cultivo 2, tiene el propósito de aportar las trazas de elementos metálicos necesarias para proporcionar los factores de crecimiento de las bacterias de interés. Los compuestos que forman la solución de microelementos se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11.***Compuestos de la solución de microelementos*

Compuesto	Concentración (g/L)
Cloruro de zinc (ZnCl <sub>2</sub> )	0.616
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O)	0.2
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	20
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.6
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O)	0.1
Sulfato de manganeso heptahidratado (MnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O)	0.05

*Nota.* La tabla presenta las sustancias que contiene la solución de microelementos del medio de cultivo 2.

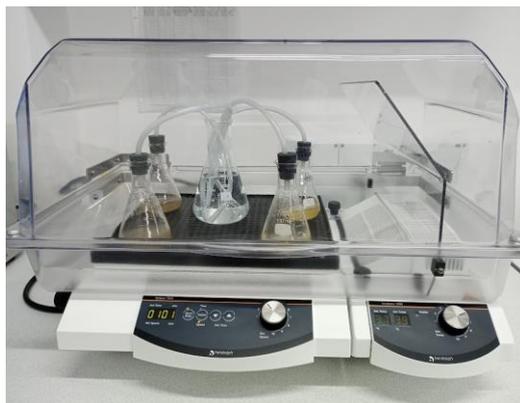
Tomado de: Z.P. Xue, X. Cu, K. Xu, J.H. Peng, H.R. Liu, R.T. Zhao, Z. Wang, T. Wang, Z.S. Xu, "The effect of glutathione biosynthesis of *Streptococcus thermophilus* ST-1 on cocultured *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842", *Journal of Dairy Science*, Volume 106, Issue 2, 2023, Pages 884-896, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22123>. [64].

De esta manera, se realizó una fermentación de prueba para seleccionar el mejor medio de cultivo. Se prepararon cuatro Erlenmeyer de 100 mL con un contenido de 30 mL de medio de cultivo, dos Erlenmeyer con el medio de cultivo 1 y los dos restantes con el medio de cultivo 2, cada uno de estos tenían un tapón de caucho con un orificio para una manguera, cuyo objetivo es permitir que el CO<sub>2</sub> pueda salir del Erlenmeyer evitando que entre el oxígeno y favoreciendo de esta manera la fermentación. Lo anterior se esterilizó en una autoclave a 121°C y 15 psi, durante 15 minutos.

En la cabina de flujo laminar, con el debido protocolo, se realizó la transferencia del contenido de un tubo de ensayo con el inóculo a cada uno de los Erlenmeyer. El montaje consistió en colocar los cuatro Erlenmeyer en un *shaker* de manera balanceada, y en el centro un Erlenmeyer adicional con una solución de agua y etanol, en este último, se ubican las mangueras que salen de los 4 Erlenmeyers principales. Se realizó la fermentación a 37°C, con una agitación constante de 100 rpm, durante 24 horas.

**Figura 23.**

*Montaje de fermentación de prueba.*



**Nota.** Se realizó la fermentación por duplicado para garantizar el adecuado control en la medición.

### **3.2.1. Cuantificación de biomasa**

Para la evaluación de los medios de cultivo seleccionados se realiza la determinación de biomasa, esta medición contribuye al análisis de la relación entre el metabolismo del microorganismo y el consumo de sustrato [65]. Se empleó un método espectrofotométrico para realizar la medición, que se basa en la relación directa entre el número total de microorganismos presentes en la muestra y su valor de turbidez, generada en el fluido por los microorganismos, a través de un haz de luz; el resultado se expresa en unidades de absorbancia [66].

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo la metodología de Shuler y Kargi [67]. Se tomó una muestra de 2 mL del caldo de fermentación y se agregó a un tubo Falcon estéril. Este tubo con la muestra se centrifugó a 3400 rpm, durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró y se almacenó en otro tubo Falcon esterilizado bajo refrigeración a  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ , mientras que el precipitado se resuspendió con 2 mL de solución isotónica estéril. Esta muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, el blanco empleado fue la solución isotónica esterilizada.

Para esta fermentación de prueba, se realizó lectura de biomasa inicial y final. Al evaluar estos datos para los dos medios, se evidenció que en el medio 1 creció de mejor manera, por lo tanto, se eligió este medio para la fermentación de mayor volumen.

Para poder aplicar la ley de Beer-Lambert y relacionar la absorbancia medida a 600 nm con la concentración de biomasa, se debe realizar una curva de calibración que se conoce en la literatura como curva de peso seco [68].

El procedimiento para realizar la curva de peso seco consistió en dejar las membranas de acetato de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  secando, a 60°C durante 24 horas. Análogamente, se realizó una fermentación en dos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando como medio de cultivo 150 mL de caldo Sabouraud. Dicha fermentación se realizó en un *shaker* a 30°C con una agitación constante de 100 rpm, durante 24 horas. Una vez terminada esta fermentación, se tomó una muestra de 1 mL de cada Erlenmeyer y se realizó la medición de absorbancia a 600 nm, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Para continuar con el proceso se trabajó exclusivamente con el Erlenmeyer, cuya medición de absorbancia fue muy cercana a 1.000.

De este modo, todo el medio de cultivo de dicho Erlenmeyer se centrifugó y se resuspendió la biomasa con solución salina isotónica estéril (9 g/L de NaCl), para formar una suspensión madre de biomasa con absorbancia a 600 nm de 1.000. Luego, se homogeneizó la suspensión madre utilizando un *vortex*.

**Figura 24.**

*Vortex.*



**Nota.** Se agitó hasta que la muestra se homogeneizó por completo.

Con esta solución madre se prepararon nueve suspensiones celulares en balones aforados de 10 mL de diferente concentración, utilizando volúmenes distintos de la solución madre de biomasa y llevando a volumen con solución salina estéril, tal como se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 12.**

*Suspensiones realizadas para la determinación de la curva de peso seco*

Ensayo Solución	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Solución A</b> (mL de solución salina isotónica estéril)	0	2	3	4	5	6	7	8	10
<b>Solución B</b> (mL de suspensión madre de biomasa)	10	8	7	6	5	4	3	2	0
<b>Volumen final (mL)</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	10

*Nota.* La tabla muestra el volumen con el que fueron preparadas las suspensiones celulares para la determinación de la curva de peso seco.

**Figura 25.**

*Suspensiones realizadas para la determinación de la curva de peso seco.*

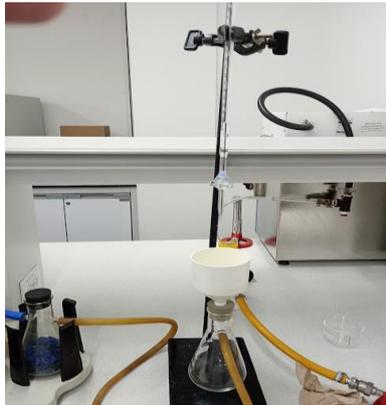


*Nota.* Se evidencia el cambio de turbidez que indica la cantidad de biomasa presente.

De todas las soluciones se toma 1 mL y se mide la absorbancia a 600 nm. Mientras que los 9 mL restantes se filtran en las membranas secas previamente pesadas, empleando la unidad de filtración al vacío. Para evitar que el líquido desborde la membrana de filtración, se utilizó una bureta para controlar el paso de solución, asegurando que todo el sólido se deposite en la membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

**Figura 26.**

*Montaje filtración para curva de peso seco.*



**Nota.** Se realizó dicho montaje para garantizar que el líquido fuera vertido de manera correcta sobre la membrana sin desbordarse.

Posteriormente, las membranas se colocaron en cajas de Petri y se secaron a 60°C en un horno de convección forzada, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se pesaron todas las membranas y la diferencia de peso de las membranas, es el peso de la biomasa seca contenida en 9 mL de la suspensión filtrada; por lo tanto, la concentración celular se calculó dividiendo dicha diferencia entre 9 mL.

Finalmente, se graficó la absorbancia en el eje de las ordenadas contra la concentración en el eje de las abscisas, obteniendo así la curva de calibración.

A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, es posible determinar la concentración de biomasa con base en la absorbancia medida a 600 nm, según el método descrito anteriormente.

### **3.2.2. Cuantificación de Ácido Láctico**

Para realizar el seguimiento en la producción de ácido láctico y su determinación se empleó un método espectrofotométrico, utilizado ampliamente y reportado en literatura en [68] y [69]. Aplicando este método, se preparó una solución de tricloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ) con una concentración de 3 g/L. Posteriormente, se prepararon soluciones patrón de ácido láctico de concentración conocida diluyendo ácido láctico al 95% con agua destilada.

**Tabla 13.**

*Concentración de soluciones patrón en cuantificación del ácido láctico*

<b>Solución</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
1	11.8
2	10.1
3	8.8
4	7.4
5	6.5
6	5.7
7	4.8
8	3.6
9	2.8
10	1.4
11	0.9
12	0.6

*Nota.* La tabla presenta la concentración de soluciones patrón en cuantificación del ácido láctico.

Con todas las soluciones preparadas, se realiza la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 390 nm, midiendo 50  $\mu$ L de muestra de ácido láctico junto con 2 mL de la solución de FeCl<sub>3</sub> y utilizando como blanco la solución preparada de tricloruro de hierro. Es importante realizar esta medición en un tiempo no mayor a 15 minutos, puesto que la coloración se degrada y la medición se vuelve errónea.

Finalmente, se graficó la absorbancia en el eje de las ordenadas contra la concentración en el eje de las abscisas, obteniendo así la curva de calibración. A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, es posible determinar la concentración de ácido láctico con base en la absorbancia medida a 390 nm, según el método descrito anteriormente.

### **3.3. Fermentación anaerobia mediante el consorcio microbiano con *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus***

Según se determinó con anterioridad, para realizar la fermentación láctica se utilizó el medio de cultivo 1, que se reportó en la Tabla 10. No obstante, la fuente de carbono que se utilizó fue la fracción líquida obtenida de la hidrólisis enzimática, realizada al afrecho de malta. El proceso

de hidrólisis se realizó por duplicado y la concentración de azúcar para los dos ensayos se presenta en la Tabla 5; dado que son valores muy similares, se mezcló la fracción líquida de los dos ensayos, obteniendo un volumen de 400 mL con una concentración de azúcares fermentables de 6 g/L.

Teniendo en cuenta este volumen, la fermentación láctica se realizó en tres Erlenmeyer de 250 mL, cada uno con 130 mL de medio de cultivo. Adicionalmente, se prepararon otros dos Erlenmeyer con el mismo medio de cultivo, pero la fuente de carbono fue glucosa con una concentración de 6 g/L; esto con el fin de realizar la comparación de la fermentación láctica con los azúcares extraídos del afrecho de malta con una fermentación realizada con glucosa, generando un control positivo al proceso fermentativo.

Todos los Erlenmeyer con el medio de cultivo tenían un tapón de caucho con un orificio para una manguera y se esterizaron en autoclave a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Pasado este tiempo, en la cabina de flujo laminar, con el correcto protocolo de limpieza, se realizó la inoculación, agregando 13 mL de inóculo a cada Erlenmeyer según el procedimiento planteado en secciones anteriores. Adicionalmente, se aseguraron todos los tapones con papel Parafilm alrededor y con silicona alrededor de la manguera, para evitar la entrada de oxígeno y/o cualquier tipo de contaminación.

De este modo, los cinco Erlenmeyer se colocaron en un *shaker* de manera balanceada y en el centro se dispuso un Erlenmeyer con una solución de agua y etanol, en la cual se sumergieron las mangueras de los fermentadores. Se realizó la fermentación a 30°C con una agitación constante de 100 rpm, durante 42 horas.

**Figura 27.**

*Montaje fermentación láctica.*



*Nota.* Se emplearon dos Erlenmeyer de blanco, debido al espacio disponible en el *shaker* y para garantizar que el peso en el mismo estuviese correctamente balanceado.

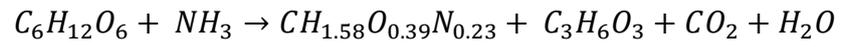
Se realizó un seguimiento a la fermentación, tomando cinco muestras de 2 mL del medio de cultivo de todos los Erlenmeyer. La toma de muestras se realizó en la cabina de flujo laminar, utilizando una micropipeta con puntas estériles y se depositó en tubos Eppendorf esterilizados también a 121°C y 15 psi, durante 15 minutos. Se realizaron cinco muestreos, el primero al iniciar la fermentación, el segundo a las 18 horas, el tercero a las 21 horas, el cuarto a las 24 horas y el último al terminar la fermentación, a las 42 horas.

Cada vez que se realizó una toma de muestra, se procedió a realizar la medición de biomasa según el procedimiento descrito en la sección anterior. La medición se realizó con el precipitado de la centrifugación, mientras que el sobrenadante se recogió en tubos Eppendorf previamente esterilizados y se almacenó en el congelador para realizar la cuantificación de azúcares y de ácido láctico a partir de la metodología planteada previamente.

Para identificar las muestras tomadas, se presenta el Anexo 5 donde se identifican numéricamente todas las muestras tomadas, para evitar confusiones de interpretación.

Las muestras que tienen la letra A representan aquellas cuya fuente de carbono fue la glucosa extraída del afrecho de malta por hidrólisis, mientras que las muestras que tienen la letra B representan aquellas cuya fuente de carbono fue la glucosa.

