

ANÁLISIS DE DATOS CINÉTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
LÁCTICO A PARTIR DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN UN
SUSTRATO COMPLEJO

DANIELA SUAREZ OSPINA

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

ANÁLISIS DE DATOS CINÉTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
LÁCTICO A PARTIR DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN UN SUSTRATO
COMPLEJO

DANIELA SUAREZ OSPINA

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

Director:
Yovanny Morales Hernández
Ingeniero Químico

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

Nota De Aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá D.C., 13 de abril de 2018

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos.

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano Facultad de Ingeniería

Ing. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI

Director General de Investigación y Proyección Social

Dr. MANUEL CANCELADO JIMÉNEZ

Director Programa Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

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

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	15
1. MARCO DE REFERENCIA	16
1.1 EL ÁCIDO LÁCTICO Y SUS PROCESOS DE OBTENCIÓN	16
1.2 FERMENTACIÓN POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (LAB)	17
1.2.1 Fermentación homoláctica	17
1.2.2 Fermentación ácida mixta	18
1.3 CROMATOGRAFÍA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)	19
1.3.1 Principios	19
1.3.2 Equipo y su funcionamiento	20
1.4 MODELOS CINÉTICOS	22
1.4.1 Modelos no estructurados no segregados	22
1.4.2 Modelos segregados	22
1.4.3 Modelos estructurados	23
1.4.4 Modelos estructurados segregados	23
2. OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	24
2.1. CEPA BACTERIANA	24
2.2. SUSTRATO	25
2.3 FERMENTACIÓN	27
2.3.1. Preparación del medio de cultivo	28
2.3.3 Pre inóculo	31
2.3.4 Inoculación, incubación y muestreo	31
3. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE ÁCIDO LÁCTICO EN EL TIEMPO	34
3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS	34
3.1.1 Centrifugación	34
3.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS	35
3.3 RESULTADOS	36
4. MODELOS CINÉTICOS	38
4.1 MODELO DE LUEDEKING-PIRET	38
4.2 MODELO DE LUEDEKING-PIRET MODIFICADO	40
4.3 MODELO LOGÍSTICO	41
4.4 MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO	42
4.5 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS	43
4.6 RESULTADOS	44

5. CONCLUSIONES	48
6. RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	54

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Vía Embden-Meyerhof-Parnas	18
Figura 2. Vía de la pentosa	19
Figura 3. Diagrama básico de un HPLC	20
Figura 4. Cepa bacteriana adquirida	25
Figura 5. Piña de la variedad Perolera adquirida para la fermentación	26
Figura 6. Piña analizada según la NTC 4102	29
Figura 7. Resultados de la prueba de sólidos solubles totales de la piña adquirida	29
Figura 8. Piña pelada y picada	30
Figura 9. Mezcla del neutralizador con el medio de cultivo	31
Figura 10. Inoculación del medio en cabina de bioseguridad	32
Figura 11. Incubadora con control de temperatura y agitación continua	32
Figura 12. Muestra a centrifugar	34
Figura 13. Montaje de filtración al vacío	35

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Características de la bacteria <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
Tabla 2. Nutrientes del fruto de piña en estado maduro	27
Tabla 3. Nutrientes promedio de todas las variedades de piña cruda	27
Tabla 4. Parámetros iniciales para el ajuste de cada modelo	43
Tabla 5. Valores estimados de los parámetros correspondientes a cada modelo	46
Tabla 6. Coeficiente de determinación (R^2) y raíz cuadrada media (RMSE) de cada modelo.	46

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Ecuación de Luedeking-Piret	39
Ecuación 2. Modelo Logístico de crecimiento	39
Ecuación 3. Velocidad específica de crecimiento	39
Ecuación 4. Concentración de biomasa	40
Ecuación 5. Solución analítica del modelo de Luedeking-Piret	40
Ecuación 6. Variación sigmoidea de la ecuación de concentración de biomasa	40
Ecuación 7. Formación de producto para el modelo de Luedeking-Piret modificado	41
Ecuación 8. Modificación de formación de producto para el modelo de Luedeking-Piret modificado	41
Ecuación 9. Solución analítica del modelo de Luedeking-Piret modificado	41
Ecuación 10. Formación de producto para el modelo de Logístico	41
Ecuación 11. Solución analítica del modelo Logístico	42
Ecuación 12. Modelo de Gompertz modificado de crecimiento microbiano	42
Ecuación 13. Solución analítica del modelo de Gompertz modificado	42

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Producción colombiana de piña	55
Anexo B. Evaluación de la madurez de la piña	56
Anexo C. Curva de calibración	57
Anexo D. Cromatogramas de las muestras Analizadas por hplc.	58

NOMENCLATURA

P	Concentración de producto (g/L)
α	Coefficiente asociado al crecimiento para la formación de producto
X	Concentración de biomasa (g/L)
t	Tiempo (h)
μ	Velocidad específica de crecimiento (L/h)
K	Constante cinética del modelo Logístico (L/h)
X_{max}	Concentración máxima de biomasa (g/L)
X_0	Concentración de biomasa inicial (g/L)
P_0	Concentración inicial de producto (g/L)
$Y_{P/X}$	Rendimiento del producto por concentración de biomasa
Δt	Tiempo de retraso (h)
N	Densidad bacteriana (U.O.D/mL)
N_{max}	Densidad bacteriana máxima (U.O.D/mL)
P_m	Concentración máxima de producto (g/L)
β	Coefficiente no asociado al crecimiento para la formación de producto
$r_{p,m}$	Velocidad máxima de producción del metabolito (g/L h)
t_L	Fase de latencia o inicio de la fermentación exponencial (h)

Subíndices

0	Valor inicial
<i>max</i>	Valor máximo

RESUMEN

Este trabajo de investigación tiene como fin ajustar un modelo cinético que describa satisfactoriamente la producción de ácido láctico por la bacteria *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación del sustrato seleccionado.

Primero, se llevó a cabo la fermentación del medio complejo compuesto de piña de la variedad Perolera en estado avanzado de maduración, empleando la bacteria *Lactobacillus acidophilus* en condiciones controladas de temperatura y agitación. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 12 horas durante 108 horas para posteriormente analizarlas en el cromatógrafo líquido de alto rendimiento y determinar la cinética experimental de la producción de ácido láctico.

Posteriormente, se realizó una búsqueda bibliográfica de modelos cinéticos resueltos analíticamente para la producción de ácido láctico a partir de otros sustratos y bacterias, que posiblemente pudiesen ajustarse a los datos experimentales obtenidos. Una vez seleccionados los modelos, se realizó la regresión no lineal de cada uno empleando el software Matlab®, obteniendo como resultado los parámetros de cada modelo.

Para determinar el modelo que mejor se ajusta a la cinética experimental, se representaron todos los modelos junto a los datos experimentales en una sola gráfica y se compararon, analizando la consistencia de los parámetros obtenidos con lo observado en la experimentación. Así mismo, para constatar lo observado se calculó el coeficiente de determinación y la raíz cuadrada media, como herramientas estadísticas que permitieron evaluar la precisión de los modelos y seleccionar el modelo de Luedeking-Piret como el que tiene se ajusta más a los datos experimentales con un coeficiente de determinación de 0,9993 y una raíz cuadrada media de 0,3559.

Palabras clave: Ácido láctico, modelo cinético, fermentación, cromatografía líquida de alto rendimiento, bacterias ácido lácticas, sustrato.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han acelerado las investigaciones para la producción de ácido láctico por vía biotecnológica, debido a que este es el precursor del ácido poliláctico, un polímero 100% biodegradable que es de gran interés para la industria de plásticos ya que a través de este se busca disminuir el consumo y producción de polímeros derivados del petróleo que causan gran contaminación al medio ambiente¹. Además de esto, el ácido láctico y sus derivados son altamente utilizados en distintas industrias, por ejemplo, en la industria alimenticia es ampliamente usado como acidulante, neutralizador de pH e inhibidor microbiano; en la industria farmacéutica y cosmética se emplea en lociones humectantes, tratamientos contra el acné, cremas anti edad; y sus sales son empleadas en la producción de fármacos².

Por la versatilidad de este ácido y su creciente demanda, se ha generado gran interés en disminuir los costos de manufactura a través de nuevos y económicos sustratos, nuevas tecnologías de fermentación, separación y purificación por medio de microorganismos capaces de producir ácido láctico en altas concentraciones con requerimientos nutricionales mínimos, para así en un futuro satisfacer de manera eficiente y más amigable con el medio ambiente la demanda de esta sustancia³.

La Fundación Universidad de América, desde el grupo de investigación BIOTECFUA, propuso la producción de ácido láctico por vía biotecnológica a través del proyecto: "Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas Comosus* Merr.) y banano (*Musa Sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico" por Guillén Romero, Laura y Vega López Jorge, donde se determinó que la bacteria seleccionada (*Lactobacillus acidophilus*) produce una mayor cantidad del metabolito de interés cuando la piña es el sustrato a fermentar. Por lo tanto, el grupo de investigación de procesos de separación no convencionales (GPS) de la Universidad de América, pretende continuar dicha investigación, a través de este proyecto que tiene como objetivo obtener los datos y parámetros cinéticos que no se encuentran en la literatura para el sustrato y bacteria seleccionada, con el fin de plantear un modelo cinético que describa la producción de ácido láctico, para poder simular la síntesis del metabolito, determinar las concentraciones alcanzadas del mismo y servir como precedente de futuros trabajos de investigación que permitan el diseño de bioreactores y procesos de separación y purificación del ácido láctico obtenido por vía biotecnológica.

¹ SERNA-COCK, L. y STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: CYTA - Journal of Food. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54

² Ibid., p. 54

³ Ibid., p. 54

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Ajustar un modelo cinético para la producción de ácido láctico por la bacteria *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo.

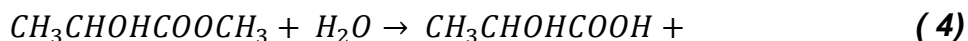
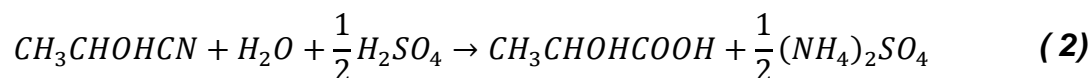
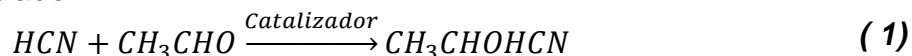
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la fermentación del medio complejo bajo condiciones establecidas.
- Determinar experimentalmente la formación de ácido láctico en el tiempo.
- Establecer un modelo cinético que se ajuste a los datos experimentales de la producción de ácido láctico

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 EL ÁCIDO LÁCTICO Y SUS PROCESOS DE OBTENCIÓN

La producción química tradicionalmente se da por la reacción de ácido cianhídrico con acetaldehído. El cianuro de hidrógeno se adiciona al acetaldehído en presencia de una base para producir lactonitrilo (1). La reacción se da en fase líquida y a altas presiones. El lactonitrilo bruto se recupera y purifica mediante destilación. Posteriormente, se hidroliza y se agrega ácido clorhídrico concentrado o ácido sulfúrico para obtener ácido láctico y la sal correspondiente del amonio (2). Por último, el ácido láctico se esterifica con metanol para producir lactato metílico (3), el cual es recuperado y purificado por medio de destilación e hidrólisis con agua en presencia de un catalizador para generar ácido láctico y metanol (4), el cual es recuperado y reciclado⁴.



La síntesis de ácido láctico por vía química presenta la desventaja de que produce una mezcla de los enantiómeros D y L ópticamente inactivos. Por lo que la producción biotecnológica de este ácido carboxílico se ha vuelto muy importante para la industria debido a que es mucho más amigable con el medio ambiente, utiliza recursos renovables en lugar de productos derivados del petróleo⁵ y tiene la ventaja de formar los dos enantiómeros D (-) y L (+) ópticamente activos⁶.

La producción por vía biotecnológica consiste en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por hongos o bacterias, y se volvió mundialmente conocida después de que en 1856 el químico Louis Pasteur descubriera la bacteria *Lactobacillus sp.*, una bacteria ácido láctica (LAB) capaz de producir ácido láctico a partir de la degradación anaeróbica de carbohidratos como la glucosa y la lactosa.

⁴ SERNA-COCK, L. y STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: CYTA - Journal of Food. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54-65

⁵ GARCIA, Carlos, et al. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. En: Temas Agrarios. Diciembre, 2010. vol. 15, no. 2, p. 9-26

⁶ SERNA-COCK, L. y STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: CYTA - Journal of Food. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54-65

Actualmente, estas bacterias ácido lácticas son las más empleadas e investigadas para la producción de ácido láctico por vía biotecnológica, ya que el metabolito principal que sintetizan es el ácido carboxílico de interés. Son bacterias Gram positivas, microaerofílicas, catalasa negativas y con un metabolismo susceptible a las condiciones ambientales, sobre todo a la temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno, agitación (para mantener el medio homogéneo) y composición del sustrato, por lo que son variables importantes a tener en cuenta a la hora de realizar y diseñar el proceso de fermentación, que varían en función de la bacteria seleccionada⁷.

1.2 FERMENTACIÓN POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (LAB)

La fermentación es un proceso bioquímico en donde moléculas de carbohidrato, son convertidas en energía, lactato y otros sub productos que dependen de la bacteria involucrada en la fermentación y las condiciones bajo las cuales es llevado el proceso.

Las bacterias ácido lácticas, en particular, son conocidas por ser los microorganismos que más producen ácido láctico a partir de fuentes de carbono comunes, estas alcanzan su máxima producción de ácido láctico a unos intervalos únicos de temperatura y pH⁸. Además , otros factores que afectan su productividad son, el sustrato o fuente de energía, la fuente de nitrógeno y el modo de fermentación ya sea continua o discontinua⁹. Debido a todas estas variables, se pueden presentar dos tipos de fermentación, la homoláctica o la heteroláctica también conocida como fermentación ácida mixta.

1.2.1 Fermentación homoláctica. Se caracteriza principalmente por que el producto que prevalece, es decir, que se encuentra en mayor concentración es el ácido láctico, debido que la glucosa sigue la conocida ruta metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glucólisis, donde a partir de una molécula de glucosa se obtienen dos moléculas de lactato¹⁰ como se muestra en la figura 1.

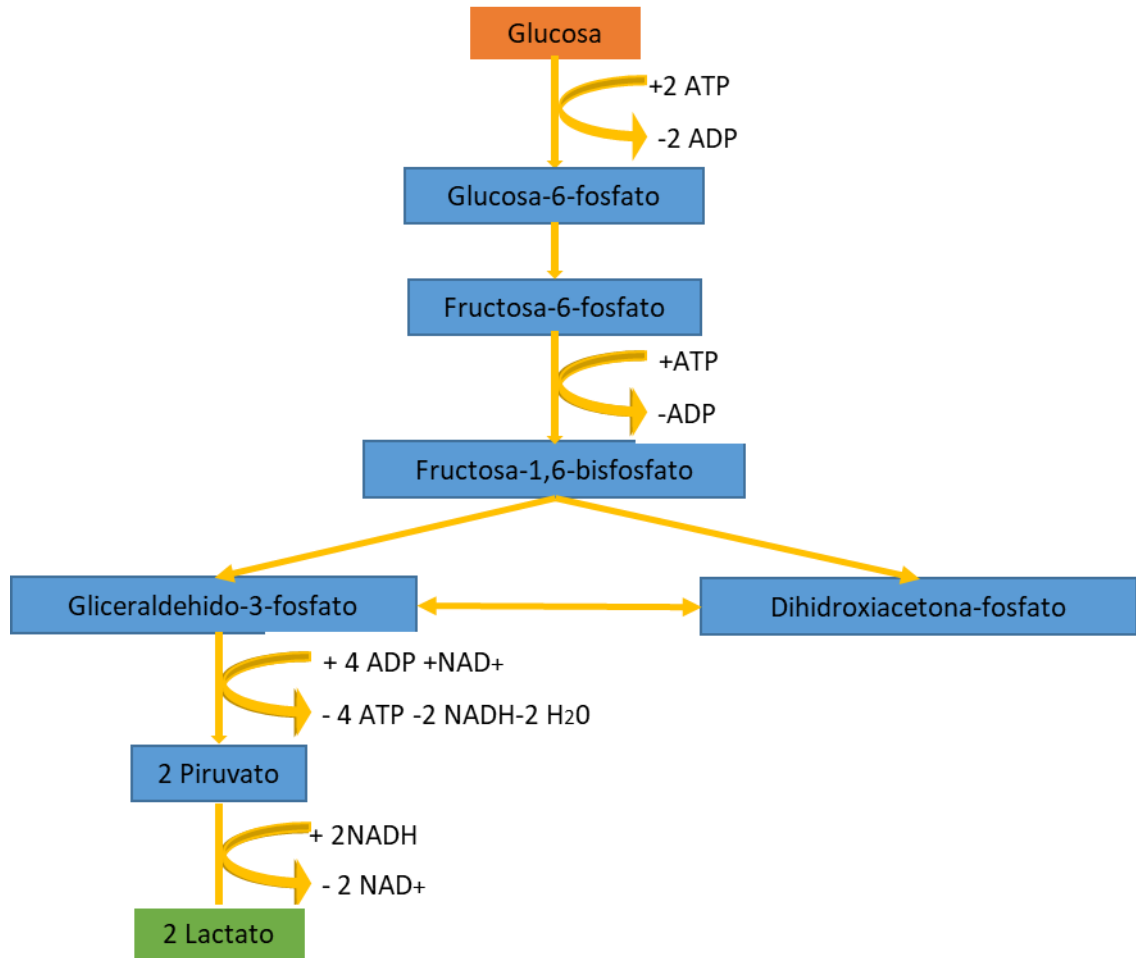
⁷ SERNA-COCK, L. y STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: CYTA - Journal of Food. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54-65

⁸ AMEEN, Sara M. y CARUSO, Giorgia. Chemistry of lactic acid. En: Lactic Acid in the Food Industry. Two ed. Cham: Springer, 2017. p. 7-15

⁹ HOFVENDAHL, Karin y HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. En: Enzyme and Microbial Technology. Febrero, 2000. vol. 26, no. 2-4, p. 87-107

¹⁰ AMEEN, Sara M. y CARUSO, Giorgia. Chemistry of lactic acid. En: Lactic Acid in the Food Industry. 2 ed. Cham: Springer, 2017. p. 7-15

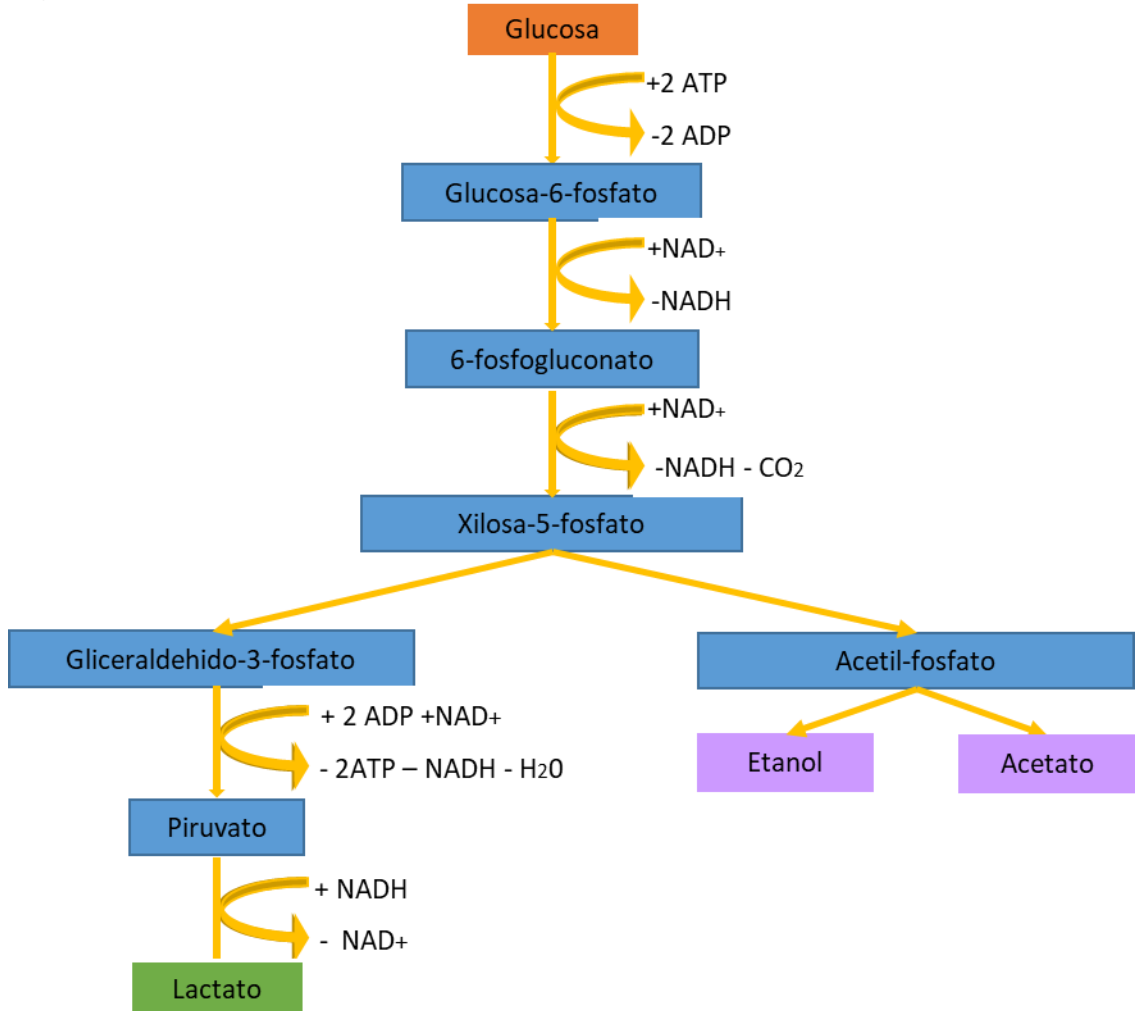
Figura 1. Vía Embden-Meyerhof-Parnas.



1.2.2 Fermentación ácida mixta. En este caso, debido a las condiciones de crecimiento, el microorganismo sigue la vía pentosa donde una molécula de glucosa se convierte en una sola molécula de lactato¹¹ como se muestra en la figura 2, produciendo una mezcla de ácido láctico con otros ácidos orgánicos como el acético, fórmico, etanol, y otros productos como el dióxido de carbono.

¹¹ AMEEN, Sara M. y CARUSO, Giorgia. Chemistry of lactic acid. En: Lactic Acid in the Food Industry. 2 ed. Cham: Springer, 2017. p. 7-15

Figura 2. Vía de la pentosa.



1.3 CROMATOGRAFÍA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento o HPLC es una de las técnicas de cromatografía más utilizadas en el mundo debido a su capacidad de separar analitos de distinta naturaleza presentes en una mezcla, sus aplicaciones abarcan industrias como la farmacéutica, bioquímica, de alimentos, productos de la industria química, medicina clínica y química forense. En este caso, el cromatógrafo acoplado a un espectrofotómetro de masa puede identificar la presencia de ácido láctico en el caldo de cultivo y cuantificarlo, para poder determinar su concentración a lo largo del tiempo.

1.3.1 Principios. La cromatografía líquida de alto rendimiento es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. En este hecho participan básicamente dos fases (móvil y estacionaria) inmiscibles entre sí y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y

se encarga de llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada a un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla¹²; los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazaran con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

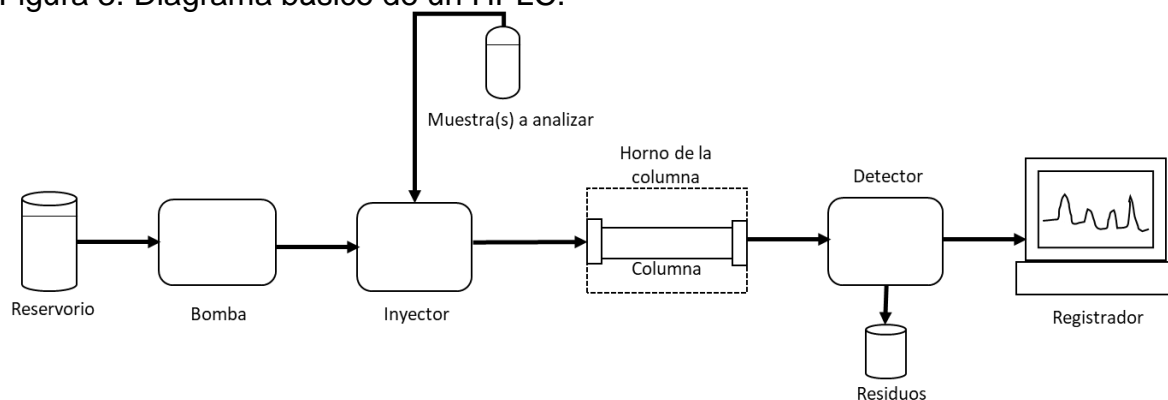
Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London o fuerzas de van der Waals
- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electroestáticas

Cualquier variación de estas fuerzas afectara directamente el grado de separación obtenido¹³.

1.3.2 Equipo y su funcionamiento. La estructura general de un cromatógrafo líquido de alto rendimiento se muestra a continuación en la figura 3.

Figura 3. Diagrama básico de un HPLC.