Durante este proceso, la reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



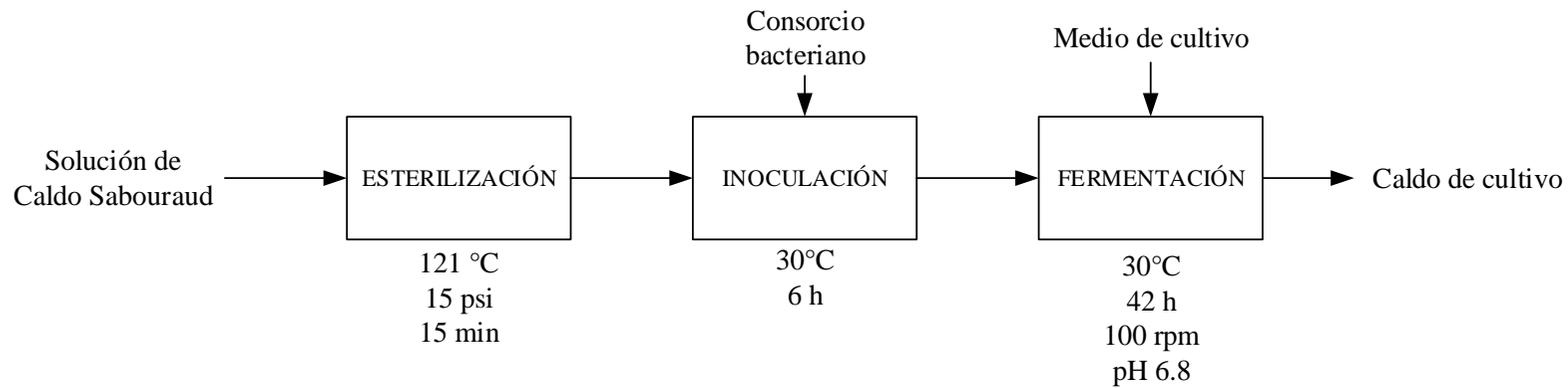
La glucosa y el amoníaco son esenciales para el proceso de fermentación, en este está presente el microorganismo y finalmente se produce dióxido de carbono y agua, al ser una reacción anaerobia.

### 3.4. Diagrama de Flujo de Bloques

En la Figura 28 se presenta el Diagrama de Flujo de Bloques (BFD) para la fermentación láctica, consta de: esterilización, inoculación y fermentación. Adicionalmente, se especifica la temperatura de trabajo.

**Figura 28.**

*Diagrama de Flujo de Bloques de la fermentación láctica.*



**Nota.** Se presenta el BFD del proceso descrito anteriormente, la fermentación láctica con las operaciones correspondientes.

### 3.5. Resultados y análisis

En primer lugar, se presentan los resultados referentes a la curva de peso seco, debido a que a partir de esta se cuantifica la biomasa en las diferentes mediciones realizadas.

Para cada suspensión se realizó la medición de la masa de la membrana seca vacía y la masa de la membrana seca con biomasa, la diferencia indica la cantidad de biomasa presente en la suspensión y a partir de la ecuación 2 se calcula la concentración de biomasa en unidades de g/L.

$$C = \frac{m_{cel}}{9 \text{ mL}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \quad (2)$$

Así mismo, a cada suspensión se le realizó la medición de absorbancia a 600 nm. Los resultados para todas las suspensiones se presentan en la Tabla 14.

**Tabla 14.**  
*Resultados curva de peso seco*

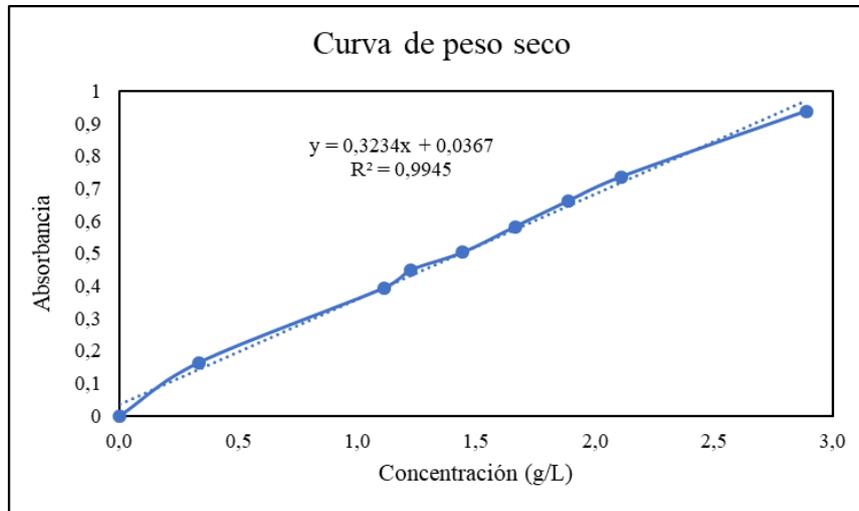
Suspensión	m <sub>0</sub> (g)	m <sub>f</sub> (g)	m <sub>cel</sub> (g)	Concentración (g/L)	Absorbancia 600 nm
1	0.069	0.095	0.026	2.889	0.938
2	0.070	0.089	0.019	2.111	0.736
3	0.069	0.086	0.017	1.889	0.662
4	0.07	0.085	0.015	1.667	0.583
5	0.068	0.081	0.013	1.444	0.503
6	0.068	0.079	0.011	1.222	0.448
7	0.069	0.079	0.010	1.111	0.393
8	0.069	0.072	0.003	0.333	0.164
9	0.070	0.070	0	0.000	0

**Nota.** La tabla presenta los resultados de la construcción de la curva de peso seco, permitiendo relacionar la concentración con la absorbancia.

Con estos valores de concentración y absorbancia se realiza la curva de peso seco, siguiendo la ley de Beer-Lambert y así, la relación entre la absorbancia de un líquido con la concentración de biomasa que esta posee.

**Figura 29.**

*Curva de peso seco.*



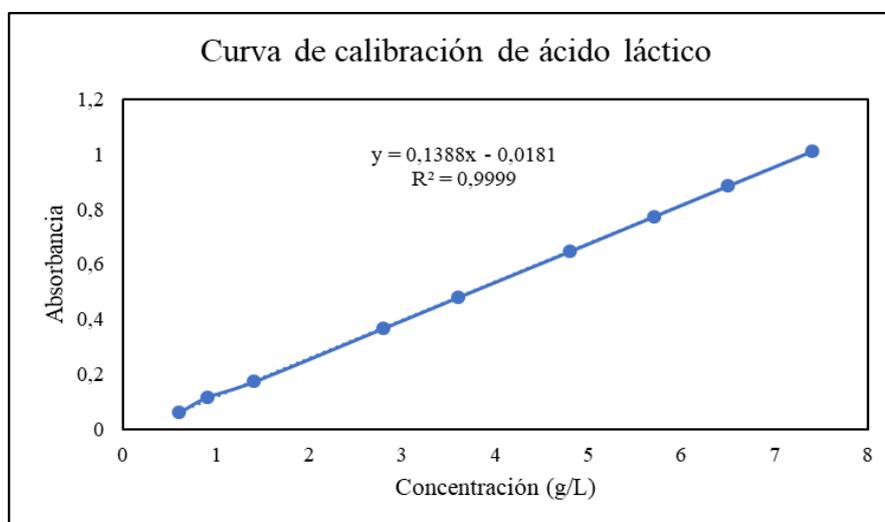
**Nota.** Los valores de absorbancia deben ser menores a 1.000, para garantizar una relación lineal entre la absorbancia y la concentración.

Teniendo en cuenta la ecuación de la recta, se puede conocer la concentración de biomasa al leer en el espectrofotómetro la absorbancia a 600 nm.

Para determinar la concentración de ácido láctico se realizó la curva de calibración que se presenta a continuación.

**Figura 30.**

*Curva de calibración de Ácido Láctico.*



**Nota.** Se tuvieron en cuenta los valores menores a 1.000, para garantizar una relación lineal entre la absorbancia y la concentración.

Teniendo en cuenta la ecuación de la recta, se puede conocer la concentración de ácido láctico al leer en el espectrofotómetro la absorbancia a 390 nm.

De esta manera, se presentan los resultados de la fermentación de prueba que se realizó para determinar el medio de cultivo en el que se presenta un mejor crecimiento del consorcio microbiano, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

**Tabla 15.**

*Resultados fermentación de prueba*

Medio	Biomasa inicial		Biomasa final	
	Absorbancia 600 nm	Concentración (g/L)	Absorbancia 600 nm	Concentración (g/L)
1.1	0.138	0.313	0.884	2.620
1.2	0.130	0.288	1.002	2.985
2.1	0.096	0.183	0.109	0.224
2.2	0.087	0.155	0.195	0.489

*Nota.* La tabla muestra los resultados de las mediciones realizadas de biomasa inicial y final en la fermentación de prueba.

Se evidencia en la Tabla 15, en las dos fermentaciones realizadas con el medio 1, un aumento de biomasa, lo que refleja un mejor crecimiento del consorcio microbiano en ese medio de cultivo. Este mejor crecimiento, puede significar que se consume el sustrato, y esto favorece su proceso metabólico para producir el compuesto de interés en la fermentación láctica.

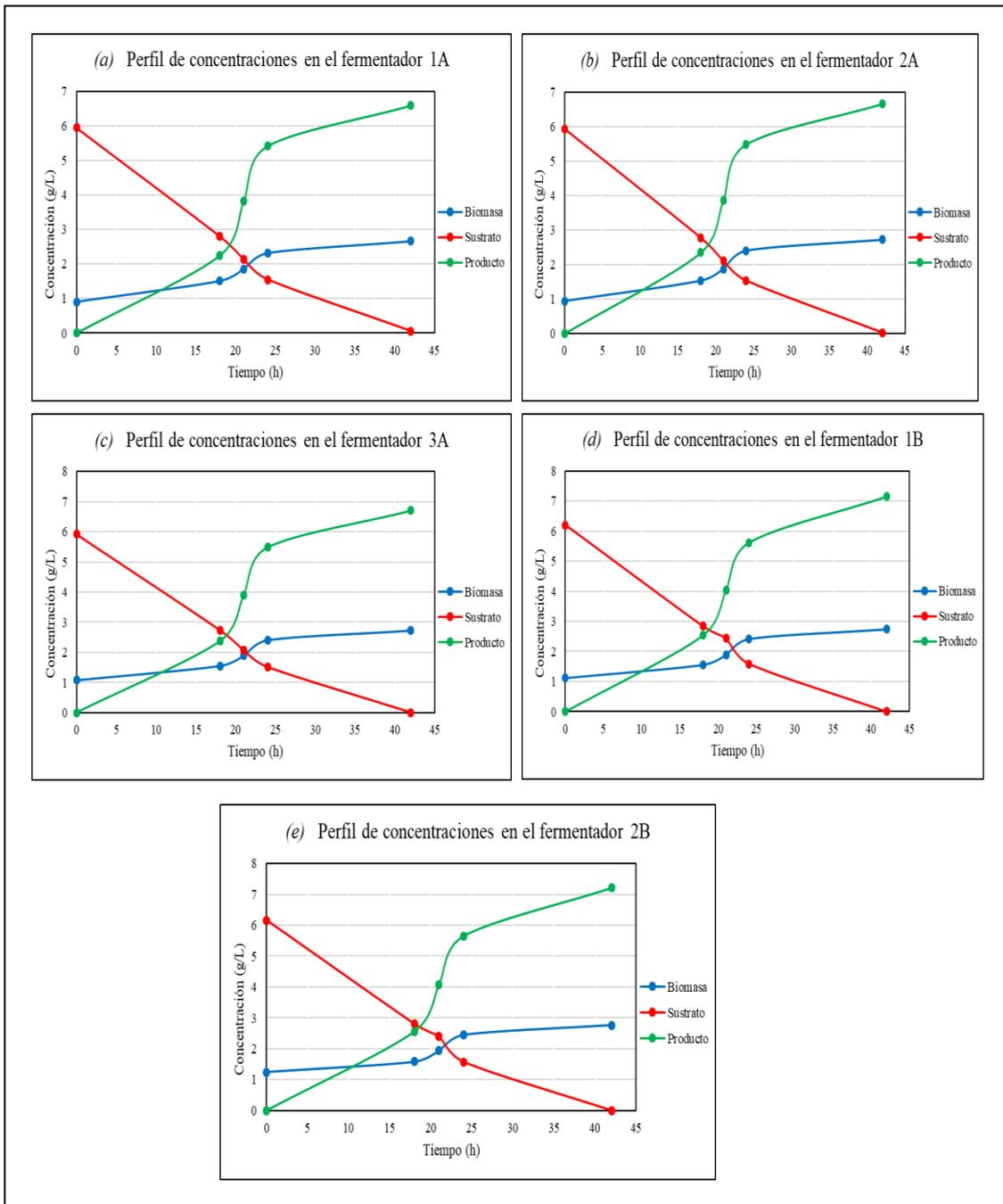
Es posible que el medio de cultivo 2, no haya permitido el correcto crecimiento de la población bacteriana debido a los compuestos presentes en la solución de microelementos, así pues, elementos como el boro, el zinc, el cloro y el calcio, en vez aportar nutrientes al microorganismo, tienen un efecto inhibitor en este, impidiendo su crecimiento y desarrollo. Este resultado, coincide con estudios donde se muestra más efectivo para realizar la fermentación con bacterias lácticas, el medio 1 [64].

En el seguimiento de la fermentación láctica, se tomaron muestras iniciales, intermedias y finales, a las cuales se les realizó la medición de biomasa, azúcares reductores y también de ácido láctico, con las metodologías mencionadas anteriormente. Los resultados de estas mediciones, teniendo en cuenta la nomenclatura propuesta en la tabla del Anexo 5, se presentan en el Anexo 6.

Con estos resultados se realiza el perfil de concentraciones para la fermentación láctica, y se realiza el cálculo del rendimiento biomasa-sustrato y el rendimiento producto-sustrato presentados en los Anexos 7 y 8, respectivamente.