En el reservorio se encuentra la fase móvil que consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, esta debe estar filtrada para evitar obstrucciones

¹² FALLON, A.; BELL, L. D. y BOOTH, R. F. The origins and development of liquid chromatography. En: Applications of HPLC in Biochemistry. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 1-7

¹³Ibid., p. 1-7

por posible material particulado, suelen estar hechos de vidrio y pueden requerirse uno o más dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración¹⁴.

La bomba se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante, normalmente operan hasta unos 6000 psi dependiendo de factores como el tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y el flujo deseado. Usualmente se inyecta un volumen entre 5µL y 5mL¹⁵.

El inyector puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados¹⁶.

El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma¹⁷. La columna, por otro lado, está fabricada generalmente en acero inoxidable con una longitud de 50 a 300mm y están rellenas de la fase estacionaria que tiene un tamaño de partícula de 3 a 10 µm¹⁸. Las variaciones de estas dimensiones y materiales determinan la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna.

Ubicado al final de la columna se encuentra el detector encargado de captar los cambios en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, recibidas por el registrador. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos; los selectivos, como los detectores de fluorescencia, que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la mezcla, donde solo los que cuenten con dicha propiedad serán detectados; y los universales, que miden una propiedad física específica del eluyente (fase móvil)¹⁹.

Finalmente, el registrador recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación²⁰.

¹⁴ SNYDER, Lloyd R.; DOLAN, John W. y KIRKLAND, Joseph J. Equipment. En: Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3. ed. Hoboken, N.J: Wiley, 2010. p. 89-91

¹⁵ Ibid., p. 104-109

¹⁶ Ibid., p. 116-119

¹⁷ Ibid., p. 125-126

¹⁸ GIRI, Dhurba. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. Laboratoryinfo. [en línea], 28 de julio de 2015 [Revisado 3 de agosto de 2017], Disponible en internet: <<http://laboratoryinfo.com/hplc/>>

¹⁹ WESTON, Andrea y BROWN, Phyllis R. Detectors. En: HPLC and CE: Principles and practice. San Diego: Acad. Pr, 1997. p. 90-108

²⁰ GIRI, Dhurba. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. Laboratoryinfo. [en línea], 28 de julio de 2015 [Revisado 3 de agosto de 2017], Disponible en internet: <http://laboratoryinfo.com/hplc/>

1.4 MODELOS CINÉTICOS

Los modelos cinéticos se centran en una sola parte del metabolismo debido a la dificultad que representa tener en cuenta todos los factores de la población celular y el medio que lo rodea. Algunos factores son: el equilibrio ácido-base, la transcripción de ciertas proteínas, el cambio de las propiedades reológicas, la no uniformidad espacial, la heterogeneidad celular, la adaptabilidad, entre otros.

La complejidad y conveniencia de un modelo cinético está dada por el número y el grado de influencia de los factores que sean tenidos en cuenta. Según esto, el microbiólogo Henry Tsuchiya clasificó los modelos cinéticos dependiendo de si solo consideran un factor (no estructurados) o varios (estructurados); y si la biomasa es tomada como homogénea (no segregados) o heterogénea (segregados). A continuación, se explica detalladamente las consideraciones de cada uno²¹.

1.4.1 Modelos no estructurados no segregados. Es el caso ideal y menos complejo en el que la heterogeneidad de las células no afecta sustancialmente la cinética del proceso por lo que todos los componentes relacionados a la biomasa se representan por una única concentración y se asume un crecimiento balanceado, es decir, que la composición celular está próxima a un estado estacionario. Estos modelos son los más utilizados por su simpleza matemática y por qué representan satisfactoriamente varios sistemas de reacciones biológicas de interés²².

1.4.2 Modelos segregados. Estos modelos se aplican cuando la composición de la biomasa varía considerablemente con respecto a las etapas de crecimiento celular²³, se considera la distribución de algún componente como el tamaño o masa celular y no es posible considerar un microorganismo medio que represente a toda la población²⁴. Otros fenómenos que no se pueden describir con modelos no segregados son: las alteraciones irreversibles en la fisiología y metabolismo celular, la diferenciación morfológica visible de las células, y mutaciones en el genoma relacionadas con variaciones en el metabolismo²⁵.

²¹ BAILEY, James E. y OLLIS, David F. Kinetics of substrate utilization, product formation, and biomass production in cell cultures. En: Biochemical engineering fundamentals. 2 ed. Singapore: Kiran Verma y Cydney C. Martin, 1986. p. 373-454

²² Ibid., p. 373-354

²³ FREDICKSON, A. G. Segregated, structures, distributed models and their role in microbial ecology: A case study base don work done on the filter-feeding ciliate *tetrahymena pyriformis*. En: Microbial Ecology. Ferebrero, 1991. Vol. 22, p. 139-159

²⁴ ALCÓN MARTÍN, Almudena. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano. Trabajo de grado de Doctor. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 1999. 454p.

²⁵ SCHÜGERL, K y BELLGARDT, H. Segregated models. En: Bioreaction engineering Modeling and control. Berlin: Springer, 2000. p. 86.

1.4.3 Modelos estructurados. Los modelos estructurados brindan información acerca del estado fisiológico de los microorganismos y su adaptación al medio. Para esto, se considera que la biomasa está conformada por varias especies, se tienen en cuenta componentes intracelulares (ribosomas, RNA, enzimas, etc.) y el metabolismo del sustrato nitrogenado. Las concentraciones se basan en el volumen de fase biótica²⁶.

Las interacciones entre las células y el medio de cultivo se describen a través de la mayor cantidad de reacciones conocidas o construidas con trayectorias aproximadamente agrupadas de la red de reacción²⁷.

1.4.4 Modelos estructurados segregados. Este tipo de modelos son los que más se aproximan a la realidad y a su vez son los más complejos debido a la cantidad de variables y reacciones que se tienen en cuenta. En general, describen un sistema biológico multicomponente y heterogéneo.

²⁶ ALCÓN MARTÍN, Almudena. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano. Trabajo de grado de Doctor. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 1999. 454p.

²⁷ SCHÜGERL, K y BELLGARDT, H. Segregated models. En: Bioreaction engineering Modeling and control. Berlin: Springer, 2000. p. 73

2. OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

En este capítulo se evidencian las materias primas, equipos, procedimientos y resultados obtenidos del proceso de fermentación realizado en los laboratorios de nanotecnología y biotecnología del Tecnoparque nodo Bogotá del SENA.

2.1 CEPA BACTERIANA

La bacteria *Lactobacillus acidophilus*, fue aislada por primera vez de las heces de un niño en 1900 por Moro y comercializada desde 1972 como probiótico para la fermentación de producto lácteos y como suplemento dietario para el correcto funcionamiento del sistema digestivo²⁸.

Tabla 1. Características de la bacteria *Lactobacillus acidophilus*.

Característica	Valor
Tinción de Gram	Gram- positiva
Metabolismo	Homofermentativo
Temperatura óptima de crecimiento	35°C-42°C
Azúcares fermentables	Trehalosa, fructosa, sacarosa, glucosa, manosa, melibiosa, gentiobiosa, celofiasa, salicina, arbutin, N- acetil glucosamina, rafinosa, maltosa, galactosa y lactosa
pH para el crecimiento	3-8 (ácido tolerantes)
pH óptimo para el crecimiento	5,5-6
Fisiología	Microaerofílico
Tamaño celular	0,6-0,9 µm de ancho 1,5-6,0 µm de largo
Configuración del ácido láctico	DL

Fuentes: ALTERMANN, Eric.; RUSSELL, Michael y AZACARTE-PERIL, Andrea. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Marzo, 2005.vol 102. No 15. p. 3906-3912 y GOMES, Ana y MALCATA, Xavier. *Bifidobacterium spp* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. En: Trends in food & science technology. 1999. Vol 10. p. 139-157.

Según la tabla 1, esta bacteria al tener un metabolismo homofermentativo produce en mayor proporción ácido láctico con respecto a otros productos de la

²⁸ ALTERMANN, Eric.; RUSSELL, Michael y AZACARTE-PERIL, Andrea. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Marzo, 2005.vol 102. No 15. p. 3906-3912.

fermentación, es capaz de fermentar gran variedad de carbohidratos y puede vivir en medios ácidos. Además, cuenta con la ventaja de producir ácido láctico con sus dos enantiómeros (+D y -L) ópticamente activos, lo que lo hace biocompatible y biodegradable.

Figura 4. Ceba bacteriana adquirida



La cepa bacteriana liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* empleada en la experimentación fue adquirida en el Centro Agro Lechero de la ciudad de Bogotá, bajo su nombre comercial LA3 de la empresa internacional SACCO System (véase figura 4). Una vez comprada se conservó a 3 °C en su empaque completamente sellado. Esta cepa comercial, es usualmente empleada para la fermentación de productos lácteos, por lo que tiene la capacidad de crecer en condiciones atmosféricas normales.

Debido al metabolismo homofermentativo, la variedad de azúcares fermentables y su alta disponibilidad al ser una cepa empleada en la industria de lácteos, se decidió utilizar la bacteria *Lactobacillus acidophilus* para la producción de ácido láctico.

2.2 SUSTRATO

La *Ananas comosus Merr* de la variedad Perolera en alto grado de maduración fue seleccionada como el sustrato para la producción de ácido láctico, debido a que presenta una alta concentración de carbohidratos fermentables por la bacteria *Lactobacillus acidophilus*. Esta variedad de piña es la más cultivada en Colombia²⁹, con una producción de 741300 toneladas en el año 2016³⁰ como se muestra en el

²⁹ DANE. Principales características del cultivo de la piña (*Ananas Comosus L.*) [en línea]. Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Diciembre 2016. Núm 54. Disponible en: < https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_dic_2016.pdf >.

³⁰ Food And Agriculture Organization Of The United States [en línea]. [citado el 22 de marzo de 2018]. Disponible en: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>.

anexo A, se caracteriza por pesar entre 1,5 y 3 kg , su color amarillo- naranja, ojos profundos, corona sin espinas, forma cilíndrica, pulpa blanda amarilla (véase figura 5) y sólidos solubles de $\pm 12^{\circ}\text{Brix}^{31}$ que facilitan su identificación.

Figura 5. Piña de la variedad Perolera adquirida para la fermentación.



Como se observa en las tablas 2 y 3, la piña como sustrato complejo cumple con los requerimientos nutricionales aportando los aminoácidos, péptidos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables que la bacteria seleccionada necesita para crecer sin modificar su metabolismo homofermentativo.

³¹ CASTRO, L.; G. ECHEVERRI; R. SALAZAR y A PINON. 1993. Efecto de la temperatura en el almacenamiento de dos variedades de piña, Cayena Lisa y Manzana. En: Memorias primer simposio latinoamericano de piñicultura. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

Tabla 2. Nutrientes del fruto de piña en estado maduro.

Variable	Contenido
Proteína	0,78-3,20%
Pectina	0,86%
Hidratos de carbono	80,36%
Vitamina C	14,08 mg/100g
Calcio	134,12 mg/100g
Potasio	2445 mg/100g
Fósforo	1,41 mg/100g
Hierro	8,5 mg/100g

Fuente: HERNÁNDEZ, María S.; BAREERA, Jaime A.; OVIEDO, Eliseo y ROMERO, Henry. Aspectos biológicos y conservación poscosecha de la piña nativa (*Ananas comosus* L. Merr c.v India) en la Amazonia Occidental Colombiana. En: Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia Colombiana. Bogotá: Dione Victoria González, 2004. p. 59-84.

Tabla 3. Nutrientes promedio de todas las variedades de piña cruda

Nutriente	Valor por cada 100g
Lípidos	0,12g
Sacarosa	5,99g
Glucosa	1,73g
Fructosa	2,12g
Magnesio	12mg
Sodio	1mg
Zinc	0,12mg
Cobre	0,11mg
Manganeso	0,927
Tiamina	0,079mg
Riboflavina	0,032mg
Niacina	0,5mg
Ácido pantoténico	0,213mg
Ácido fólico	18µg

Fuente: United States Department of Agriculture [base de datos en línea]. Basic Report: 09266, Pineapple, raw, all varieties. [citado en 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2340?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Abridged&new=&measureby=&ds=&Qv=1&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>>>

2.3 FERMENTACIÓN

Debido al éxito en el proceso de fermentación y la alta concentración de ácido láctico obtenido con respecto al alcanzado en la fermentación del banano en el proyecto

de Guillen & Vega³², se decide usar como referencia la metodología empleada por los autores para la realización del proceso fermentativo complementándola con la información encontrada en la bibliografía. A continuación, se presentan las etapas de desarrollo de la fermentación.

2.3.1 Preparación del medio de cultivo. En primera instancia se adquiere la piña de variedad Perolera (véase figura 6), se evalúan sus propiedades organolépticas y se determinan los sólidos solubles totales para constatar el grado de madurez del fruto. En el cuadro 1 se presentan los resultados del análisis sensorial.

Cuadro1. Análisis organoléptico de la piña.

Propiedad	Observación
Olor	Característico de la fruta en estado avanzado de maduración debido a la acumulación de azúcares y disminución de ácidos y almidones.
Textura	Textura blanda con la cascara considerablemente arrugada y delgada debido a la desintegración de los polisacáridos presentes en la estructura vegetal.
Color	Predominantemente morada con algunos ojos naranjas y amarillo en la base (véase figura 6)

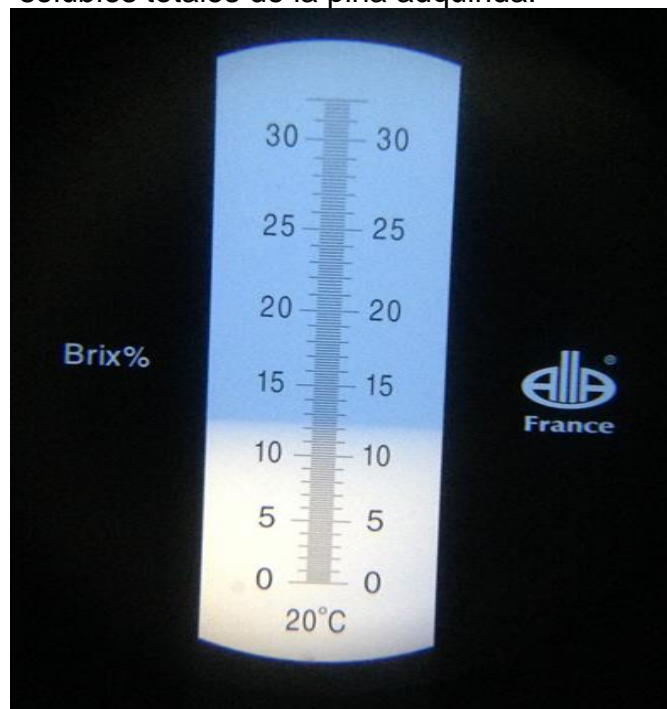
Luego, se determinan los sólidos solubles totales para establecer la concentración de azúcares reductores presentes en la piña empleando un refractómetro portátil de la empresa ALLAFrance, obteniéndose un valor de 12 °Brix (véase figura 7). Este resultado se contrasta con la NTC 4102 que se encuentra en el anexo B y según la cual el grado de madurez del fruto adquirido corresponde al número 2 por lo que el este debe tener como mínimo un valor de 11,4 °Brix.

³² GUILLÉN ROMERO, Laura Giselle; PAEZ, MORALES, Adriana Inés y VEGA LÓPEZ, Jorge Armando. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas Comosus Merr.*) y banano (*musa Sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad de américa,2013. p. 79

Figura 6. Piña analizada según la NTC 4102



Figura 7. Resultados de la prueba de solidos solubles totales de la piña adquirida.



Después de las pruebas realizadas a la piña, esta es pelada y picada en trozos para ser llevada a una licuadora junto al jugo desprendido en el proceso de picado (véase figura 8). Una vez licuado todo, se deposita el fluido resultante en un Erlenmeyer limpio y seco.

Figura 8. Piña pelada y picada



Ya que el metabolito que se produce en mayor proporción es de naturaleza ácida, se mide el pH del medio para asegurar que durante el proceso el caldo de fermentación no alcance valores de pH menores a los que puede soportar el microorganismo. Se obtiene un valor de 3,9 que es muy cercano al mínimo tolerable por la bacteria, por lo que es importante antes de iniciar la fermentación aumentar el pH. En la bibliografía ^{33,34,35,36} se encuentra que este es un problema muy común en la fermentación de desechos agroindustriales que se soluciona adicionando no más del 1% m/V de carbonato de calcio al medio de cultivo. La restricción de porcentaje masa-volumen se debe a la producción de lactato de calcio por la reacción entre el carbonato de calcio y el ácido láctico que generaría la necesidad de procesos adicionales de recuperación y purificación del ácido láctico. Siguiendo lo anterior, se calcula la cantidad de neutralizador que cumpla con la restricción, se añade disolviéndolo por completo con la ayuda de una plancha de agitación como se muestra en la figura 9 y se mide el pH final que resulta ser de 4,43.

³³ KOPLI, Bujang; SUJANG, Sadi y SALWANI, Dayang. Effects of Calcium Carbonate in Fermentation of L-Lactic Acid from Hydrolyzed Sago Starch. En: ICBiotech. 2004. Vol. 26. p. 637-643.

³⁴ SIRKKA-LIISA, Stenroos.; LINKO, Yu-Yen y Linko, P. Production of L-lactic acid with immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. En: Biotechnology Letters. Marzo, 1982. Vol. 4. no. 3. p.159-164.

³⁵ ROJAN, John; MADHAVAN, Nampoothiri y ASHOK, Pandey. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. En: Process Biochemistry. Abril, 2006. Vol. 41. no. 4. p. 759-763.

³⁶ MARQUES, Susana.; SANTOS, José.; GÍRIO, Francisco y ROSEIRO, Carlos. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. En: Biochemical Engineering Journal. Octubre, 2008. Vol. 41. no. 3. p. 210-216.

Figura 9. Mezcla del neutralizador con el medio de cultivo.



2.3.2 Esterilización. Con el objetivo de eliminar los microorganismos que puedan estar presentes en el medio, se lleva el Erlenmeyer a la autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 30 minutos.

Todos los demás materiales que lo necesiten fueron esterilizados a las mismas condiciones que el medio de cultivo.

2.3.3 Pre inóculo. Para evitar la fase de adaptación mostrada en los resultados de Guillen & Vega³⁷, se realiza una pre inoculación. Para esto, se toma con una jeringa estéril dentro de la cabina de bioseguridad el 10% del volumen total a inocular (90mL) y se deposita en un frasco tapa rosca de 100mL igualmente estéril. Luego, se le adiciona la dosis de la cepa bacteriana liofilizada correspondiente y, por último, se deja en la incubadora a 36°C y 160 RPM durante 24 horas para que el microorganismo ajuste su metabolismo al sustrato complejo.

2.3.4 Inoculación, incubación y muestreo. Pasado el tiempo de adaptación, en la cabina de bioseguridad, se realiza la transferencia de los 90mL de medio inoculado al frasco de 1L de capacidad que contiene los 810 mL restantes de medio. Véase figura 10.

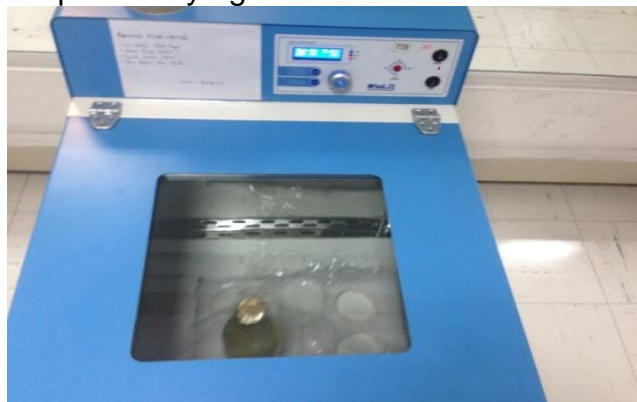
³⁷ GUILLÉN ROMERO, Laura Giselle; PAEZ, MORALES, Adriana Inés y VEGA LÓPEZ, Jorge Armando. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas Comosus* Merr.) y banano (*musa Sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad de américa, 2013. p. 123

Figura 10. Inoculación del medio en cabina de bioseguridad.



Después, el medio se incubaba a 36 °C que corresponde a la temperatura óptima de crecimiento para la bacteria *Lactobacillus acidophilus*, y una agitación continua de 160 RPM (véase figura 10) que asegura una distribución homogénea del medio durante un tiempo de fermentación de 108 horas. Este tiempo se determina a partir de los resultados en el trabajo de Guillen & Vega³⁸.

Figura 11. Incubadora con control de temperatura y agitación continua.

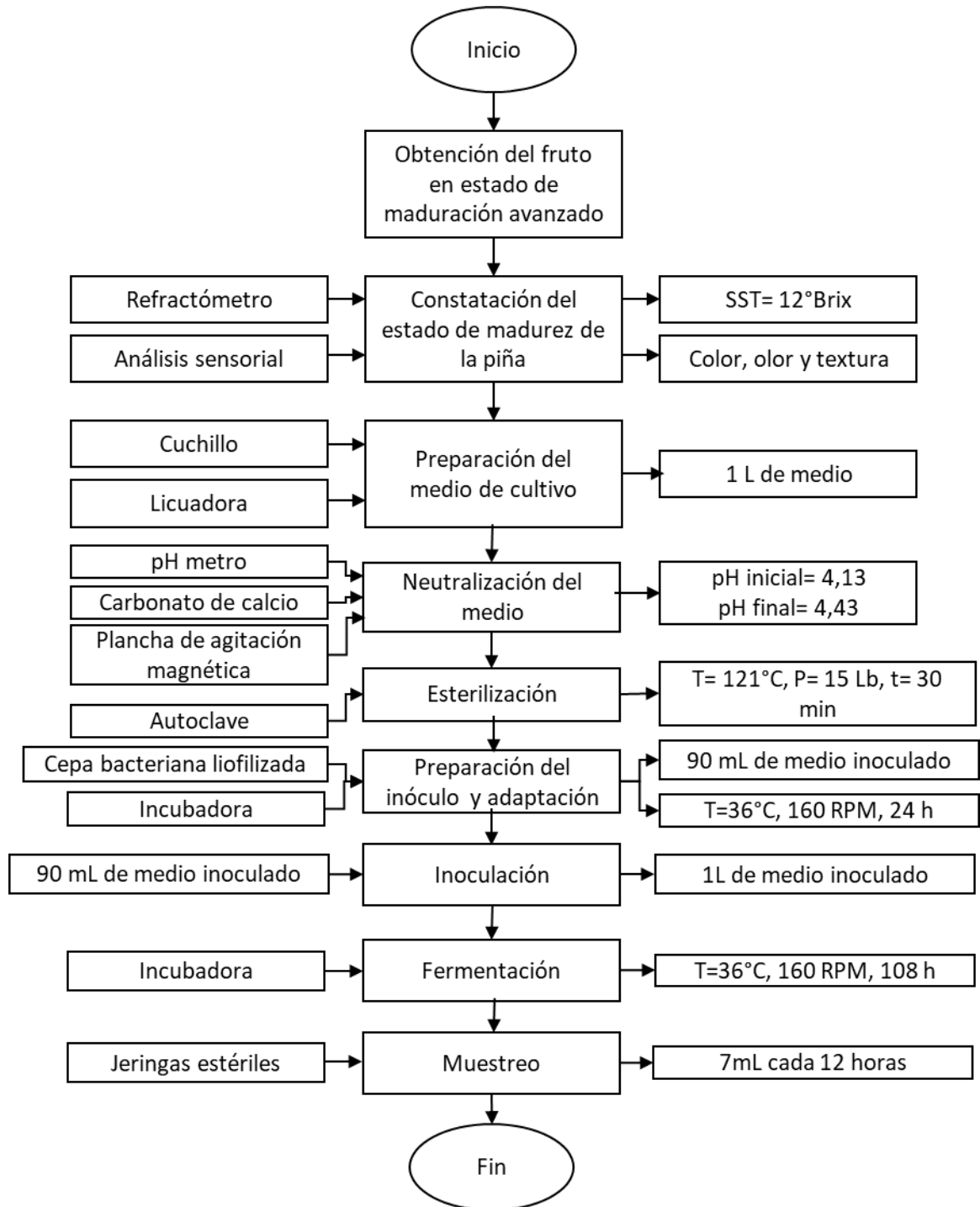


Antes de comenzar la incubación y cada 12 horas después de iniciada, se realiza en cabina de bioseguridad la extracción con jeringa estéril de una muestra de 7 mL

³⁸ GUILLÉN ROMERO, Laura Giselle; PAEZ, MORALES, Adriana Inés y VEGA LÓPEZ, Jorge Armando. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas Comosus* Merr.) y banano (*musa Sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad de américa, 2013. p. 91

del medio para posteriormente determinar la concentración de ácido láctico en el tiempo. Cada muestra es almacenada en un tubo de ensayo debidamente marcado y refrigerado a 4°C. En el diagrama 1 se resume el procedimiento de fermentación.

Diagrama 1. Desarrollo experimental de la fermentación.



3. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE ÁCIDO LÁCTICO EN EL TIEMPO

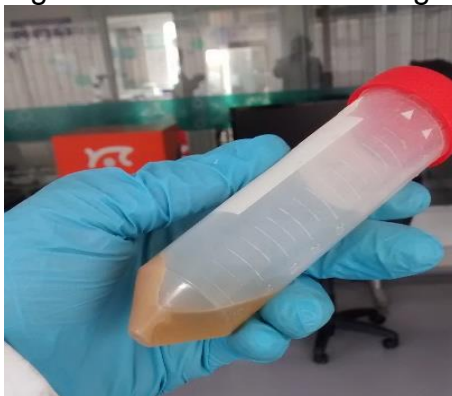
La concentración de ácido láctico presente en las muestras tomadas durante la fermentación se determina a través de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). A continuación, se describe el proceso y los resultados del análisis cromatográfico.

3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Antes de analizar las muestras es necesario tratarlas para remover la mayor cantidad de sólidos suspendidos que puedan obstruir la columna del cromatógrafo. Para esto, se remueven las partículas más grandes a través de centrifugación y después, se eliminan las partículas más pequeñas y los microorganismos presentes pasando las muestras centrifugadas por micro-filtros de 1,2 y 0,22mm.

3.1.1 Centrifugación. El proceso de centrifugación llevado a cabo es de carácter diferencial, donde las partículas son separadas dependiendo de su forma, tamaño, densidad y velocidad de sedimentación.

Figura 12. Muestra a centrifugar



Para este procedimiento, las 10 muestras tomadas de la fermentación se transfieren a tubos Falcon de 50ml (Véase figura 12) previamente esterilizados, que son llevados a una centrifuga de rotor angular a 6000 RPM y 16°C durante media hora, para asegurar la total precipitación de los sólidos suspendidos.

3.1.2 Micro-filtración. Una vez eliminadas las partículas suspendidas más grandes se procede a filtrar aquellos sólidos suspendidos cuyas velocidades de precipitado son tan bajas que no fueron eliminados en el proceso de centrifugación.

Primero, se hace una micro-filtración al vacío con papel filtro de 1,2 micras. El montaje se muestra en la figura 13. En este proceso, la muestra se introduce en el embudo Büchner y acto seguido, se enciende la bomba que crea un vacío dentro

del Erlenmeyer con desprendimiento lateral succionando rápidamente la muestra a través del filtro donde quedan atrapadas todas las partículas con un tamaño mayor o igual 1,2 micras. Todo el procedimiento se realiza en cabina de bioseguridad con el equipo de vidrio esterilizado con el fin de preservar la esterilidad de la muestra.

Figura 13. Montaje de filtración al vacío.



Luego, se realiza otra micro-filtración con filtros tipo pirinola de 0,22 micras. Para esto las muestras ya filtradas al vacío se toman con una jeringa estéril que se acopla a la pirinola y se filtran ejerciendo presión con la jeringa. Al otro extremo de la pirinola se ubica un tubo de ensayo estéril para recolectar la muestra filtrada.

3.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS

Para analizar las muestras por cromatografía líquida de alto rendimiento, primero se prepara la fase móvil, que, en este caso, es ácido sulfúrico diluido en agua destilada tipo I con una concentración de 5mM que posteriormente es micro-filtrado al vacío para evitar taponamientos en la columna del cromatógrafo.

Después, se realiza la curva de calibración para determinar la ecuación que describe la relación entre el área bajo la curva y la concentración de ácido láctico. Para esto se tiene como referencia las concentraciones máxima y mínima de ácido láctico obtenido en el trabajo realizado por Guillen & Vega³⁹ y se prepara una solución patrón madre de 50000mg de ácido láctico en 1L de fase móvil, a partir del cual, se realizan patrones de 40000mg/L, 30000mg/L, 20000g/L, 10000g/L y 2000mg/L. La curva obtenida junto a la ecuación correspondiente a la regresión de

³⁹ GUILLÉN ROMERO, Laura Giselle; PAEZ, MORALES, Adriana Inés y VEGA LÓPEZ, Jorge Armando. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas Comosus* Merr.) y banano (*musa Sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad de américa, 2013. p. 121

los datos experimentales se encuentra en el Anexo C. Al analizar los patrones, también se determina que el tiempo de retención del ácido es de aproximadamente 9,378, es decir, que los picos en los cromatogramas que estén sobre este tiempo corresponden al ácido láctico y no a otra sustancia producida durante la fermentación.

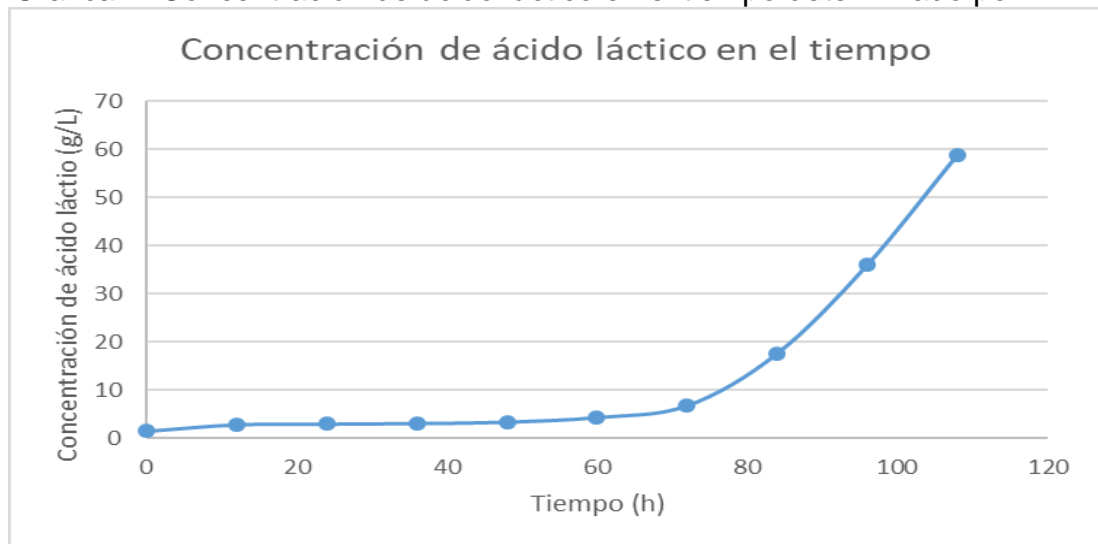
Realizado lo anterior, se procede primero a calibrar el cromatógrafo para luego, ajustar las condiciones a las cuales se va a llevar el análisis.

Luego de purgar durante 15 minutos el sistema con la fase móvil a un flujo constante, se introduce al auto muestreador los viales con 1mL de cada muestra a analizar y finalmente se le da inicio al análisis de las muestras a las condiciones mencionadas anteriormente.

3.3 RESULTADOS

Luego de correr las muestras por aproximadamente 4 horas, el computador acoplado al cromatógrafo arroja los cromatogramas correspondientes a cada una de las 10 muestras tomadas durante la fermentación que se encuentran reportados en el Anexo D.

Grafica 1. Concentración de ácido láctico en el tiempo determinado por HPLC.



La gráfica 1 muestra que la fermentación se llevó a cabo con éxito obteniendo una concentración final de ácido láctico de 58,7268 g/L. Además de esto, se puede observar que el pre-inoculo cumplió con la finalidad de evitar la fase de adaptación reportando una concentración inicial de ácido láctico de 1,4861g/L.

Las concentraciones de ácido láctico durante las primeras 48 horas no cambiaron significativamente, esto puede atribuirse a que el tiempo de adaptación no fue

suficiente para que el microorganismo ajustara su metabolismo al sustrato complejo o se adaptará a los valores bajos de pH del medio de cultivo.

Por último, a partir de la hora 48 de fermentación hay una producción exponencial de ácido láctico, que por lo que se puede observar, no se ve afectada por la disminución del pH en el medio, es decir, no se presenta inhibición por producto.

4. MODELOS CINÉTICOS

La cinética se encarga del estudio de la velocidad de reacción de un proceso, ya sea químico o biológico, según su mecanismo de reacción. A diferencia de una reacción química, los procesos bioquímicos cuentan con parámetros complejos como la caracterización de rutas metabólicas, adaptabilidad de las células al medio, entre otras variables que dificultan la formulación de modelos cinéticos simples para las distintas actividades intracelulares⁴⁰. En términos generales, los modelos cinéticos describen el comportamiento celular a través de ecuaciones matemáticas, construidas con base en aproximaciones y considerando diferentes poblaciones celulares. Los modelos para el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la formación de productos primarios son los más estudiados y comúnmente encontrados en trabajos de investigación.

Los modelos no estructurados son empleados principalmente para describir procesos tipo I, como la fermentación homoláctica, donde el metabolito principal es un producto final del catabolismo asociado directamente al crecimiento⁴¹. Así mismo, se encuentra en la literatura^{42,43} que la mayoría de los modelos cinéticos para la síntesis de ácido láctico son no estructurados ya que los procesos celulares son muy complejos e insuficientemente estudiados como para abordar un enfoque estructurado. Es por esto, que para el desarrollo de este proyecto se consideran cuatro modelos no estructurados que según la teoría⁴⁴ podrían ajustarse a los datos obtenidos en la fermentación.

4.1 MODELO DE LUEDEKING-PIRET

El enfoque más efectivo y conveniente para el desarrollo de ecuaciones cinéticas fue planteado por Robert Luedeking y Edgar L. Piret⁴⁵, los cuales diseñaron un modelo cinético para evaluar la producción de ácido láctico producido por la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* en un proceso de fermentación por lotes a pH controlado

⁴⁰ BAILEY, James E. y OLLIS, David F. Kinetics of substrate utilization, product formation, and biomass production in cell cultures. En: Biochemical engineering fundamentals. 2 ed. Singapore: Kiran Verma y Cydney C. Martin, 1986. p. 373-454

⁴¹ SCHÜGERL, Karl. y BELLGARDT, K.H. Bioprocess models. En: Bioreaction engineering: modeling and control. Berlin. 2000. p. 67

⁴² NIELSEN, J., NIKOLAJSSEN, K., y VILLADSEN, J., Structured modeling of a microbial system: I. A theoretical study of lactic acid fermentation, En: Biotechnology. Bioengineering, 1991, vol. 38, no. 1, p. 11.

⁴³ Ibid., p. 11.

⁴⁴ GORDEEV, L.S., et al. Unstructured mathematical models of lactic acid biosynthesis kinetics: A review. En: theoretical foundations of chemical engineering., 2017, Vol. 51. no. 2. p. 175-190.

⁴⁵ Ibid., p. 175-190.

y temperatura constante⁴⁶. En su investigación, Luedeking y Piret encontraron que la velocidad de formación del producto depende linealmente de la tasa de crecimiento microbiano y la concentración celular como se muestra en la ecuación 1,

Ecuación 1. Ecuación de Luedeking-Piret.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

donde las constantes α y β están determinadas por el pH de la fermentación, y corresponden al crecimiento asociado y no asociado respectivamente. Esto implica entonces, que el primer término corresponde a la producción proporcional del metabolito con respecto al crecimiento celular; mientras que el segundo término, muestra como todos los microorganismos producen de manera constante una proporción de producto independientemente de la fase de crecimiento⁴⁷.

Según Garnier & Gaillet⁴⁸, para llegar a una solución analítica de la ecuación de Luedeking-Piret es necesario asumir que el crecimiento microbiano obedece el modelo Logístico (Ecuación 2),

Ecuación 2. Modelo Logístico de crecimiento.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

y que la velocidad específica de crecimiento está expresada como se muestra en la ecuación 3:

Ecuación 3. Velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = K \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right)$$

⁴⁶ LUEDEKING, Robert y PIRET, Edgar. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. En: Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering. 1959, Vol. 1, no. 4, p. 393-412.

⁴⁷ KHALSEH, Roghayeh. Evaluation of Different Kinetics for Bioethanol Production with Emphasis to Analytical Solution of Substrate Equation. En: Theoretical foundation of chemical engineering. 2016, Vol. 50, No. 4, p. 392-397.

⁴⁸ GARNIER, Alain y GAILLET, Bruno. Analytical Solution of Luedeking-Piret Equation for a Batch Fermentation Obeying Monod Growth Kinetics. En: Biotechnology and Bioengineering. 2015, Vol. 112, no. 12, p. 2468-2474.

Con lo anterior, por sustitución de la ecuación 2 en la ecuación 3 y la integración con las condiciones iniciales de $t=0h$ y $X=0g/L$, se obtiene que la concentración celular en función del tiempo corresponde a la ecuación 4.

Ecuación 4. Concentración de biomasa.

$$X = \frac{X_0 e^{Kt}}{\left[1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{Kt})\right]}$$

Por último, teniendo la ecuación 4 se sustituye en la ecuación 1 y se integra de nuevo con las condiciones iniciales de $t=0h$ y $X=0g/L$, obteniendo finalmente una expresión para la producción de ácido láctico en función del tiempo⁴⁹ (Ecuación 5).