**Figura 31.**

*Perfil de concentraciones de biomasa, sustrato y producto.*



**Nota.** Las fermentaciones en las que el sustrato fue el afrecho de malta se aprecian en las figuras (a), (b) y (c); mientras que las (d) y (e) fueron las fermentaciones de control positivo.

Se puede apreciar en la Figura 31 que, el comportamiento de las fermentaciones en las que el sustrato empleado fue el azúcar extraído del afrecho de malta por hidrólisis es similar al de las fermentaciones en las que el sustrato fue glucosa. Lo anterior, indica que la fuente de carbono estudiada, extraído en el pretratamiento es consumida de manera adecuada, por las bacterias lácticas.

Para determinar que no existen diferencias significativas entre las fermentaciones realizadas con el hidrolizado del afrecho de malta y con la glucosa, se realiza el análisis estadístico mediante una comparación entre los dos tratamientos realizados, siendo A, el tratamiento que indica la fermentación con afrecho de malta como sustrato, mientras que B, es el tratamiento correspondiente a la fermentación con glucosa como fuente de carbono. Este tratamiento se realizó con un intervalo de confianza del 95%, de modo que la zona de rechazo  $\alpha$  es del 5%.

Los cálculos, que se presentan en el Anexo 9, indican que no existen diferencias significativamente estadísticas para las mediciones de sustrato y de biomasa, lo cual indica que el microorganismo tiene un crecimiento igual en ambas fermentaciones realizadas, puesto que consume de manera uniforme el sustrato empleado en los dos tratamientos realizados. Sin embargo, se obtuvo que en cuanto a la producción de ácido láctico sí se encuentran diferencias significativamente estadísticas.

La mayor producción de ácido láctico en las fermentaciones de control puede deberse a la naturaleza del sustrato. Es decir, pese a que el microorganismo consumió el sustrato y creció de manera igual en ambos tratamientos, la síntesis del metabolito de interés fue mayor en las fermentaciones en las que se empleó D(+) glucosa como fuente de carbono dado que la ruta metabólica de las bacterias lácticas comienza con la descomposición de glucosa [16] [55], tal como se evidencia en el Anexo 10, de manera que se plantea la posibilidad de que el contenido los azúcares reductores totales obtenidos en el proceso de hidrólisis no son glucosa en su totalidad, sino que puede tratarse de otros monosacáridos.

Por otra parte, se evidencia que el tiempo de fermentación es adecuado, puesto que el azúcar disponible se consumió totalmente y se aprovechó la fase exponencial y estacionaria del consorcio bacteriano, evitando que los microorganismos comenzaran a consumir el compuesto de interés como fuente de carbono.

La razón por la cual no se comienza la fase de muerte como sí ocurre en otros estudios [4], se debe a que no hubo un déficit en la fuente de carbono y que además la concentración de ácido láctico no era lo suficientemente alta, para disminuir el pH del medio de cultivo.

De igual manera, se realizó el cálculo del rendimiento biomasa-sustrato, así como del rendimiento producto-sustrato a partir de las ecuaciones 3 y 4, los resultados se presentan en las tablas 16 y 17.

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Biomasa final} - \text{Biomasa inicial}}{\text{Sustrato inicial} - \text{Sustrato final}} \quad (3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Producto final} - \text{Producto inicial}}{\text{Sustrato inicial} - \text{Sustrato final}} \quad (4)$$

**Tabla 16.***Rendimiento biomasa-sustrato de la fermentación láctica*

Muestra	$Y_{X/S}$ (g/g)	Promedio (g/g)	Desviación estándar
1A	0.299		
2A	0.303	0.294	0.012
3A	0.280		
1B	0.262		
		0.253	0.012
2B	0.245		

*Nota.* La tabla presenta el rendimiento biomasa-sustrato de la fermentación láctica en los cinco fermentadores.

A partir de la información obtenida en la Tabla 16, se puede apreciar que el rendimiento biomasa-sustrato es mayor en las fermentaciones realizadas con el afrecho de malta como sustrato, que aquellas en las que el sustrato es glucosa. Esto también sugiere, que la fuente de carbono obtenida en el proceso de hidrólisis sea ligeramente diferente a la D(+) glucosa empleada en las fermentaciones de control.

Por otra parte, estos rendimientos tienen un valor promedio de 0.3 g/g, lo cual puede deberse a que la fase exponencial no es demasiado alta. Lo anterior, es consistente con otros estudios realizados en la producción de ácido láctico [70].

En cuanto al rendimiento producto-sustrato, se evidencia en la Tabla 17 que este es bastante superior al rendimiento biomasa-sustrato, lo cual indica, que no se requiere de una elevada cantidad de comunidad microbiana para producir el producto de interés en cantidades significativas. Esto se debe a que el consorcio empleado es una combinación entre dos bacterias pertenecientes al grupo de bacterias lácticas, por lo tanto, el compuesto que producen en su proceso metabólico, mayormente, es el ácido láctico. Adicionalmente, esto confirma que, mediante consorcios bacterianos, los rendimientos suelen ser mejores [54], en este caso la característica principal es que *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* promueven mutuamente su crecimiento y ambas se estimulan entre sí, bajo las condiciones experimentadas. Estos rendimientos tienen un valor promedio de 1.1 g/g, lo cual refleja que el proceso de producción de ácido láctico por vía biotecnológica es altamente eficiente.

**Tabla 17.***Rendimiento biomasa-producto de la fermentación láctica*

<b>Muestra</b>	<b>Y<sub>P/S</sub> (g/g)</b>	<b>Promedio (g/g)</b>	<b>Desviación estándar</b>
1A	1.119		
2A	1.126	1.126	0.007
3A	1.133		
1B	1.153		
2B	1.169	1.161	0.012

*Nota.* La tabla presenta el rendimiento biomasa-producto de la fermentación láctica en los cinco fermentadores.

Para determinar alguna diferencia en estos valores, se realiza el cálculo del error relativo a los promedios obtenidos para la fermentación láctica del proceso, como a la de control. El cálculo se realiza a partir de la siguiente ecuación donde, el valor real corresponde al valor de rendimiento obtenido en la fermentación realizada con glucosa, mientras que el valor medido corresponde al valor del rendimiento obtenido en la fermentación realizada con afrecho de malta como sustrato:

$$\%ER = \frac{|Valor\ medido - Valor\ real|}{Valor\ real} \cdot 100 \quad (5)$$

**Tabla 18.***Error relativo en el rendimiento de la fermentación láctica*

<b>Rendimiento</b>	<b>Error relativo (%)</b>
Rendimiento biomasa-sustrato	16.205
Rendimiento producto-sustrato	3.015

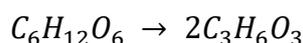
*Nota.* La tabla presenta el resultado del error relativo en el rendimiento de la fermentación láctica.

Así mismo, se realizó el cálculo del rendimiento biomasa-sustrato teórico y el rendimiento producto-sustrato teórico, para realizar la respectiva comparación con los rendimientos obtenidos en la presente investigación.

En cuanto al rendimiento biomasa-sustrato, se afirma en la literatura que este parámetro depende principalmente del tipo de sustrato utilizado y el número de electrones disponibles en el mismo [71]. Se encontró que el rendimiento biomasa-sustrato teórico es de 0.8 g/g [71].

Se calculó el error relativo utilizando la ecuación 5 para encontrar la diferencia entre el parámetro medido y el teórico, siendo esta de un 62.5 %, lo cual indica que el rendimiento está muy por debajo del máximo posible. Este parámetro puede mejorarse con un equipo más sofisticado, que evite las pérdidas, posibilitando ampliar el rendimiento del procedimiento.

En el caso del rendimiento producto-sustrato teórico, se obtiene de la ecuación de la fermentación sin tener en cuenta la fuente de nitrógeno, el microorganismo y subproductos como el agua o el dióxido de carbono [72]. En ese sentido la ecuación se presenta a continuación:



En ese caso, el rendimiento producto-sustrato teórico es de 2 mol ácido láctico/mol glucosa, al convertirlo a las unidades empleadas (g/g) se utiliza la masa molecular de los compuestos en el siguiente factor de conversión:

$$\frac{2 \text{ mol } C_3H_6O_3}{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6} \cdot \frac{90 \text{ g } C_3H_6O_3}{1 \text{ mol } C_3H_6O_3} \cdot \frac{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6}{180 \text{ g } C_6H_{12}O_6}$$

Se determinó que el rendimiento producto-sustrato teórico es de 1 g/g. De igual manera se calculó el error relativo, el cual tuvo un valor del 10%, lo cual indica que el valor obtenido no es muy diferente al valor teórico.

Finalmente, se realizó el cálculo de la productividad del ácido láctico, así como el promedio y la desviación estándar para los dos tratamientos realizados. Los resultados se presentan a continuación.

**Tabla 19.**  
*Productividad en la fermentación láctica*

Fermentador	Productividad (g/Lh)	Promedio (g/Lh)	Desviación estándar
1A	0.157		
2A	0.158	1.158	0.001
3A	0.160		
1B	0.170		
2B	0.171	1.171	0.001

*Nota.* La tabla presenta la productividad en la fermentación láctica en los cinco fermentadores.

Los resultados de la productividad, si bien pueden parecer bajos, hay que tener en cuenta que la concentración de ácido láctico en la fermentación no fue demasiado alta, teniendo un valor aproximado de 6.7 g/L y adicional, el tiempo de fermentación fue de 42 horas. Sin embargo, el momento de mayor productividad fue a las 24 horas de fermentación, debido a que este parámetro fue un 41.8% mayor. De esta manera, el valor de productividad obtenido se encuentra en lo esperado, puesto que para otros ensayos de escala mayor se emplea una mayor concentración de azúcares reductores totales, la concentración de ácido láctico obtenido también es mayor; pero la relación entre la productividad es similar [4].

Para determinar la diferencia de los valores de productividad en los dos tratamientos se realiza nuevamente el cálculo del error relativo a partir de la ecuación 5.

**Tabla 20.**

*Error relativo en la productividad de la fermentación láctica*

<b>Parámetro</b>	<b>Error relativo (%)</b>
Productividad	1.110

*Nota.* La tabla presenta el resultado del error relativo en la productividad de la fermentación láctica.

Según se aprecia en la Tabla 20, la diferencia entre los dos tratamientos es muy baja, por lo cual se confirma, que la producción de ácido láctico a partir de los azúcares reductores obtenidos del afrecho de malta es altamente viable en términos de rendimiento y productividad, demostrando así el potencial aprovechamiento de este residuo.

De lo anterior, es posible inferir que la realización de la combinación de los dos procesos: la hidrólisis ácida utilizada para el pretratamiento de la biomasa y la hidrólisis enzimática realizada para obtener azúcares fermentables, reflejan un mayor rendimiento.

#### 4. PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Finalizada la fermentación, todo el caldo de fermentación se centrifugó a 3400 rpm durante 15 minutos, con el fin de eliminar la biomasa. El sobrenadante se almacenó en un frasco Schott de 500 mL y se guardó en el congelador, mientras que el precipitado se eliminó. El caldo centrifugado se agregó en un solo recipiente, separados por la fuente de carbono utilizada en la fermentación tal como se muestra en la Figura 32. Es decir, en un frasco Schott se almacenó el caldo centrifugado proveniente de los fermentadores 1A, 2A y 3A, cuyo sustrato fueron los azúcares hidrolizados del afrecho de malta, mientras que en otro frasco Schott se almacenó el caldo centrifugado proveniente de los fermentadores 1B y 2B, cuya fuente de carbono fue la glucosa.

**Figura 32.**

*Caldos de fermentación centrifugados.*



**Nota.** La diferencia en la coloración se debe a algunos compuestos orgánicos presentes en el afrecho de malta.

El volumen del líquido obtenido en la fermentación con afrecho de malta fue de 350 mL, mientras que el obtenido en la fermentación con glucosa fue de 240 mL.

##### 4.1. Extracción líquido-líquido

El criterio más importante para realizar la extracción líquido-líquido consiste en la elección del solvente, debido a que este debe cumplir con ciertas características, como lo son: la selectividad, estabilidad química, baja toxicidad o viscosidad y su fácil recuperación del compuesto de interés. Los solventes que se emplean son: éter etílico, acetato de etilo, hexanol, alcohol isoamílico, octanol y furfural [56]. Según lo anteriormente mencionado, el acetato de etilo fue el compuesto que se utilizó, debido a su afinidad, fácil separación con el ácido láctico y rendimientos reportados en [73] y presentados en el Anexo 11. Así mismo de todos los

solventes mencionados, el acetato de etilo es el único que es considerado como un biodisolvente, lo que favorece al componente ambientalmente sostenible del proyecto realizado.

Siguiendo la metodología de Tello [73], se agregaron los caldos obtenidos en dos *beakers* de 1000 mL y a cada uno se le agregó un volumen igual de acetato de etilo. Posteriormente, se ajustó a 3 el pH de la solución, con HCl al 37% y se colocaron en una plancha de agitación magnética, a 1500 rpm durante 1 hora.

Finalizado este tiempo, el contenido de cada *beaker* se agregó a dos embudos de decantación de 250 mL y se dejaron durante 24 horas, con el propósito de que las dos fases se separen por gravedad a partir de sus densidades. El montaje se puede apreciar en la Figura 33.

**Figura 33.**

*Montaje de decantación.*



**Nota.** La figura de la izquierda corresponde al montaje para el afrecho de malta, mientras que el de la derecha corresponde a lo obtenido de la fermentación de glucosa.

Pasadas las 24 horas, se realizó la separación en cada uno de los embudos, la fracción de mayor densidad se recolectó en un Erlenmeyer de 250 mL y, posteriormente, se eliminó; mientras que, la fase menos densa, correspondiente a la fase orgánica que contiene el ácido láctico con el acetato de etilo, se almacenó para realizar el siguiente tratamiento.

## 4.2. Destilación

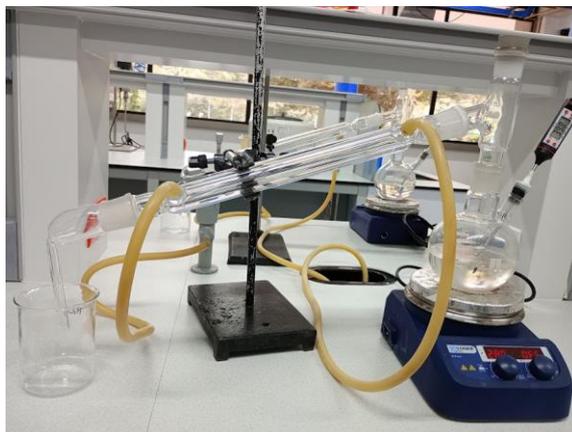
Con el fin de realizar la separación de la fase orgánica, que contiene el acetato de etilo con el ácido láctico, se aprovechan sus diferencias de volatilidades para realizar su separación mediante destilación simple.

El montaje constó de un balón de 250 mL con doble boquilla, un adaptador, un condensador, un codo, un *beaker* de 250 mL para almacenar el líquido condensado, una plancha de

calentamiento y en la boquilla lateral del balón se colocó un termómetro para controlar la temperatura del líquido.

**Figura 34.**

*Montaje de destilación simple.*



*Nota.* Se realizó la destilación para la fase orgánica de los dos caldos de cultivo.

La temperatura a la cual se realizó la destilación fue de 80°C debido a que el punto de ebullición del acetato de etilo es de 77.1°C [74], mientras que la del ácido láctico es superior a los 100°C (ver en Anexo 1). Al finalizar el proceso de destilación, el ácido láctico purificado en el balón de fondo plano se almacenó en un frasco Schott de 100 mL.

#### **4.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas**

Para determinar la obtención de ácido láctico, se realizó la determinación por espectrofotometría a 390 nm con tricloruro de hierro, según el procedimiento realizado anteriormente. Para ello, se realizaron diluciones hasta que el valor de absorbancia se ajustara en el rango de medición de la curva de calibración de la Figura 30, esto debido a que la solución tenía alta concentración de ácido láctico. Finalmente, para determinar la concentración inicial se emplea la ecuación (7) de dilución.

De igual manera, se propuso comparar algunas propiedades fisicoquímicas del ácido láctico obtenido, con una solución de ácido láctico con la misma concentración. Teniendo en cuenta que se obtuvieron dos soluciones de ácido láctico, una proveniente de la fermentación con los azúcares obtenidos del afrecho de malta hidrolizado y otra proveniente de la fermentación con glucosa, se prepararon dos soluciones de ácido láctico, cuya concentración fue la misma que la que se determinó según la medición de absorbancia a 390 nm.

#### 4.3.1. Densidad

Para determinar la densidad del ácido láctico, se realizó el método del picnómetro reportado ampliamente en la literatura [75]. Este método consiste en que, se pesa un picnómetro limpio, seco y vacío en una balanza analítica y se toma ese dato ( $m_{PV}$ ). Después, se llena el picnómetro con agua y se pesa nuevamente en la misma balanza analítica y se anota este valor ( $m_{PW}$ ). Por último, el picnómetro es lavado y secado nuevamente. Se realiza una última medición en la balanza analítica del picnómetro lleno con la sustancia de interés, en este caso, es el ácido láctico ( $m_{PAL}$ ). Para el cálculo de la densidad de la sustancia se utiliza la ecuación que se presenta a continuación:

$$\rho_{AL} = \frac{m_{PAL} - m_{PV}}{m_{PW} - m_{PV}} \cdot \rho_W(T) \quad (6)$$

Es importante mencionar, que se realizó una corrección al valor utilizando la densidad del agua a la temperatura de trabajo, esto se debe a que la densidad depende en gran medida de la temperatura, por lo tanto, se registró la temperatura ambiente en el momento de la medición y se realizó una búsqueda del valor de densidad a esa temperatura.

Este procedimiento se realizó cuatro veces, para las dos soluciones de ácido láctico obtenidas por fermentación y para las soluciones preparadas con la misma concentración.

#### 4.3.2. Índice de refracción

Otra propiedad que se midió fue el índice de refracción. Para realizar esta medición, se utilizó el refractómetro. En primera instancia fue necesario realizar la medición de un blanco, para ello se tomó el agua destilada, se vertió en el lente del medidor y se ajustó como blanco de medida. Ver Figura 35.

Posteriormente, se tomó una muestra de las cuatro soluciones de ácido láctico y se midieron una a una, vertiendo la muestra en el lente del refractómetro.

**Figura 35.**

*Determinación del índice de refracción.*



*Nota.* El lente del refractómetro se lavó con agua destilada antes de cada medición.

Este procedimiento se realizó cuatro veces. Para las dos soluciones de ácido láctico obtenidas por fermentación y para las soluciones preparadas con la misma concentración.

#### **4.3.3. Punto de ebullición**

La determinación de esta propiedad se realizó siguiendo la metodología del tubo de Thiele, reportada en [76]. Siguiendo este método, se llenó un tubo Durham hasta la mitad con la sustancia a medir, este tubo se unió con un alambre de acero dulce a un termómetro. Un tubo capilar se colocó dentro del tubo Durham, de modo que el extremo abierto esté sumergido en la sustancia líquida y el extremo cerrado no.

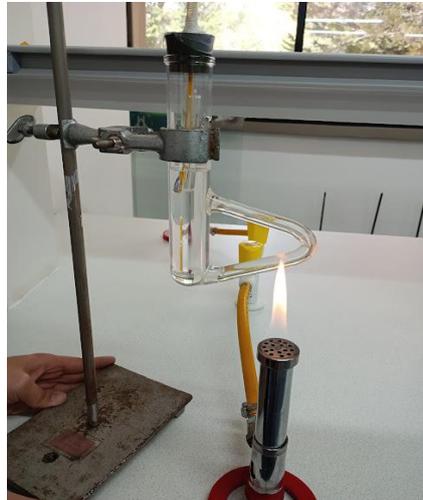
El montaje termómetro-tubo Durham se introdujo dentro del tubo de Thiele, este último contenía aceite mineral un centímetro arriba del vértice superior. El aceite mineral fue escogido para ser utilizado, debido a que su punto de ebullición se encuentra en el rango de 218°C y 643°C, siendo muy superior al de la muestra [77]. Para el tubo de Thiele, se utilizó un tapón de caucho con un orificio para el termómetro, este orificio se cubrió por completo con cinta teflón para evitar la fuga de algún compuesto; por último, se calentó con un mechero por el extremo triangular, utilizando una flama baja.

Una vez se evidenció un flujo de burbujas provenientes del tubo capilar, se detuvo el calentamiento y cuando el aceite mineral llenó por completo el tubo capilar, se leyó la temperatura en el termómetro y se registró el punto de ebullición de la sustancia de interés.

Este procedimiento se realizó cuatro veces. Para las dos soluciones de ácido láctico obtenidas por fermentación y para las soluciones preparadas con la misma concentración.

**Figura 36.**

*Montaje de determinación del punto de ebullición.*



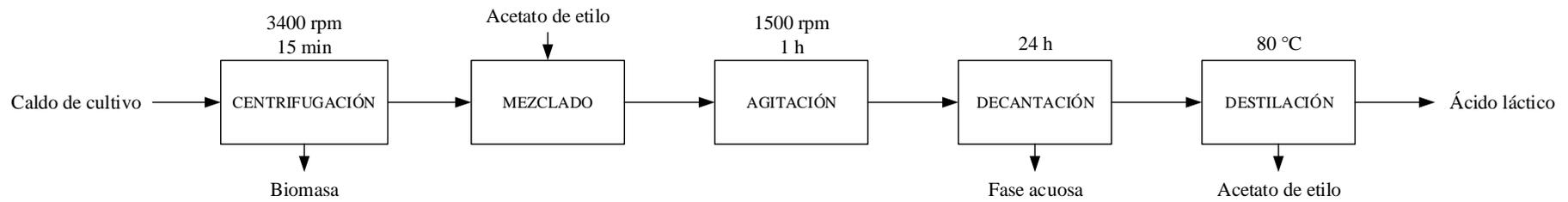
*Nota.* El aceite mineral debe estar limpio, si empieza a tomar una coloración oscura, debe cambiarse.

#### 4.4. Diagrama de Flujo de Bloques

En la Figura 37 se presenta el Diagrama de Flujo de Bloques (BFD) para la Purificación del Ácido Láctico, consta de: centrifugación, mezclado, agitación, decantación y destilación. Adicionalmente, se especifica la temperatura de trabajo.

**Figura 37.**

*Diagrama de Flujo de Bloques de la purificación del Ácido Láctico.*



**Nota.** Se presenta el BFD del proceso descrito anteriormente, la Purificación del Ácido Láctico con las operaciones correspondientes.

#### 4.5. Resultados y análisis

El producto purificado se recuperó del balón de fondo plano, en el que se llevó a cabo la destilación. Para determinar la concentración de este, se realizó el método de cuantificación por espectrofotometría con tricloruro de hierro descrito anteriormente. Debido a las altas concentraciones de ácido láctico, fue necesario diluir la muestra inicial, pero la concentración inicial se calculó con la siguiente ecuación.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (7)$$

Así pues, la concentración para las dos soluciones de ácido láctico obtenidas se presenta en la tabla a continuación.

**Tabla 21.**

*Concentración final de Ácido Láctico*

Muestra	Cantidad (mL)	Concentración (g/L)
Ácido láctico proveniente de la fermentación con afrecho de malta	25	70
Ácido láctico proveniente de la fermentación con glucosa	20	72

*Nota.* La tabla presenta la concentración y la cantidad de ácido láctico obtenido en la fermentación láctica y discrimina según la fuente de carbono empleada.

**Figura 38.**

*Ácido Láctico purificado.*



*Nota.* Se aprecia que el color ha cambiado, a ser amarillo débil y transparente.

Se evidenció que el ácido láctico obtenido de la fermentación de glucosa pura tuvo una concentración levemente mayor, lo cual es consecuente con los resultados de la concentración

al final de la fermentación, que, para ese caso, fue mayor. No obstante, la concentración obtenida es alta y se puede clasificar como ácido láctico grado técnico, con aplicaciones detalladas previamente.

A partir de estos valores de concentración, las dos soluciones de ácido láctico se prepararon diluyendo con agua desionizada el ácido láctico al 95%, hasta obtenerlo con concentraciones de 70 g/L y de 72 g/L para realizar la comparación de propiedades fisicoquímicas.

Respecto a la medición de la densidad, para poder aplicar la ecuación 6, las constantes son la masa del picnómetro vacío ( $m_{PV}$ ), que es de 14.6236 g; la masa del picnómetro con agua ( $m_{PW}$ ), que es de 25.6706 g y la densidad del agua a 17.3°C, siendo esta, la temperatura del líquido en el momento de la medición. La densidad del agua a 17.3°C, se obtuvo del manual del ingeniero químico Perry y tiene un valor de 0.998676 g/cm<sup>3</sup> [78].

Los resultados de la medición de densidad se presentan a continuación:

**Tabla 22.**

*Determinación de densidad*

<b>Muestra</b>	<b><math>m_{PAL}</math> (g)</b>	<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>
Ácido láctico proveniente de la fermentación con afrecho de malta	25.4980	0.9831
Solución preparada de ácido láctico 70 g/L	25.5005	0.9833
Ácido láctico proveniente de la fermentación con glucosa	25.6174	0.9939
Solución preparada de ácido láctico 72 g/L	25.6207	0.9942

*Nota.* La tabla presenta la densidad para las cuatro muestras de ácido láctico.

Posteriormente, se realiza el cálculo del error relativo para determinar la similitud de los valores medidos. Para ello, se emplea nuevamente la ecuación 5, donde, el valor real corresponde al valor medido en la solución patrón preparada, mientras que el valor medido corresponde al valor del ácido láctico obtenido por vía biotecnológica.

**Tabla 23.***Error relativo en la determinación de densidad*

<b>Muestra</b>	<b>Error relativo (%)</b>
Ácido láctico 70 g/L	0.0203
Ácido láctico 72 g/L	0.0302

*Nota.* La tabla presenta el error relativo de la densidad de las dos soluciones de ácido láctico obtenidas por fermentación.

De igual manera, los resultados obtenidos en la medición del índice de refracción se presentan a continuación:

**Tabla 24.***Determinación del índice de refracción*

<b>Muestra</b>	<b>Índice de refracción <math>\eta</math></b>
Ácido láctico proveniente de la fermentación con afrecho de malta	1.3866
Solución preparada de ácido láctico 70 g/L	1.3864
Ácido láctico proveniente de la fermentación con glucosa	1.3884
Solución preparada de ácido láctico 72 g/L	1.3891

*Nota.* La tabla presenta el valor del índice de refracción para las cuatro muestras de ácido láctico.

De igual manera, se realizó el cálculo del error relativo siguiendo la ecuación 5. Los resultados, son los presentados en la Tabla 25.

**Tabla 25.***Error relativo en la determinación del índice de refracción*

<b>Muestra</b>	<b>Error relativo (%)</b>
Ácido láctico 70 g/L	0.0144
Ácido láctico 72 g/L	0.0504

*Nota.* La tabla presenta el error relativo del índice de refracción de las dos soluciones de ácido láctico obtenidas por fermentación.