Ecuación 5. Solución analítica del modelo de Luedeking-Piret.

$$P = P_0 + \alpha X_0 \left\{ \frac{e^{Kt}}{\left[1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{Kt})\right]} - 1 \right\} + \beta \frac{X_{max}}{K} \ln \left[1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{Kt}) \right]$$

4.2 MODELO DE LUEDEKING-PIRET MODIFICADO

Este modelo desarrollado por /dt⁵⁰, propone integrar la ecuación resultante de sustituir la ecuación 2 en la ecuación 3 empleando como condiciones iniciales $X=X_0$ y $t=0h$, para obtener una variación sigmoidea de la ecuación 4 en función del tiempo, que pueda representar tanto la fase estacionaria como la exponencial (Ecuación 6).

Ecuación 6. Variación sigmoidea de la ecuación de concentración de biomasa.

$$X = \frac{X_0 X_{max} e^{Kt}}{X_{max} - X_0 + X_0 e^{Kt}}$$

Además, plantea dos consideraciones para la tasa de formación de productos. Primero, establece que existe una relación significativa entre la producción del metabolito y la tasa específica de crecimiento, por lo que la ecuación 1 se vuelve equivalente a la ecuación 7,

⁴⁹ KHALSEH, Roghayeh. Evaluation of Different Kinetics for Bioethanol Production with Emphasis to Analytical Solution of Substrate Equation. En: Theoretical foundation of chemical engineering. 2016, Vol. 50, No. 4, p. 392–397.

⁵⁰ MASHITAH, M.D. y SHOPARWE, N.F.. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. 2010, Vol. 49, No. 1, p. 95–103.

Ecuación 7. Formación de producto para el modelo de Luedeking-Piret modificado.

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt}$$

y segundo, toma en cuenta que la formación del producto es muy baja durante la fase de latencia, por lo que introduce el parámetro Δt para describir las velocidades bajas de producción correlacionadas al crecimiento celular como se muestra en la ecuación 8:

Ecuación 8. Modificación de formación de producto para el modelo de Luedeking-Piret modificado.

$$\int_0^P dP = Y_{P/X} \int_{0-\Delta t}^{t-\Delta t} \frac{dX}{dt}$$

Resolviendo la ecuación 8, y sustituyendo X por la ecuación 6 se obtiene finalmente que:

Ecuación 9. Solución analítica del modelo de Luedeking-Piret modificado.

$$P = Y_{P/X} \left[\frac{X_0 X_{max} e^{Kt}}{X_{max} - X_0 + X_0 e^{Kt}} - \frac{X_0 X_{max} e^{Kt}}{X_{max} - X_0 + X_0 e^{Kt}} \right]$$

4.3 MODELO LOGÍSTICO

Este modelo no estructurado no segregado se ajusta a cinéticas en las cuales se pueda apreciar la fase de adaptación, crecimiento exponencial y estacionario. Para un proceso fermentativo por lotes la velocidad de generación será igual a la de acumulación. Por lo tanto, la tasa de formación del producto estará dada por la ecuación 10.

Ecuación 10. Formación de producto para el modelo de Logístico.

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \mu X$$

Sustituyendo las Ecuaciones 3 y 4 en la ecuación 10 e integrando analíticamente para $t=0h$ y $P=0g/L$, se obtiene la ecuación 11 que predice la concentración de ácido láctico en el tiempo.

Ecuación 11. Solución analítica del modelo Logístico

$$P = \frac{Y_P X_m}{\bar{X}} (1 - K) \ln \left(1 - \frac{X_0}{X_{max}} + \frac{X_0}{X_{max}} e^{Kt} \right) - K Y_P \frac{(X_m - X_0)}{\bar{X}} \left(\frac{\frac{X_0}{X_{max}} - \frac{X_0}{X_{max}} e^{Kt}}{1 - \frac{X_0}{X_{max}} + \frac{X_0}{X_{max}} e^{Kt}} \right)$$

4.4 MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO

Khalseh⁵¹, plantea una versión modificada de la ecuación de Gompertz para la producción de bioetanol mediante la fermentación de glucosa por la bacteria *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha demostrado predecir correctamente la formación de producto en algunos casos en los que se presenta tiempo de latencia, tasa máxima de producción del metabolito y concentración máxima potencial del producto. Este modelo es aplicable para la producción de ácido láctico por la bacteria *lactobacillus acidophilus* ya que al igual que el bioetanol, el ácido láctico es un metabolito primario y aunque la *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura, esta crece exponencialmente cuando se reproduce asexualmente por gemación. La ecuación 12, corresponde al primer modelo de Gompertz en describir la tasa de crecimiento microbiano.

Ecuación 12. Modelo de Gompertz modificado de crecimiento microbiano.

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right)$$

Después de modificaciones no especificadas y la integración analítica de la ecuación 12, se obtiene finalmente una expresión matemática para la formación de producto que solo depende de la variable tiempo⁵² (Ecuación 13).

Ecuación 13. Solución analítica del modelo de Gompertz modificado.

$$P = P_m e^{-e^{(r_p, m P_m^e (t_L - t) + 1)}}$$

⁵¹ KHALSEH, Roghayeh. Evaluation of Different Kinetics for Bioethanol Production with Emphasis to Analytical Solution of Substrate Equation. En: Theoretical foundation of chemical engineering. 2016, Vol. 50, No. 4, p. 392–397.

⁵² KHALSEH, Roghayeh. Evaluation of Different Kinetics for Bioethanol Production with Emphasis to Analytical Solution of Substrate Equation. En: Theoretical foundation of chemical engineering. 2016, Vol. 50, No. 4, p. 392–397.

4.5 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS

Teniendo resueltas todas ecuaciones diferenciales analíticamente, los parámetros son calculados por medio de Matlab® (versión R2012b), que permite solucionar problemas de ajuste de datos para ecuaciones no lineales empleando el método de mínimos cuadrados. Este método, busca minimizar la suma de las diferencias cuadradas entre la concentración de ácido láctico calculada y experimental, variando los parámetros según sea el modelo.

El algoritmo de optimización empleado para la parametrización es el llamado método reflexivo con región de confianza, el cual a diferencia del método de Levenberg-Marquardt, permite introducir restricciones para los valores mínimos y máximos que pueden alcanzar los parámetros⁵³.

Los parámetros iniciales empleados para el ajuste de los modelos se muestran en la tabla 4 junto a su fuente bibliográfica.

⁵³LE, T.M., et al. Numerical optimization applying trust-region reflective least square algorithm with constraints to optimize the non linear creer parameters of soft oil. En: Applied mathematical modelling. 2017, Vol. 41, p. 236–256.

Tabla 4. Parámetros iniciales para el ajuste de cada modelo.

Modelo	Parámetros iniciales	Fuente
Luedeking-Piret	$\alpha= 4,5827$ $X_0= 0,1823\text{g/L}$ $K= 0,1\text{L/h}$ $X_{\max}=0,0570\text{g/L}$ $\beta=27,8764$ $P_0=0\text{g/L}$	GORDEEV, L.S ⁵⁴
Luedeking-Piret Modificado	$Y_{P/X}=0,310$ $X_0=0,036\text{g/L}$ $X_{\max}=1,86\text{g/L}$ $K=0,61\text{L/h}$ $\Delta t=0,49\text{h}$	MASHITAH, M.D. y SHOPARWE, N.F ⁵⁵
Logístico	$Y_{P/X}=0,310$ $X_0=0,036\text{g/L}$ $X_{\max}=1,86\text{g/L}$ $K=0,61\text{L/h}$	MASHITAH, M.D. y SHOPARWE, N.F ⁵⁶
Gompertz Modificado	$P_m=59\text{g/L}$ $r_{p,m}=1,86\text{g/Lh}$ $t_L= 72\text{h}$	KHALSEH, Roghayeh ⁵⁷

4.6 RESULTADOS

Una vez obtenidos los parámetros cinéticos para los modelos de producción (Tabla 5) por medio del software Matlab®, se reemplazaron en las ecuaciones resueltas analíticamente (Ecuaciones 5, 9 y 11) para representar todos los modelos como se muestra en la gráfica 2.

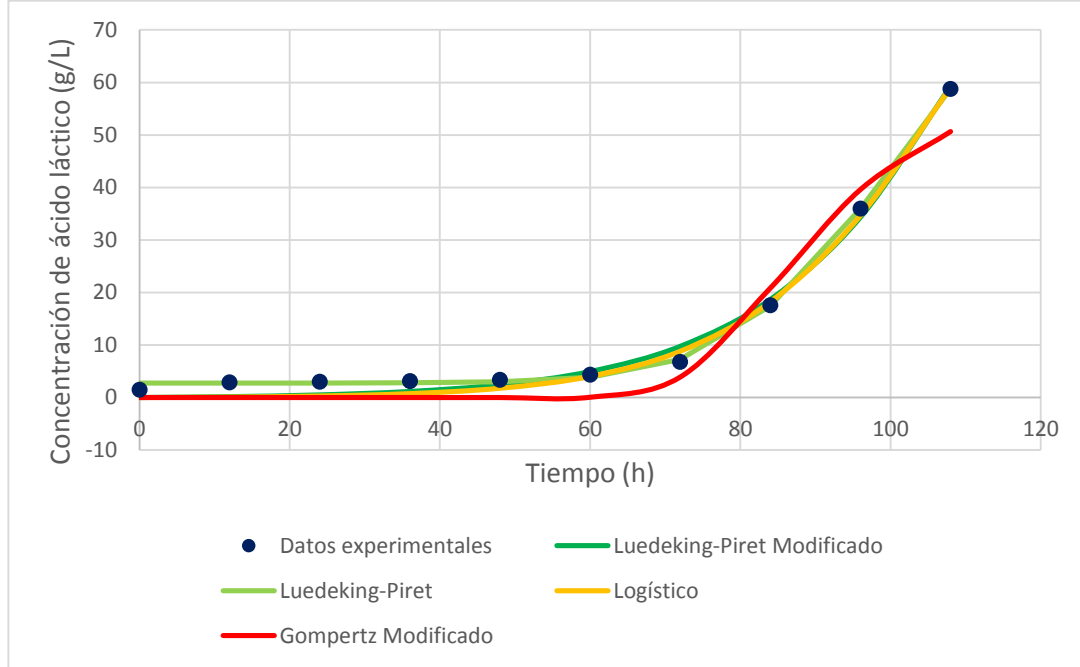
⁵⁴ GORDEEV, L.S., et al. Unstructured mathematical models of lactic acid biosynthesis kinetics: A review. En: theoretical foundations of chemical engineering., 2017, Vol. 51. no. 2. p. 175-190.

⁵⁵ MASHITAH, M.D. y SHOPARWE, N.F.. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. 2010, Vol. 49, No. 1, p. 95–103.

⁵⁶ *Ibd.*, p 95–103.

⁵⁷ KHALSEH, Roghayeh. Evaluation of Different Kinetics for Bioethanol Production with Emphasis to Analytical Solution of Substrate Equation. En: Theoretical foundation of chemical engineering. 2016, Vol. 50, No. 4, p. 392–397.

Gráfica 2. Modelos ajustados a la cinética experimental.



Observando la gráfica 2, el modelo de Gompertz Modificado resulta a simple vista ser el que menos se ajusta a los datos experimentales, esto puede atribuirse al hecho de que es una ecuación concretamente diseñada para la producción de bioetanol mediante la fermentación de glucosa por la bacteria *Saccharomyces cerevisiae*. Es decir, que entre más específico sea un modelo y más consideraciones y suposiciones se tengan en cuenta para su solución analítica, será menos probable que se ajuste a otros sistemas. Este modelo sería más apropiado para cinéticas experimentales de producción con una tendencia sigmoidea, en otras palabras, cinéticas con una fase estacionaria y de latencia bien definidas.

Por otra parte, los dos modelos de Luedeking-Piret y el modelo logístico se acercan más a la realidad de los datos experimentales. La ecuación de Luedeking-Piret Modificado se adapta mejor a los datos de producción después de la hora 48, esto se debe a la suposición que indica que la producción del metabolito de interés depende únicamente de la velocidad específica de crecimiento, que luego, al introducir el término Δt , hace que el modelo asuma una fase de latencia extensa que se traduce en una velocidad de formación de ácido láctico insignificante durante las primeras 36h como se observa en la Gráfica 2. Además de lo anterior, este modelo hace obligatorio que la concentración inicial ($t=0$ h) de producto sea nula ($P=0\text{g/L}$), lo que aumenta la diferencia entre los valores experimentales y calculados por el modelo.

El modelo logístico, al igual que el de Luedeking-Piret Modificado, fue establecido para que al inicio de la fermentación la concentración de producto se igual a cero, asumiendo como tiempo inicial el momento de inoculación del medio de cultivo.

Tabla 5. Valores estimados de los parámetros correspondientes a cada modelo.