Finalmente, se realizó el mismo procedimiento para el punto de ebullición, cuyos resultados se presentan a continuación.

**Tabla 26.***Determinación del punto de ebullición*

<b>Muestra</b>	<b>Punto de ebullición (°C)</b>
Ácido láctico proveniente de la fermentación con afrecho de malta	108
Solución preparada de ácido láctico 70 g/L	109
Ácido láctico proveniente de la fermentación con glucosa	112
Solución preparada de ácido láctico 72 g/L	113

*Nota.* La tabla presenta el valor del punto de ebullición para las cuatro muestras de ácido láctico.

Nuevamente, se realizó el cálculo del error relativo siguiendo la ecuación 5. Los resultados se presentan a continuación:

**Tabla 27.***Error relativo en la determinación del punto de ebullición*

<b>Muestra</b>	<b>Error relativo (%)</b>
Ácido láctico 70 g/L	0.917
Ácido láctico 72 g/L	0.885

*Nota.* La tabla presenta el error relativo del punto de ebullición de las dos soluciones de ácido láctico obtenidas por fermentación.

Según se puede apreciar, el error relativo al comparar con las mediciones de igual concentración no supera en ningún caso el 1%, esto confirma que la sustancia obtenida por fermentación láctica, efectivamente, fue ácido láctico.

No obstante, las propiedades medidas son relativamente cercanas a las que se presentan en la Tabla 1. Esto se debe a que las propiedades reportadas en dicha tabla corresponden al ácido láctico con una elevada pureza, sin embargo, el valor de estas propiedades depende de la concentración.

Los valores de propiedades como puntos de cambio de fase, viscosidad, índice de refracción, densidad entre otras, disminuyen cuando menor es la concentración de ácido láctico. Por lo tanto, las propiedades medidas coinciden con las reportadas para concentraciones similares [79].

#### **4.5.1. Diagrama PFD**

A continuación, se presenta el diagrama de flujo de proceso que recopila el conjunto de operaciones realizadas en la obtención del ácido láctico a partir del afrecho de malta para una posible escala piloto (Figura 39). En primer lugar, estas operaciones son el secado del afrecho

recién obtenido del proceso de macerado, la reacción de hidrólisis ácida, filtración, lavado y posteriormente el secado del afrecho hidrolizado. A continuación, se lleva a cabo la reacción de hidrólisis enzimática con el complejo enzimático de celulosa, se realiza una filtración del afrecho y la fracción líquida es llevada al fermentador junto con el medio de cultivo; pasado el tiempo de fermentación se centrifuga todo el caldo de fermentación para eliminar la biomasa, el sobrenadante se lleva al proceso de purificación. En este último, el sobrenadante es mezclado con acetato de etilo y separando por decantación, la fase orgánica rica en solvente y en el producto de interés se conduce a un proceso de separación por destilación en el cual se obtiene como producto de cimas el solvente, que es el menos volátil, mientras que por los fondos se obtiene el ácido láctico purificado.

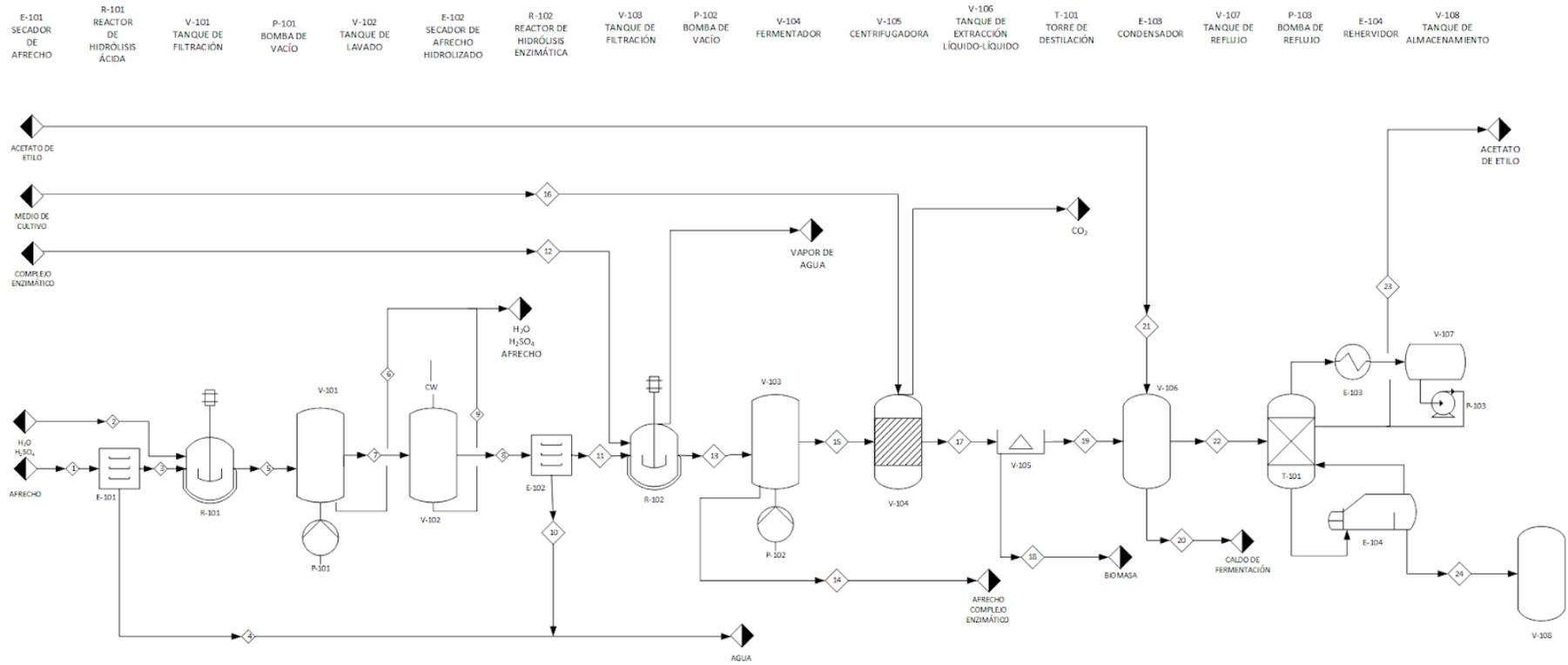
Las corrientes sólidas son conformadas por aquellas que contienen el afrecho de malta, como lo son las corrientes 1, 3, 7, 8, 11, 13 y 14. En el proceso de filtración se presenta una pérdida de afrecho de un 1% en masa, no obstante, el mayor contenido de la corriente es líquido. De igual manera, la corriente 18 es sólida, puesto que esta se compone en su totalidad de la biomasa obtenida en la fermentación láctica, que fue separada en el proceso de purificación.

En cuanto a las corrientes gaseosas, se presentan dos corrientes, la primera, consiste en una pérdida de vapor de agua en el reactor R-102, debido al proceso de calentamiento continuo durante 5 horas. La segunda corriente gaseosa es aquella obtenida en la fermentación láctica, que corresponde al resultado de la respiración del microorganismo.

El resto de las corrientes son corrientes líquidas, las cuales contienen los fluidos de proceso, estas son agua, ácido sulfúrico, acetato de etilo, complejo enzimático y por supuesto el compuesto de interés, el ácido láctico.

**Figura 39.**

*Diagrama PFD del proceso de producción de Ácido Láctico.*



**Nota.** Pese a que la producción se realizó a escala laboratorio, se plantea el diagrama para escala piloto.

## 5. CONCLUSIONES

Se comprobó la posibilidad de realizar la producción de ácido láctico a partir de la fermentación anaeróbica de un consorcio microbiano conformado por las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*, utilizando como fuente de carbono azúcares reductores obtenidos de la biomasa celulósica del afrecho de malta.

Los azúcares reductores fueron extraídos del afrecho de malta, a partir de la técnica de hidrólisis. Se realizaron dos reacciones de hidrólisis, siguiendo la metodología descrita en la literatura. La primera fue una hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  para la eliminación de lignina y hemicelulosa, mientras que la segunda fue una hidrólisis enzimática, realizada con un complejo enzimático de celulasa para el rompimiento de los enlaces glucosídicos de la celulosa. Al realizar la cuantificación de azúcares reductores totales, se determinó que la concentración de estos después del proceso de hidrólisis ácida fue de aproximadamente 2 g/L, mientras que, al concluir la hidrólisis enzimática, la concentración de azúcares reductores totales fue de 6 g/L.

Se realizó la fermentación láctica durante 42 horas, donde se utilizó el medio de cultivo evaluado y condiciones de operación, reportadas en literatura. Se determinó que el rendimiento biomasa-sustrato fue ligeramente superior en las fermentaciones, cuya fuente de carbono fue el afrecho de malta, en comparación con las fermentaciones de control utilizando glucosa, los valores para los rendimientos en las tres fermentaciones realizadas fueron de 0.299 g/g, 0.303 g/g y 0.280 g/g. Por otra parte, el rendimiento producto-sustrato fue superior en las fermentaciones de control y este valor para los fermentadores con la muestra de afrecho de malta fueron de 1.11 g/g, 1.126 g/g y 1.133 g/g. La productividad obtenida fue de 0.157 g/Lh, 0.158 g/Lh y 0.160 g/Lh. Las concentraciones de ácido láctico obtenidas en los tres fermentadores fueron de 6.593 g/L, 6.651 g/L y 6.708 g/L.

Finalmente, se realizó la purificación del ácido láctico por extracción líquido-líquido y destilación simple, según condiciones reportadas en literatura. La concentración final del ácido láctico purificado fue de 70 g/L, la cual fue similar a la del ácido láctico obtenido en la fermentación de control que fue de 72 g/L. Se llevó a cabo la comparación de propiedades fisicoquímicas, tales como la densidad, el índice de refracción y el punto de ebullición del ácido láctico purificado con soluciones preparadas de la misma concentración, cuyos valores fueron de 0.9831 g/cm<sup>3</sup>, 1.3866 y 108 °C, respectivamente; obteniendo en todos los casos errores relativos inferiores al 1%. Lo anterior, demuestra que, si es posible el proceso de producción de ácido láctico por vía biotecnológica a partir de afrecho de malta y la obtención de ácido láctico grado técnico.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Camacho and C. Grande “Bagazo de Malta (BSG): Biorresiduo con Potencial Aplicación a Nivel Funcional, Material y Energético”, *Prospectiva*, vol 19, No. 1, 2021, doi: <http://doi.org/10.15665/rp.v19i1.2472>. [Acceso May. 4, 2023]
- [2] J. Manfredo and N. Mouchard, “Elaboración de Proceso Producción de Cerveza Artesanal y su Mejoramiento mediante Técnicas de Recirculación de Levaduras en la Etapa de Fermentación”, Universidad de Ingeniería y Tecnología UTEC, Facultad de Ingeniería Química, 2020.
- [3] M. Morquecho, “Valorización del Bagazo de Malta para Producción de Biogás mediante Digestión Anaerobia y Comparación con su Digestato para Cultivo de *Pleurotus Ostreatus*”, Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ingeniería, 2020.
- [4] S. Mussatto, M. Fernandes, G. Dragone, G. Rocha, A. Milagres, I. Mancilha, I. Roberto, “Reaprovechamiento del Principal Subproducto de la Industria Cervecera en Procesos Biotecnológicos”, Universidad de São Paulo, Brasil, Departamento de Biotecnología, 2007.
- [5] M. Fernandes, “Análisis de Alternativas Tecnológicas e Ingeniería Conceptual de una Biorefinería Lignocelulósica”, Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla, 2008.
- [6] R. Heliodoro, R. Domínguez, J. Pacho, “Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación”. Universidad Nacional Autónoma de México. *Tecnología, Ciencia y Educación (IMIQ)* vol. 23, No. 2, 2008. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48223207>
- [7] J. Sánchez, L. Daza, V. Hernández, E. Castro, C. Cardona, “Análisis Tecno-Económico de una Biorefinería a Partir de Residuos del Plátano” *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, Issn:1390-1869, No. 13, 2015.
- [8] Djukić-Vuković, A., Mladenović, D., Radosavljević, M., Kocić-Tanackov, S., Pejin, J., & Mojović, L. “*Wastes from bioethanol and beer production as substrates for L(+) lactic acid production. A comparative study*”. *Waste Management*, 48, 478–482. 2016. doi: 10.1016/j.wasman.2015.11.031.
- [9] R. Plano, “La Industria Cervecera en Colombia”, para Banco de la República, 2017. Accessed: Apr. 08, 2023. [Online]. Available: <https://www.banrepcultural.org/bibliotecavirtual/credencial-historia/numero-260/la-industria-cervecera-en-colombia>.

- [10] M. Otálora and S. Iguarán, “Obtención de Papel Artesanal a Partir de Afrecho de Malta Proporcionada por la Empresa Merak Colombia”, Universidad de América, Facultad de Ingenierías, 2022.
- [11] F. Morales, “Experiencias en el Uso de Residuos de la Industria de Cerveza en Colombia y Ecuador” en Transformación de Subproductos de Agroindustria en Carne y Leche Bovina. 2015.
- [12] Bavaria S.A. , “Informe de Sostenibilidad 2021”, 2022.
- [13] P. S. Nigam, “An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery” Waste Management, vol. 62, pp. 255–261, Apr. 2017, doi: 10.1016/J.WASMAN.2017.02.018.
- [14] L. Dary, C. Pineda, L. Alfonso, C. Mesa, C. Arturo, and M. Riascos, “Ingeniería y Ciencia Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión 307|,” ing. cienc, vol. 8, No. 16, pp. 307–335, 2012, Accessed: Apr. 07, 2023. [Online]. Available: <http://www.eafit.edu.co/ingciencia>
- [15] M. Barroso, “Pretratamiento de Biomasa Celulósica para la Obtención de Etanol en el Marco de una Biorrefinería”. Universidad Politécnica de Madrid, 2010.
- [16] P. Carbonero, “Bioquímica de las Fermentaciones”, Universidad Politécnica de Madrid, 1975.
- [17] K. Shirai and F. Malpica, “Manual de Prácticas de Laboratorio Tecnología de Fermentaciones Alimentarias”. Universidad Autónoma Metropolitana. 2013.
- [18] H. Vázquez, “Fermentación Alcohólica: Una Opción para la Producción de Energía Renovable a Partir de Desechos Agrícolas”, Ingeniería Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259, 2007.
- [19] Y. Lin, W. Sun, G. Wang, H. Chen, X. Pei, Y. Jin, S. Yang and M. Wang, “Production of Butyric Acid from Hydrolysate of Rice Husk Treated by Alkali and Enzymes in Immobilized Fermentation by *Clostridium Tyrobutyricum*.” Fermentation 2022, 8, 531. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100531>.
- [20] D. Nelson and M. Cox. "Principles of Biochemistry". New York: W. H. Freeman And Company, pp 609-611, 2005.
- [21] A. Correa and M. Cuenca, “Evaluation of Lactic Acid Fermentation in a Dairy and NonDairy Beverage Using Two Commercial Starter Cultures”. Vitae, 29(2), 2022. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v29n2a347447>

- [22] M.T. Madigan, J.M. Martinko, K.S. Bender, D.H. Buckley, D.A. Stahl, Brock, “Biología de los Microorganismos”, 14a edición, (pp. 1131). 2015. Pearson Educación S.A.
- [23] C. Suriderp, “*Ullman’s Encyclopedia of Industrial Chemistry: Ácido Láctico*”. pp 97-104. 5 Edition. De Barbara Elvers. 1995.
- [24] C. García, G. Arrázola and A. Durang, “Producción de Ácido Láctico por Vía Biotecnológica”, *Temas Agrarios* - Vol. 15:(2), 2010.
- [25] L. Serna and A. Rodríguez, “Producción Biotecnológica de Ácido Láctico”, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, vol. 5, No. 1, pp. 54-65. ISSN: 1135-8122, 2005.
- [26] R. Gopal, M. Altaf, B. Naveena, M. Venkateshwar and E. Kumar, “*Amyolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation -A Review*”. *Biotechnology Advances* 26 (1): 22-24. 2008.
- [27] P. Rojan, G. Anisha, K. Madhavan, and A. Pandey, “*Direct Lactic Acid Fermentation: Focus on Simultaneous Saccharification and Lactic Acid Production.*”, *Biotechnology Advances* 27(2): 145–152. 2009.
- [28] Dirección de Impuestos y aduana de Colombia DIAN. Accessed: Apr. 08, 2023. [Online]. Available: <https://www legiscomex.com>
- [29] D. Chang, H. Jung, J. Rhee and Pan. “Producción Homofermentativa de Lactatos D O L Con E. Coli RRL”. *Microbiología Medioambiental*, 65(4), Pp, 1384-1389. 1999.
- [30] K. Hofvendahl, and H. Hagerdal, “*Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources*”. *Enzyme And Microbial Technology* 26, 87-107. 2000.
- [31] Centro Nacional de Información Biotecnológica. Resumen de compuestos de PubChem para CID 612, ácido láctico. 2023. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-Acid>.
- [32] S. H. Harsa and M. Gündüz, “*Lactic acid production by Lactobacillus casei NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads*”. *Izmir Institute of Technology*. 2005. <https://hdl.handle.net/11147/3269>
- [33] F. A. Castillo Martinez, E. M. Balciunas, J. M. Salgado, et al. “*Lactic acid properties, applications and production: A review*”. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70–83. 2013. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2012.11.007>
- [34] F. G. Orozco, “Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo”. Centro de Investigación de Yucatán, A.C. 2011.

- [35] Z. Dong, R. Zhou, W. Wan, H. Li, W. Zhou, Y. He, T. Xu, G. Xie, J. Xia, J. Li, L. Wang, X. Shi, T. Wu, R. Wang, B. Li. “*Hydrolysis of propyrisulfuron in water: Kinetics, influence of 34 environmental factors, transformation products identification, mechanisms and toxicities*”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 264, 2023, 115476, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115476>.
- [36] A. Quilez, L. Oliveira, C. Amezúa, A. López, M. Rodríguez, “*Evaluation of the acid hydrolysis as pre-treatment to enhance the integration and functionality of starch composites filled with rich-in-pectin agri-food waste orange peel*”, *Industrial Crops and Products*, Volume 205, 2023, 117407, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117407>.
- [37] E. Ahmad, K. Pant, Chapter 14, “*Lignin Conversion: A Key to the Concept of Lignocellulosic Biomass-Based Integrated Biorefinery*”, *Waste Biorefinery*, Elsevier, 2018, Pages 409-444, ISBN 9780444639929, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00014-8>.
- [38] J. Morales, J. Manso, A. Cid, C. Lodeiro, J. Mejuto, “*Degradation of carbofuran derivatives in restricted water environments: Basic hydrolysis in AOT-based microemulsions*”, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 372, Issue 1, 2012, Pages 113-120, ISSN 0021-9797, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.01.022>.
- [39] S. Wu, N. Zhang, C. Wang, X. Hou, J. Zhao, S. Jia, J. Zhao, X. Cui, H. Jin, T. Deng, “*An efficient and mild recycling of waste melamine formaldehyde foams by alkaline hydrolysis*”, *Green Energy & Environment*, 2022, ISSN 2468-0257, <https://doi.org/10.1016/j.gee.2022.10.008>.
- [40] J. Salcedo, J. López, L. Flórez, “*Evaluación de Enzimas para la Hidrólisis de Residuos (Hojas y Cogollos) de la Cosecha Caña de Azúcar*”, *Revistas Unal*, 2011.
- [41] J. Qi, Y. Wang, W. Chen, H. Tian, L. Li, H. Lai, W. Chan, “*Room temperature synthesis of titania microspheres by hydrolysis of titanium alkoxide using water vapor*”, *Journal of Alloys and Compounds*, Volume 413, Issues 1–2, 2006, Pages 307-311, ISSN 0925-8388, <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2005.06.067>.
- [42] Z. Lari, H. Ahmadzadeh, M. Hosseini, Chapter 2 “*Cell Wall Disruption: A Critical Upstream Process for Biofuel Production*”, *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts*, Woodhead Publishing, 2019, Pages 21-35, ISBN 9780128179376, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817937-6.00002-3>.

- [43] T. Wang, X. Lü, Chapter 8 “*Overcome saccharification barrier: Advances in hydrolysis technology*”, *Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production*, Woodhead Publishing, 2021, Pages 137-159, ISBN 9780128188620, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818862-0.00005-4>.
- [44] J. Domínguez and M. Vázquez, “*Effect of the Operational Conditions on the L-Lactic Acid Production by Rhizopus Oryzae*”. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria* 2(3), 113-118. 2. 1999.
- [45] S. Bulut, M. Elibol and D. Ozer, “*Effect of Different Carbon Sources on L(+)-Lactic Acid Production by Rhizopus Oryzae*”. *Biochemical Engineering Journal* 21, 33-37. 2004.
- [46] C. Akerberg, K. Hofvendahl and G. Zacchi, “*Modeling the Influence of pH, Temperature, Glucose and Lactic Acid Concentrations on the Kinetics of Lactic Acid Production by Lactococcus Lactis Ss Lactis Atcc 19435*” In *Whole-Wheat Flour. Applied Microbiology And Biotechnology* 49, 682-690. 1998.
- [47] B. Schäffer, S. Szalaly and D. Lórinezy, D, “*Examination of the Growth of Probiotic Culture Combinations by The Iso-peribolic Batch Calorimetry*”. *Thermochemical Acta* 415, 123-126. 2004.
- [48] R. Tejada, “*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 Nacional de Colombia. 2015.
- [49] Y. Shao , S. Gao , H. Guo and H., “*Influence of Culture Conditions and Preconditioning on Survival of Lactobacillus delbrueckii Subspecies Bulgaricus ND02 During Lyophilization*”. *American Dairy Science Association*, 2014. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7536>.
- [50] C. Rizzello and M. De Angelis, “*Lactic Acid Bacteria Lactobacillus Spp.: Lactobacillus delbrueckii Group*”, Editor(S): John W. Fuquay, *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, Academic Press, 2011, Pages 119-124, ISBN: 9780123744074, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00264-8>.
- [51] P. Teixeira, “*Lactobacillus Lactobacillus Bulgaricus, Richard K. Robinson*”, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 1999, Pages 1136-1144, ISBN: 9780122270703, <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0895>.
- [52] G. W. Tannock, “*Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects, Horizon Scientific Press*”, 2005, p. 43

- [53] I. Barrientos, “Evaluación Preliminar de la Actividad Metabólica de *Candida Guilliermondii* sobre las Propiedades Fisicoquímicas de la Leche y en el Proceso de Producción de Yogurt”, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2011.
- [54] J. Harnett, G. Davey, A. Patrick, C. Caddick, and L. Pearce, “*Lactic Acid Bacteria Streptococcus thermophilus*” Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition, pp. 143–148, Jan. 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00268-5.
- [55] J. Ramírez, P. Rosas, M. Velázquez, J. Ulloa and F. Arce. “Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud” Revista Fuente. ISSN 2007-0713. 2011.
- [56] M. Guauque and S. Gómez, “Ácido Láctico: una Revisión sobre los Métodos de Determinación y Purificación” Biociencias Vol.14 No. 2. 2019 pp. 149-175.
- [57] J. Steiner, S. Procopio and T. Becker, “*Brewer’s spent grain: Source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims*”, Eur. Food Res. Technol. 241, 303–315, 2015.
- [58] C. Xiros and P. Christakopoulos, “*Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications*”, Waste Biomass Valorization 3, 213–232. 2012.
- [59] L. Burgos, “Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico”. Revista de Investigación, 13(1), 57–66. 2020. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>.
- [60] A. S. Douglas, F. J. Holler, S. R. Crouch, “*Principles of Instrumental Analysis*” Cengage Learning, Seventh edition, 2018.
- [61] G. Alvarado, “Obtención de Bioetanol a partir del bagazo de la caña de azúcar mediante Hidrólisis Enzimática”. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca - Ecuador, 2021. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/21229>.
- [62] A. Suesca, “Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de trichoderma sp. con biomasa lignocelulósica”. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. 2012. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10652>.
- [63] BeerLab. *Yogurt Culture* YF-L811. Accessed: Oct. 07, 2023. [Online]. Available: <https://www.beerlab.co.za/products/yogurtcultureyf-l811>.
- [64] Z.P. Xue, X. Cu, K. Xu, J.H. Peng, H.R. Liu, R.T. Zhao, Z. Wang, T. Wang, Z.S. Xu, “*The effect of glutathione biosynthesis of Streptococcus thermophilus ST-1 on cocultured Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus ATCC11842*”, Journal of Dairy

- Science, Volume 106, Issue 2, 2023, Pages 884-896, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22123>.
- [65] N. Ángel, Á. Cuestas, “Obtención de Ácido Cítrico a partir de Yacón mediante Fermentación Utilizando la Cepa de *Aspergillus Niger* CMPUJH002”, Universidad de América, Facultad de Ingenierías, 2021.
- [66] C. Arnaiz, L. Isac, L. Martínez. “Determinación de la biomasa en procesos biológicos”, Capítulo I Métodos directos e indirectos, Tecnología del Agua, 2000, pp. 45-52.
- [67] M. Shuler, F. Kargi, Chapter 6, “*How Cells Grow*”, Bioprocess Engineering Basic Concepts, Prentice Hall International, 2002, Page 158, ISBN 0130819085.
- [68] A. Castells, “Evaluación del potencial de producción de ácido láctico mediante cepas de *Bacillus subtilis*”, Universidad San Francisco, 2018.
- [69] L. Borshchevskaya, T. Gordeeva, A. Kalinina, S. Sineokii, “*Spectrophotometric determination of lactic acid*”. Journal of Analytical Chemistry, Vol. 71, No. 8, pp. 755–758. 2016. ISSN 1061-9348. <https://doi.org/10.1134/S1061934816080037>.
- [70] M. Arias, L. Henao, Y. Castrillón, “Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con *Lactobacillus bulgaricus* NRRL-B548”. Dyna, No 158, pp. 147-153. 2009. ISSN 0012-7353.
- [71] P. Doran, Chapter 4 “Material Balances”, Bioprocess Engineering Principles, Elsevier Science & Technology Books, 1995, pp 79-80, ISBN: 0122208552.
- [72] A. Scragg, “Biotecnología para ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos”, Editorial Limusa, 2002, ISBN: 9681847083, 9789681847081.
- [73] R. Tello, “Procedimiento de extracción de ácido láctico de un caldo de fermentación microbiana en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala”, Universidad del Valle de Guatemala, 2021.
- [74] Carl Roth. “Éster etílico del ácido acético”. [s/f]. Disponible: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-4424-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNlY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyOTc5NTB8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGg4MS9oZGIvOTEyNTMxMzcwODA2Mi9TREJfNDQyNF9FU19FUy5wZGZ8MDZiYWZiNmI4ZWl2NDlkNDc0ZjYxMzYzM2Q5YzBkNGFiOWVhM2M3ZmVmNzRiNDZkYmI4NTI3ZjY3M2M0ZTc1YQ>
- [75] L. Atarés, “Determinación de la densidad de un líquido con el método del picnómetro”. Departamento de Tecnología de Alimentos. ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia.