Parámetro	Modelo			
	Luedeking-Piret	Luedeking-Piret Modificado	Logístico	Gompertz Modificado
α	6,000	-	-	-
X_0 (g/L)	1,571E-05	0,1823	0,005142	-
K (L/h)	0,1278	0,05700	0,06873	-
X_{max} (g/L)	0,4762	49,17	3,6551	-
β	4,2744	-	-	-
P_0 (g/L)	0,08192	-	-	-
$Y_{P/X}$ (g ácido láctico/ g biomasa)	-	4,583	16,07	-
P_m (g/L)	-	-	-	59,00
$r_{p,m}$ (g/Lh)	-	-	-	1,736
t_L (h)	-	-	-	72,000
Δt (h)	-	27,87	-	-

Contrario a lo observado en los tres modelos anteriores, el de Luedeking-Piret ofrece la posibilidad de que la concentración inicial de producto sea diferente de cero, es por esto que presenta un ajuste significativamente mejor para los datos experimentales de las primeras 48 horas.

Tabla 6. Coeficiente de determinación (R^2) y raíz cuadrada media (RMSE) de cada modelo.

Parámetro	Modelo			
	Luedeking-Piret	Luedeking-Piret Modificado	Logístico	Gompertz Modificado
RMSE	0,3559	1,8269	1,781	3,954
R^2	0,9993	0,9918	0,9941	0,9749

Como el fin último de este trabajo es establecer el modelo cinético que mejor se ajuste a los datos experimentales de la producción de ácido láctico, se calcula el coeficiente de determinación y la raíz cuadrada media (RMSE) para cada modelo como se muestra en la Tabla 6.

El coeficiente de determinación, da la proporción de variación entre los valores experimentales y calculados, por lo que es ampliamente usado para indicar el grado

de ajuste de modelos⁵⁸. Según Mashitah & Shoparwe⁵⁹, los valores de R^2 mayores a 0,9 señalan que el ajuste es conveniente. Por lo tanto, observando la tabla 6 se puede afirmar que los cuatro modelos planteados describen satisfactoriamente la cinética experimental, pero que el que mejor se ajusta es el modelo de Luedeking-Piret.

Por último, para comprobar que el modelo de Luedeking-Piret es el modelo que mejor representa el proceso real de fermentación, se calcula la raíz cuadrada media (RMSE) de los cuatro modelos (Tabla 6) confirmando así la selección del modelo de Luedeking-Piret.

⁵⁸ MASHITAH, M.D. y SHOPARWE, N.F..Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considerind the effect of glucose. 2010, Vol. 49, No. 1, p. 95–103.

⁵⁹ MASHITAH, M.D. y SHOPARWE, N.F..Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considerind the effect of glucose. 2010, Vol. 49, No. 1, p. 95–103.

5. CONCLUSIONES

- Se determinó que la producción de ácido láctico por la bacteria *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación del medio complejo, no se ve afectada ni disminuida por los bajos valores de pH alcanzados durante el proceso, como se pudo constatar en la tendencia de la cinética experimental.
- Se obtuvo una concentración final de 58,73 g/L de ácido láctico al realizar la fermentación del medio compuesto de piña en grado de maduración 2 según la NTC 4102. La concentración alcanzada del metabolito de interés confirma que el medio complejo seleccionado cumple con todos los requerimientos nutricionales de la bacteria y que el proceso fue llevado a cabo bajo las condiciones de crecimiento para que la bacteria mantuviese durante todo el proceso un metabolismo homofermentativo.
- Se determinó que el modelo de Luedeking-Piret es el que mejor se ajusta a la cinética de producción de ácido láctico, prediciendo el 99,93% de los datos experimentales. Este modelo permitió confirmar que, aunque los modelos no estructurados no segregados representan un caso ideal en el que la biomasa es tomada como homogénea y de composición constante, pueden representar con precisión la cinética de producción experimental cuando su única función es caracterizar la tendencia de la concentración del producto a lo largo del tiempo.

6. RECOMENDACIONES

- En la preparación del medio de cultivo se recomienda realizar una hidrólisis para romper la sacarosa y convertirla en un azúcar fermentable por la bacteria.
- Sembrar las muestras en un medio adicional para descartar el crecimiento de otras bacterias que puedan crear competencia por sustrato.
- En una próxima experimentación sembrar un medio con citrato de amonio y sin citrato de amonio para determinar si esta sustancia inhibe el crecimiento de otros microorganismos y si reacciona con el ácido láctico.
- Se recomienda hacer por lo menos un duplicado de la experimentación, y en caso de ser posible un diseño experimental para asegurar la precisión de los datos experimentales.
- En próximas experimentaciones se recomienda controlar el pH y la concentración de oxígeno en el medio, ya que son variables críticas para el crecimiento de las bacterias y la producción de ácido láctico.
- Realizar un análisis de sensibilidad para determinar las variables ambientales que afectan en mayor medida la fermentación, para controlarlas y medirlas.
- Teniendo determinadas las variables críticas para la producción de ácido láctico se pueden diseñar modelos más complejos (segregados y/o estructurados) que expliquen y predigan el comportamiento de la producción del metabolito a diferentes condiciones iniciales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALCÓN MARTÍN, Almudena. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano. Trabajo de grado de Doctor. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 1999. 454p.
- ALTERMANN, Eric.; RUSSELL, Michael y AZACARTE-PERIL, Andrea. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. En: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Marzo, 2005.vol 102. No 15. p. 3906-3912.
- AMEEN, Sara M. y CARUSO, Giorgia. Chemistry of lactic acid.En: Lactic Acid in the Food Industry. 2 ed. Cham: Springer, 2017. p. 7-15
- BAILEY, James E. y OLLIS, David F. Kinetics of substrate utilization, product formation, and biomass production in cell cultures. En: Biochemical engineering fundamentals. 2 ed. Singapore: Kiran Verma y Cydney C. Martin, 1986. p. 373-454
- CASTRO, L.; G. ECHEVERRI; R. SALAZAR y A PINON. 1993. Efecto de la temperatura en el almacenamiento de dos variedades de piña, Cayena Lisa y Manzana. En: Memorias primer simposio latinoamericano de piñicultura. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.
- DANE. Principales características del cultivo de la piña (*Ananas Comosus* L.) [en línea]. Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Diciembre 2016. Núm. 54. Disponible en: <https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/Bol_Insumos_dic_2016.pdf >.
- FALLON, A.; BELL, L. D. y BOOTH, R. F. The origins and development of liquid chromatography. En: Applications of HPLC in Biochemistry. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 1-7
- Food And Agriculture Organization Of The United States [en línea]. [citado el 22 de marzo de 2018]. Disponible en: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>.
- FREDICKSON, A. G. Segregated, structures, distributed models and their role in microbial ecology: A case study base don work done on the filter-feeding ciliate *Tetrahymena pyriformis*. En: Microbial Ecology. Febrero, 1991. Vol. 22, p. 139-159
- GARCIA, Carlos, et al. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. En: Temas Agrarios. Diciembre,2010. vol. 15, no. 2, p. 9-26

GARNIER, Alain y GAILLET, Bruno. Analytical Solution of Luedeking-Piret Equation for a Batch Fermentation Obeying Monod Growth Kinetics. En: *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, Vol. 9999, p. 1-7

GIRI, Dhurba. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. *Laboratoryinfo*. [en línea], 28 de julio de 2015 [Revisado 3 de Agosto de 2017], Disponible en internet: <<http://laboratoryinfo.com/hplc/>>

GOMES, Ana y MALCATA, Xavier. *Bifidobacterium spp* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. En: *Trends in food & science technology*. 1999. Vol 10. p. 139-157

GORDEEV, L.S., et al. Unstructured mathematical models of lactic acid biosynthesis kinetics: A review. En: *theoretical foundations of chemical engineering.*, 2017, Vol. 51. no. 2. p. 175-190.

GUILLÉN ROMERO, Laura Giselle; PAEZ, MORALES, Adriana Inés y VEGA LÓPEZ, Jorge Armando. Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de piña (*Ananas Comosus* Merr.) y banano (*musa Sapientum*) como materia prima para la síntesis de ácido poliláctico. Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Químico. Bogotá, D.C.: Fundación Universidad de América, 2013.

HERNÁNDEZ, María S.; BAREERA, Jaime A.; OVIEDO, Eliseo y ROMERO, Henry. Aspectos biológicos y conservación poscosecha de la piña nativa (*Ananas comosus* L. Merr c.v india) en la Amazonia Occidental Colombiana. En: *Aspectos biológicos y conservación de frutas promisorias de la Amazonia Colombiana*. Bogotá: Dioned Victoria González, 2004. p. 59-84.

HOFVENDAHL, Karin y HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. En: *Enzyme and Microbial Technology*. Febrero, 2000. vol. 26, no. 2-4, p. 87-107

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: El instituto, 1998.

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y escritura. NTC 5613. Bogotá: El instituto, 1988.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónica. NTC 4490. Bogotá: El instituto, 1988.

KHALSEH, Roghayeh. Evaluation of Different Kinetics for Bioethanol Production with Emphasis to Analytical Solution of Substrate Equation. En: Theoretical foundation of chemical engineering. 2016, Vol. 50, No. 4, p. 392–397.

KOPLI, Bujang; SUJANG, Sadi y SALWANI, Dayang. Effects of Calcium Carbonate in Fermentation of L-Lactic Acid from Hydrolyzed Sago Starch. En: ICBiotech. 2004. Vol. 26. p. 637-643.

LE, T.M., et al. Numerical optimization applying trust-region reflective least square algorithm with constraints to optimize the non linear creer parameters of soft oil. En: Applied mathematical modelling. 2017, Vol. 41, p. 236–256.

LUEDEKING, Robert y PIRET, Edgar. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. En: Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering. 1959, Vol. 1. no. 4. p. 393-412.

MARQUES, Susana.; SANTOS, José.; GÍRIO, Francisco y ROSEIRO, Carlos. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. En: Biochemical Engineering Journal. Octubre, 2008. Vol. 41. no. 3. p. 210-216.

MASHITAH, M.D. y SHOPARWE, N.F.. Kinetics of hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus considering the effect of glucose. 2010, Vol. 49, No. 1, p. 95–103.

NIELSEN, J., NIKOLAJSSEN, K., y VILLADSEN, J., Structured modeling of a microbial system: I. A theoretical study of lactic acid fermentation, En: Biotechnology. Bioengineering, 1991, vol. 38, no. 1, p. 11

ICONTEC NTC 4102. Frutas frescas. Piña manzana. Especificaciones. Colombia (1997)., p. 12

ROJAN, John; MADHAVAN, Nampoothiri y ASHOK, Pandey. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using Lactobacillus delbrueckii. En: Process Biochemistry. Abril, 2006. Vol. 41. no. 4. p. 759-763

SCHÜGERL, K y BELLGARDT, H. Segregated models. En: Bioreaction engineering Modeling and control. Berlin: Springer, 2000. p. 86.

SERNA-COCK, L. y STOUVENEL, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: CYTA - Journal of Food. Octubre, 2009, vol. 5, no. 1, p. 54-65

SIRKKA-LIISA, Stenroos.; LINKO, Yu-Yen y Linko, P. Production of l-lactic acid with immobilized Lactobacillus delbrueckii. En: Biotechnology Letters. Marzo, 1982. Vol. 4. no. 3. p.159-164

SNYDER, Lloyd R.; DOLAN, John W. y KIRKLAND, Joseph J. Equipment. En: Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3. ed. Hoboken, N.J: Wiley, 2010. p. 89-127

United States Department of Agriculture [base de datos en línea]. Basic Report: 09266, Pineapple, raw, all varieties. [citado en 23 de marzo de 2018]. Disponible en: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2340?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Abridged&new=&measureby=&ds=&Qv=1&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>>>

WESTON, Andrea y BROWN, Phyllis R. Detectors. En: HPLC and CE: Principles and practice. San Diego: Acad. Pr, 1997. p. 90-108

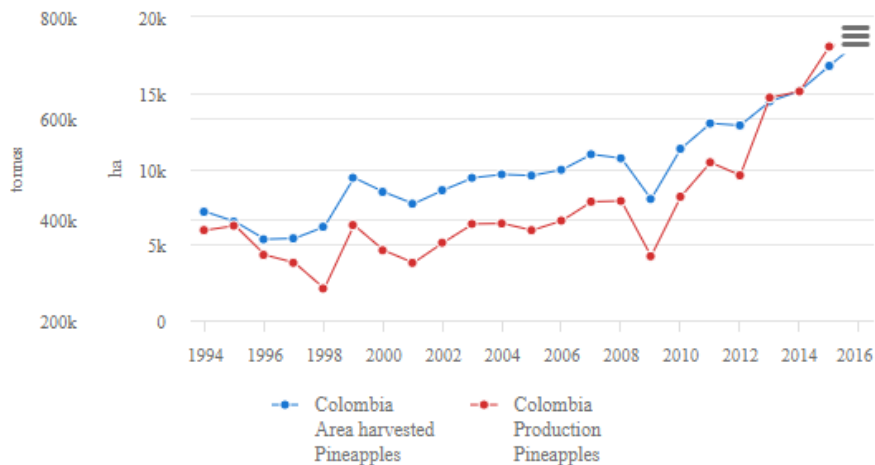
ANEXOS

ANEXO A PRODUCCIÓN COLOMBIANA DE PIÑA

A. Producción y área cosechada de piñas entre 1994-2016

Production/Yield quantities of Pineapples in Colombia

1994 - 2016

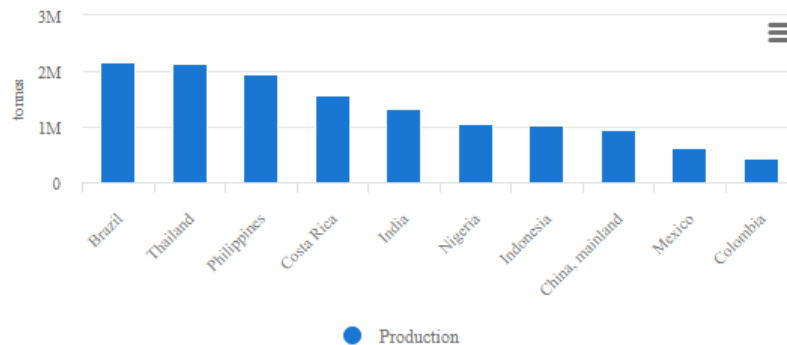


Fuente: Food And Agriculture Organization Of The United States [en línea]. [citado el 22 de marzo de 2018]. Disponible en: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>.