- [76] H. Durst, G. Gokel, "Química Orgánica Experimental". Editorial Reverté, Barcelona, 1985. ISBN 9788429171556.
- [77] "ICSC 1597 - ACEITE MINERAL (PETRÓLEO)". International Labour Organization. Disponible en:  
[https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_lang=es&p\\_card\\_id=1597&p\\_version=2](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=1597&p_version=2)
- [78] R. Perry, "Manual del ingeniero químico" Octava edición. McGraw-Hill. México. Sección 2. pp. 96. doi: 10.1036/0071511253.
- [79] L. Serna, A. Rodríguez, "Producción Económica de Ácido Láctico Utilizando Residuos de Cosecha y Jugos de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.)". Agricultura Técnica. Vol 67. No.1. ISSN 0365-2807. 2007. DOI: 10.4067/S0365-28072007000100004.
- [80] Carl Roth. "Ácido láctico". [s/f]. Disponible: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-8460-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMTgzMjJ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNjEvaGI3LzkwNDU1MTM2OTkzNTgucGRmfDBjMzVlMTc3YjNhZWVjNTAxMWQ1OTIzZDAwZmUxMzNjOTJiYWE1Y2M4NGVmZDY1NzY2ZjIxYzhhNGM4ZjQxNjg>.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1.

## FICHA DE SEGURIDAD DEL ÁCIDO LÁCTICO.

### Figura 40.

Ficha de seguridad del Ácido Láctico.

Ácido láctico 80 %, de ese  $\geq 95\%$  L (+) - ácido láctico



número de artículo: 8460

#### Consejos de prudencia - respuesta

P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua  
P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado  
P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico

#### Información suplementaria sobre los peligros

EUH071 Corrosivo para las vías respiratorias.

Componentes peligrosos para el etiquetado: Ácido L-láctico

#### Etiquetado de los envases cuyo contenido no excede de 125 ml

Palabra de advertencia: Peligro

Símbolo(s)



H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.  
P280 Llevar guantes/gafas de protección.  
P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.  
P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.  
EUH071 Corrosivo para las vías respiratorias.  
contiene: Ácido L-láctico

### 2.3 Otros peligros

Riesgo de resbalamiento en caso de escurrimiento/derrame del producto.

#### Resultados de la valoración PBT y mPmB

La evaluación de esta mezcla determina que no contiene sustancias que sean PBT o mPmB.

*Nota.* Se evidencia que el ácido láctico es corrosivo.

Tomado de: "Ácido láctico". Carl Roth. Disponible: [100](https://www.carlroth.com/medias/SDB-8460-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wzMTgzMjJ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oNjEvaGI3LzkwNDU1MTM2OTkzNTgucGRmfDBjMzVIMTc3YjNhZWRjNTAxMWQ1OTIzZDAwZmUxMzNjOTJiYWE1Y2M4NGVmZDY1NzY2ZjIxYzhhNGM4ZjQxNj. [80].</a></p></div><div data-bbox=)

**ANEXO 2.**  
**FICHA TÉCNICA CARACTERIZACIÓN BAGAZO DE MALTA REALIZADA EN**  
**EL LABORATORIO AGRILAB.**

**Figura 41.**

*Ficha técnica caracterización bagazo de malta realizada en el laboratorio Agrilab.*

	<b>INFORME DE RESULTADOS</b> ÁREA DE ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS			
<b>Informe N°</b>	<b>35098-V1-2023</b>	<b>N° de Laboratorio</b>	<b>ABR-00488-2023</b>	
<b>Información del Cliente</b>				
<b>Remitente</b>	MARIA CATALINA SILVA VARGAS	<b>Responsable</b>	SRA. MARIA CATALINA SILVA VARGAS	
<b>Propietario</b>	SRA. MARIA CATALINA SILVA VARGAS / SR. FELIPE SOLER	<b>Email contacto</b>	maria.silva@estudiantes.uamerica.edu.co; juan.soler@estudiantes.uamerica.edu.co	
<b>Fecha Ingreso</b>	31-08-2023	<b>Fecha Emisión</b>	14-09-2023	
<b>Información de la Muestra enviada por el cliente</b>				
<b>Cultivo / Variedad</b>	NO_ESPECIFICADO - NO ESPECIFICADO	<b>Lote / Bloque</b>	N.S.	
<b>Municipio/Departamento/Finca</b>	BOGOTA, D.C. - BOGOTA	N.S.	<b>Contrato N°</b>	
<b>Información adicional</b>	AFRECHO DE MALTA	<b>Condiciones recepción</b>	CONFORME	
<b>ANÁLISIS BROMATOLÓGICO PARCIAL</b>				
<b>Descripción Física de la Muestra</b>		AFRECHO		
<b>Variable</b>	<b>Expresión /Sigla</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidades</b>	<b>Extractante/Técnica/Referencia</b>
Humedad	N.A.	5.95	%	70 °C / Gravimétrico / Bernal 1994
Cenizas	Fración Mineral	2.75	%	700 °C / Gravimétrico / Bernal 1994
Pérdidas por Volatilización	N.A.	97.2	%	Cálculo
<b>CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA</b>				
Fibra Detergente Ácida	FDA	26.4	%	Detergente Ácido / Gravimétrico / ICA 1985
Fibra Detergente Neutra	FDN	48.0	%	Detergente Neutro / Gravimétrico / ICA 1985
Lignina	N.A.	7.97	%	Sin. Ácido Sulfúrico / Gravimétrico / ICA 1985
Celulosa	N.A.	15.7	%	Cálculo
Hemicelulosa	N.A.	21.6	%	Cálculo
<b>Observaciones a los resultados:</b>		<b>Convenciones:</b>		
NINGUNO		N.R. No registra / N.A. No Aplica / Sin. Solución / N.S. No Suministrada / N.D.No Detectado / MVH Mineralización Vía Húmeda / M.I. Muestra Insuficiente EAA Espectroscopia de Absorción Atómica / EAA Espectroscopia de Emisión Atómica		

---- Fin del Reporte de Resultados Analíticos ----

*Nota.* Caracterización de la muestra de afrecho de malta correspondiente al tipo *Pale Ale* y *Caramelo*.

## ANEXO 3. FICHA TÉCNICA COMPLEJO ENZIMÁTICO DE CELULASA.

**Figura 42.**

*Ficha técnica complejo enzimático de celulasa.*

### PRODUCT DESCRIPTION - PD 263064-2.10EN

#### FoodPro® CBL

##### Description

FoodPro® CBL is an enzyme complex hydrolysing beta-glucans and non-starch polysaccharides like arabinoxylans.

FoodPro® CBL is produced by fermentation with a selected strain of *Trichoderma reesei*.

##### Application areas

Food carbohydrate processing  
Plant carbohydrate hydrolysis

##### Potential benefits

- Cellulase complex

##### Usage levels

Typical dosage rate 0.25 - 1 %

However, test should be carried out to find optimal dosage.

##### Composition

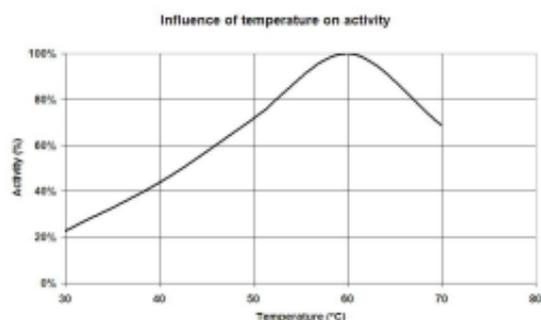
FoodPro® CBL is composed of:

- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| • Water             | 55 - 66 % (w/w)     |
| • Cellulase         | 15 - 20 % (w/w)     |
| • Sorbitol          | 15.0 - 19.0 % (w/w) |
| • Sodium chloride   | 4.0 - 5.0 % (w/w)   |
| • Sodium benzoate   | 0.00 - 0.50 % (w/w) |
| • Potassium sorbate | 0.00 - 0.50 % (w/w) |

##### Physical/chemical specifications

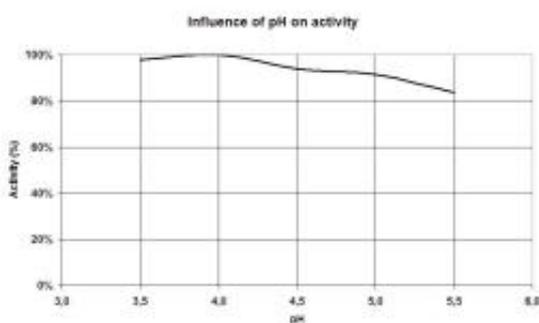
Physical form	liquid
Colour*	clear brown
Specific gravity	1,15 +/- 0,03 kg/l
Activity	min. 1500 AZO BBG U/g
Activity	min. 6200 IU/g

\*Colour may vary from batch to batch.



## PRODUCT DESCRIPTION - PD 263064-2.10EN

### FoodPro® CBL



The data for the graphs are generated under laboratory conditions and may not reflect performance in the application. It is therefore recommended to evaluate the performance under the specific local conditions.

#### Microbiological specifications

Total viable count	less than 10000 /ml
Coliforms	less than 15 /ml
E. coli	absent in 25 ml
Salmonella species	absent in 25 ml
Yeast	less than 10 /ml
Mould	less than 10 /ml

#### Heavy metal specifications

Arsenic	less than 3 mg/kg
Lead	less than 5 mg/kg
Heavy metals (as Pb)	less than 30 mg/kg

#### Nutritional data

Calculated values per 100 g

Energy	120/510 kcal/kJ
Protein	11-16 g
Fat	less than 1 g
Carbohydrates	14-19 g
Moisture	60-70 g
Ash	4-6 g

#### Storage

FoodPro® CBL should be stored dry and cool (max. 10°C/50°F) and sheltered against direct sunlight

#### Packaging

28 kg plastic can  
225 kg plastic drum  
1125 kg transparent container

#### Purity and legal status

FoodPro® CBL meets the specifications laid down by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC) and is GRAS (Generally Recognized as Safe) in the US. When used as a processing aid under 21 CFR 101.00, it may exempt from FDA labelling requirements and is typically not labelled.

FoodPro® CBL is approved by most countries for use in food. However, as legislation regarding its use in food may vary from country to country, local food regulations should always be consulted concerning the status of this product. Advice regarding the legal status of this product may be obtained on request. Users of this product should be aware of the process described in US 8822201 and its family members (eg. EP 2118247) for use in plant seeds.

*Nota.* A partir de esta, se determinaron las condiciones de operación de la hidrólisis enzimática.

**ANEXO 4.**  
**RESULTADOS DEL CÁLCULO DEL ERROR RELATIVO DE LA ACTIVIDAD**  
**ENZIMÁTICA.**

Para realizar estos cálculos se toman los datos de las tablas 8 y 9, los cuales se emplean la ecuación 5.

- Actividad en t = 0 h.

$$\%ER = \frac{|32.223 - 33.388|}{33.388} \cdot 100$$
$$\%ER = 3.49 \%$$

- Actividad en t = 1 h.

$$\%ER = \frac{|41.929 - 43.482|}{43.482} \cdot 100$$
$$\%ER = 3.57 \%$$

- Actividad en t = 2 h.

$$\%ER = \frac{|51.246 - 53.187|}{53.187} \cdot 100$$
$$\%ER = 3.65 \%$$

- Actividad en t = 3 h.

$$\%ER = \frac{|58.234 - 60.175|}{60.175} \cdot 100$$
$$\%ER = 3.23 \%$$

- Actividad en t = 4 h.

$$\%ER = \frac{|65.999 - 67.164|}{67.164} \cdot 100$$
$$\%ER = 1.73 \%$$

- Actividad en t = 5 h.

$$\%ER = \frac{|78.422 - 78.034|}{78.034} \cdot 100$$
$$\%ER = 0.50 \%$$

**ANEXO 5.**  
**IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS TOMADAS EN LA FERMENTACIÓN**  
**LÁCTICA.**

**Tabla 28.**

*Identificación de las muestras tomadas en la fermentación láctica.*

<b>Muestreo</b>	<b>Muestra</b>	<b>Número de identificación</b>
1 t = 0 h	Inicial Erlenmeyer 1A	1
	Inicial Erlenmeyer 2A	2
	Inicial Erlenmeyer 3A	3
	Inicial Erlenmeyer 1B	4
	Inicial Erlenmeyer 2B	5
2 t = 18 h	Intermedio 1 Erlenmeyer 1A	6
	Intermedio 1 Erlenmeyer 2A	7
	Intermedio 1 Erlenmeyer 3A	8
	Intermedio 1 Erlenmeyer 1B	9
	Intermedio 1 Erlenmeyer 2B	10
3 t = 21 h	Intermedio 2 Erlenmeyer 1A	11
	Intermedio 2 Erlenmeyer 2A	12
	Intermedio 2 Erlenmeyer 3A	13
	Intermedio 2 Erlenmeyer 1B	14
	Intermedio 2 Erlenmeyer 2B	15
4 t = 24 h	Intermedio 3 Erlenmeyer 1A	16
	Intermedio 3 Erlenmeyer 2A	17

	Intermedio 3 Erlenmeyer 3A	18
	Intermedio 3 Erlenmeyer 1B	19
	Intermedio 3 Erlenmeyer 2B	20
5 t = 42 h	Final Erlenmeyer 1A	21
	Final Erlenmeyer 2A	22
	Final Erlenmeyer 3A	23
	Final Erlenmeyer 1B	24
	Final Erlenmeyer 2B	25

**Nota.** La tabla permite identificar todas las muestras tomadas en el seguimiento de la fermentación láctica.

**ANEXO 6.**  
**RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA, SUSTRATO Y PRODUCTO EN**  
**FERMENTACIÓN LÁCTICA.**

**Tabla 29.**

*Resultados cuantificación de biomasa, sustrato y producto en fermentación láctica.*

Muestra	Absorbancia 540 nm	Concentración (g/L)	Absorbancia 600 nm	Concentración (g/L)	Absorbancia 390 nm	Concentración (g/L)
1	1.422	5.944	0.329	0.904	0.000	0.000
2	1.419	5.932	0.339	0.935	0.000	0.000
3	1.416	5.919	0.384	1.074	0.000	0.000
4	1.483	6.200	0.4	1.123	0.000	0.000
5	1.474	6.162	0.44	1.247	0.000	0.000
6	0.671	2.795	0.525	1.510	0.294	2.249
7	0.666	2.774	0.531	1.528	0.307	2.342
8	0.657	2.737	0.539	1.553	0.311	2.371
9	0.682	2.842	0.543	1.566	0.334	2.537
10	0.674	2.808	0.547	1.578	0.337	2.558
11	0.513	2.133	0.638	1.859	0.512	3.819
12	0.506	2.104	0.642	1.872	0.517	3.855
13	0.497	2.066	0.649	1.893	0.524	3.906
14	0.587	2.443	0.65	1.896	0.541	4.028
15	0.575	2.393	0.664	1.940	0.548	4.079
16	0.374	1.550	0.787	2.320	0.734	5.419
17	0.37	1.533	0.814	2.404	0.742	5.476
18	0.365	1.512	0.817	2.413	0.744	5.491
19	0.384	1.592	0.821	2.425	0.762	5.620
20	0.379	1.571	0.826	2.441	0.766	5.649
21	0.017	0.053	0.898	2.663	0.897	6.593
22	0.01	0.024	0.917	2.722	0.905	6.651
23	0	0.000	0.92	2.731	0.913	6.708
24	0	0.000	0.925	2.747	0.974	7.148
25	0	0.000	0.928	2.756	0.982	7.205

*Nota.* La tabla muestra los resultados cuantificación de biomasa, sustrato y producto en fermentación láctica.

**ANEXO 7.**  
**CÁLCULO DEL RENDIMIENTO BIOMASA-SUSTRATO.**

Se realiza el cálculo a partir de la ecuación 3, y se emplean los datos de la tabla 29.

- Fermentador 1A

$$Y_{X/S} = \frac{2.663 \frac{g}{L} - 0.904 \frac{g}{L}}{5.944 \frac{g}{L} - 0.053 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{X/S} = 0.299 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 2A

$$Y_{X/S} = \frac{2.722 \frac{g}{L} - 0.935 \frac{g}{L}}{5.932 \frac{g}{L} - 0.024 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{X/S} = 0.303 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 3A

$$Y_{X/S} = \frac{2.731 \frac{g}{L} - 1.074 \frac{g}{L}}{5.919 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{X/S} = 0.280 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 1B

$$Y_{X/S} = \frac{2.747 \frac{g}{L} - 1.123 \frac{g}{L}}{6.200 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{X/S} = 0.262 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 2B

$$Y_{X/S} = \frac{2.756 \frac{g}{L} - 1.247 \frac{g}{L}}{6.162 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{X/S} = 0.245 \frac{g}{g}$$

**ANEXO 8.**  
**CÁLCULO DEL RENDIMIENTO PRODUCTO-SUSTRATO.**

Se realiza el cálculo a partir de la ecuación 4, y se emplean los datos de la tabla 29.

- Fermentador 1A

$$Y_{P/S} = \frac{6.593 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}{5.944 \frac{g}{L} - 0.053 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{P/S} = 1.119 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 2A

$$Y_{P/S} = \frac{6.651 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}{5.932 \frac{g}{L} - 0.024 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{P/S} = 1.126 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 3A

$$Y_{P/S} = \frac{6.708 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}{5.919 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{P/S} = 1.133 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 1B

$$Y_{P/S} = \frac{7.148 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}{6.200 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{P/S} = 1.153 \frac{g}{g}$$

- Fermentador 2B

$$Y_{P/S} = \frac{7.205 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}{6.162 \frac{g}{L} - 0.000 \frac{g}{L}}$$
$$Y_{P/S} = 1.169 \frac{g}{g}$$

## ANEXO 9.

### TRATAMIENTO ESTADÍSTICO REALIZADO A LA FERMENTACIÓN LÁCTICA.

Se realiza una comparación entre tratamientos, en la cual se presenta la hipótesis nula ( $H_0$ ) y la hipótesis alternativa ( $H_A$ ):

$$H_0: \mu_A = \mu_B$$

$$H_A: \mu_A \neq \mu_B$$

Cuyo criterio de rechazo es que se rechaza  $H_0$  si:

$$|t_0| > t_{\alpha/2}$$

El estadístico de prueba es:

$$t_0 = \frac{\bar{A} - \bar{B}}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}}} \quad (7)$$

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_A - 1)S_A^2 + (n_B - 1)S_B^2}{n_A + n_B - 2}} \quad (8)$$

Con los datos de la tabla 30 se realiza el cálculo para sustrato, biomasa y producto.

- *Sustrato:*

$$n_A = 3$$

$$n_B = 2$$

$$\bar{A} = 0.0257163$$

$$\bar{B} = 0$$

$$S_A^2 = 0.0007114$$

$$S_B^2 = 0$$

$$S_p = 0.0217769$$

Siendo:

$\bar{A}$  = Promedio de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono el afrecho de malta (A).

$\bar{B}$  = Promedio de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono glucosa (B).

$S_A^2$  = Varianza de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono el afrecho de malta (A).

$S_B^2$  = Varianza de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono glucosa (B).

$$t_0 = 1.2936$$

$$t_{\alpha/2} = 3.18245$$

No existen diferencias significativamente estadísticas entre los dos tratamientos.

- *Biomasa:*

$$n_A = 3$$

$$n_B = 2$$

$$\bar{A} = 2.705524634$$

$$\bar{B} = 2.751391466$$

$$S_A^2 = 0.001360901$$

$$S_B^2 = 0.000430261$$

$$S_p = 0.030358022$$

Siendo:

$\bar{A}$  = Promedio de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono el afrecho de malta (A).

$\bar{B}$  = Promedio de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono glucosa (B).

$S_A^2$  = Varianza de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono el afrecho de malta (A).

$S_B^2$  = Varianza de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono glucosa (B).

$$t_0 = -1.65506819$$

$$t_{\alpha/2} = 3.18245$$

No existen diferencias significativamente estadísticas entre los dos tratamientos.

- *Producto:*

$$n_A = 3$$

$$n_B = 2$$

$$\bar{A} = 6.6505764$$

$$\bar{B} = 7.176512968$$

$$S_A^2 = 0.003322011$$

$$S_B^2 = 0.001661005$$

$$S_p = 0.052615039$$

Siendo:

$\bar{A}$  = Promedio de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono el afrecho de malta (A).

$\bar{B}$  = Promedio de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono glucosa (B).

$S_A^2$  = Varianza de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono el afrecho de malta (A).

$S_B^2$  = Varianza de los valores de las fermentaciones que tienen como fuente de carbono glucosa (B).

$$t_0 = -10.95$$

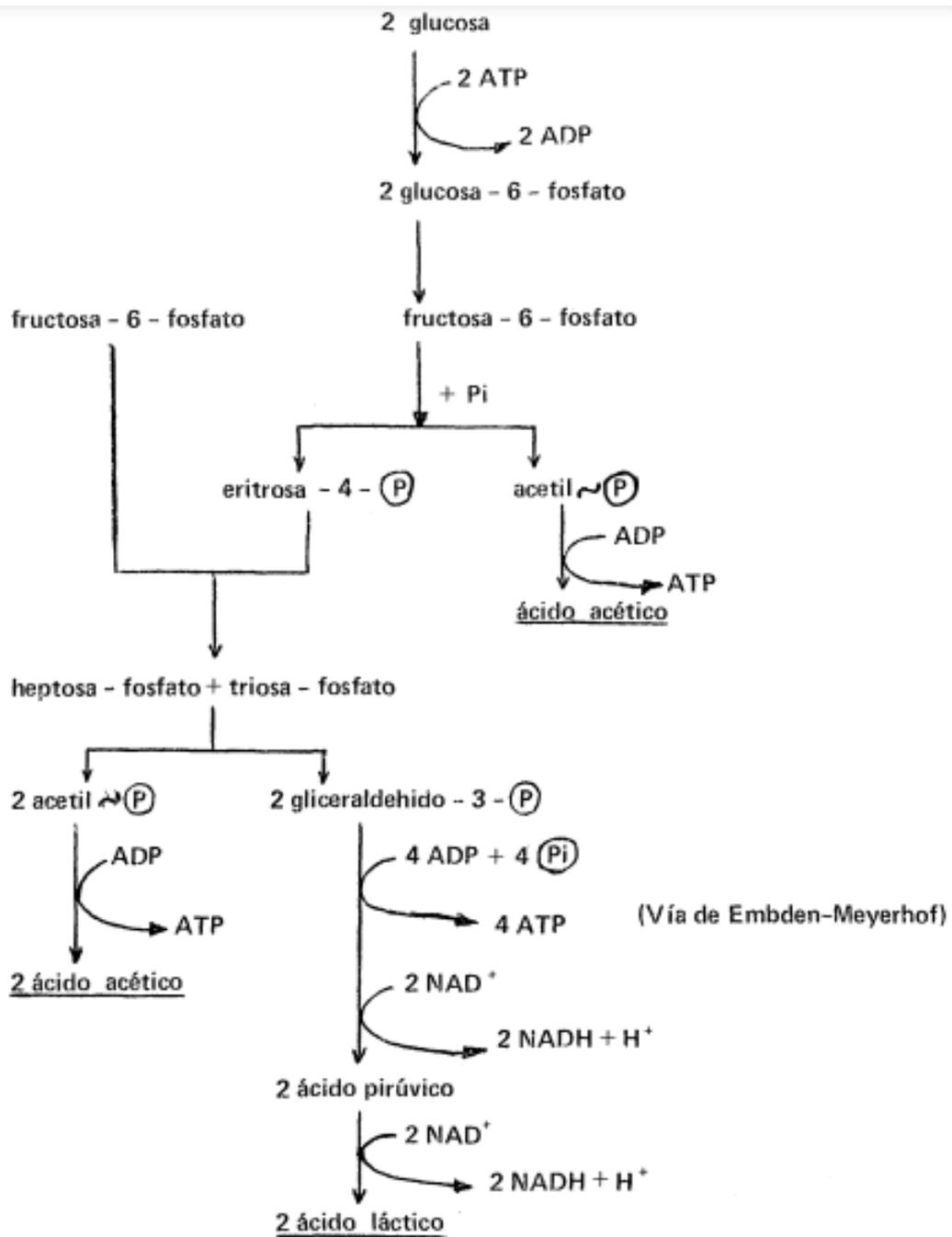
$$t_{\alpha/2} = 3.18245$$

Sí existen diferencias significativamente estadísticas entre los dos tratamientos.

**ANEXO 10.  
RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.**

**Figura 43.**

*Ruta metabólica para la producción de Ácido Láctico.*



*Nota.* Ruta metabólica realizada por las bacterias lácticas en la fermentación láctica.

Tomado de: P. Carbonero, "Bioquímica de las Fermentaciones", Universidad Politécnica de Madrid, 1975. [16].

**ANEXO 11.**  
**RESULTADOS COMPARATIVOS DE LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**  
**CON DIFERENTES SOLVENTES.**

**Tabla 30.**

*Resultados comparativos de la extracción de ácido láctico con diferentes solventes.*

Solvente	Concentración máxima de ácido láctico (%m/v)	Masa de ácido láctico extraído (g)	% de recuperación de ácido láctico
Octanol	5.035	1.737	23.16
Alcohol isoamílico	4.911	1.621	21.61
Éter isopropílico	4.741	1.565	20.86
Alcohol isobutílico	5.358	1.500	20.00
1-Butanol	4.066	1.464	19.52
Éter dietílico	5.023	1.457	19.42
Acetato de etilo	5.351	1.284	17.12

*Nota.* La tabla presenta los resultados en la evaluación de la extracción líquido líquido para obtener ácido láctico mediante diferentes solventes.

Tomado de: R. Tello, “Procedimiento de extracción de ácido láctico de un caldo de fermentación microbiana en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala”, Universidad del Valle de Guatemala, 2021. [70].

## **ANEXO 12. RECOMENDACIONES**

1. Para la presente investigación se probaron 3 medios: caldo Nutritivo, caldo MRS y caldo Sabouraud. Se evidenció crecimiento, únicamente, en el caldo Sabouraud, este último no tenía presencia de Cloranfenicol. Pese a que se realizó la inoculación con este, se debe seguir en la búsqueda de un medio más apropiado para el crecimiento de las bacterias lácticas utilizadas.
2. Para una posterior investigación, es importante realizar nuevamente curvas de calibración para azúcares reductores, biomasa y ácido láctico, para la verificación y comparación de resultados.
3. Dado el problema que se abarca por la cantidad de residuo generado y la gran importancia del ácido láctico como materia prima, se invita a continuar esta línea de investigación y mejorar cada vez más los métodos para una mayor eficiencia.
4. Todas las pruebas de cuantificación deben ser preparadas con total rigor, verificando la pureza y composición de reactivos, utilizando elementos de medición perfectamente calibrados y evitando todas las posibles pérdidas.