B. Países con mayor producción de piña

Production of Pineapples: top 10 producers

Average 1994 - 2016



Fuente: Food And Agriculture Organization Of The United States [en línea]. [citado el 22 de marzo de 2018]. Disponible en: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>.

ANEXO B EVALUACIÓN DE LA MADUREZ DE LA PIÑA

A. Requisitos de madurez según la NTC 4102.

- COLOR 0: fruto de color morado bien desarrollado.
- COLOR 1: disminuye la intensidad del color morado.
- COLOR 2: algunos ojos presentan una coloración anaranjada pero predomina el color morado.
- COLOR 3: aumenta el número de ojos de color anaranjado.
- COLOR 4: predomina el color anaranjado.
- COLOR 5: aumenta el área de color anaranjado y también aumenta su intensidad.
- COLOR 6: el fruto es de color anaranjado intenso.

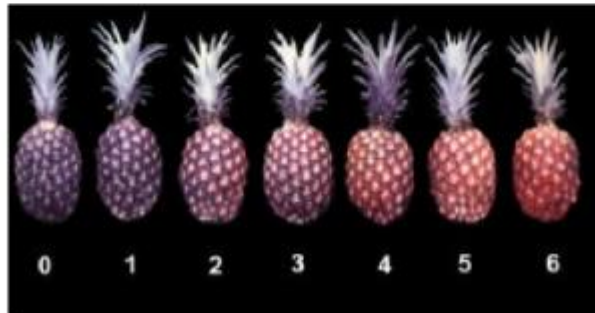
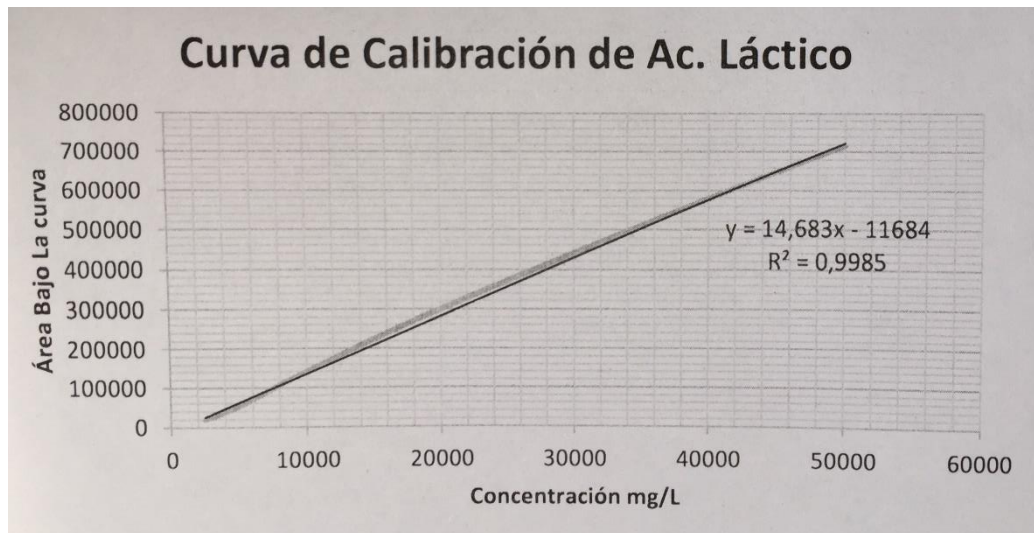


Tabla 2. Contenido mínimo de sólidos solubles totales expresado como grados Bríx ($^{\circ}$ Bx) de acuerdo con la tabla de color

Color	0	1	2	3	4	5	6
$^{\circ}$ Bx	9,2	10,5	11,4	12,0	12,0	12,2	11,3

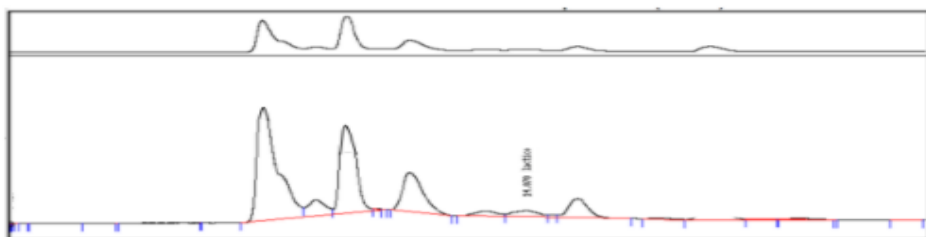
Fuente: ICONTEC NTC 4102. Frutas frescas. Piña manzana. Especificaciones. Colombia (1997)., p. 12

ANEXO C
CURVA DE CALIBRACIÓN

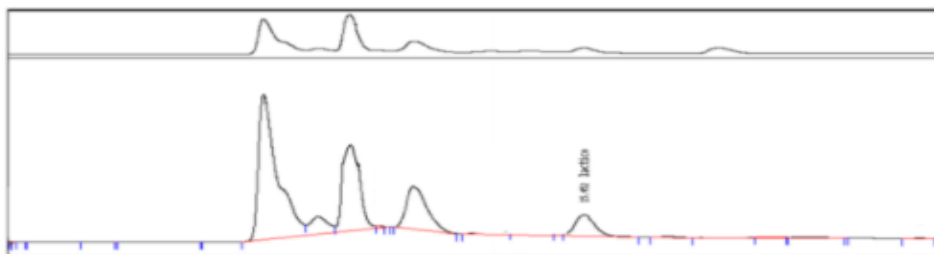


ANEXO D
CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS POR HPLC.

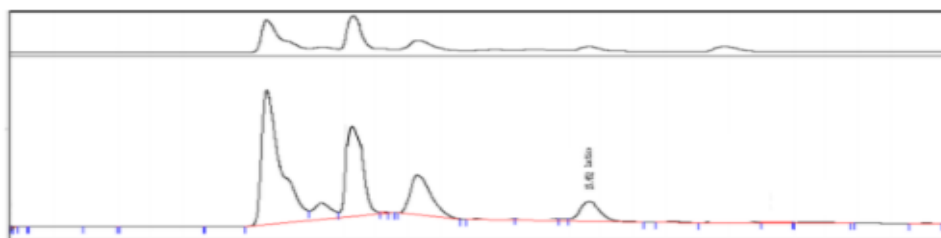
A. Cromatograma de la muestra a 0 horas de iniciada la fermentación.



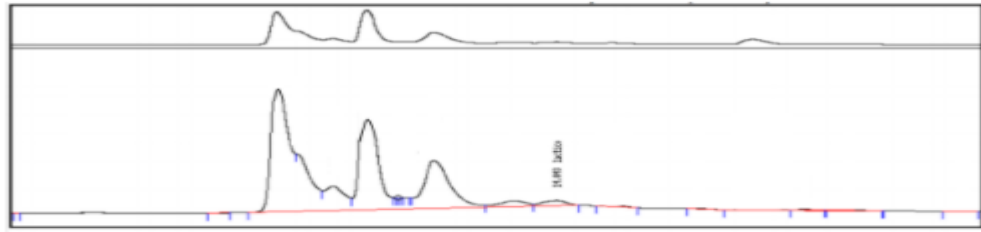
B. Cromatograma de la muestra a 12 horas de iniciada la fermentación.



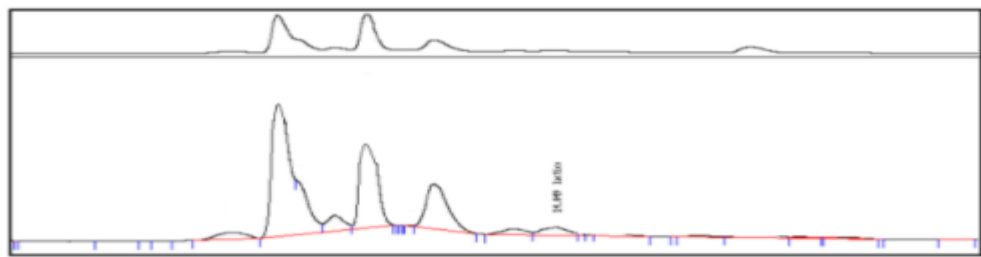
C. Cromatograma de la muestra a 24 horas de iniciada la fermentación.



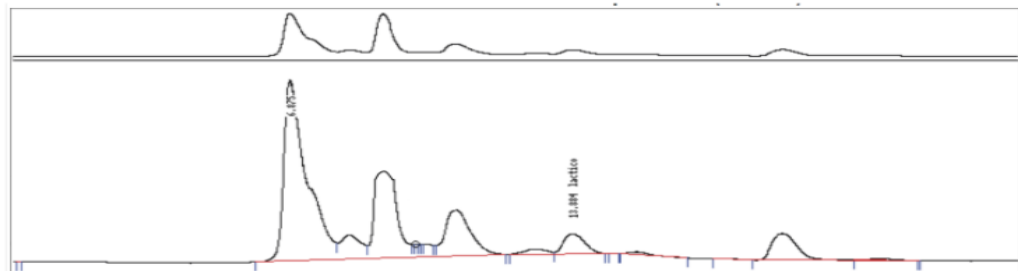
D. Cromatograma de la muestra a 36 horas de iniciada la fermentación.



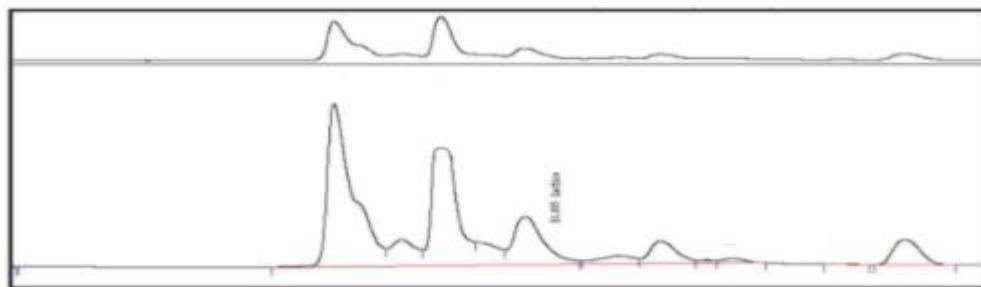
E. Cromatograma de la muestra a 48 horas de iniciada la fermentación.



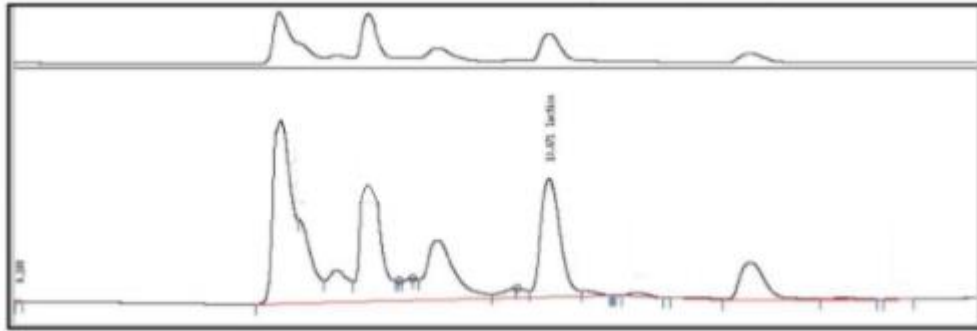
F. Cromatograma de la muestra a 60 horas de iniciada la fermentación.



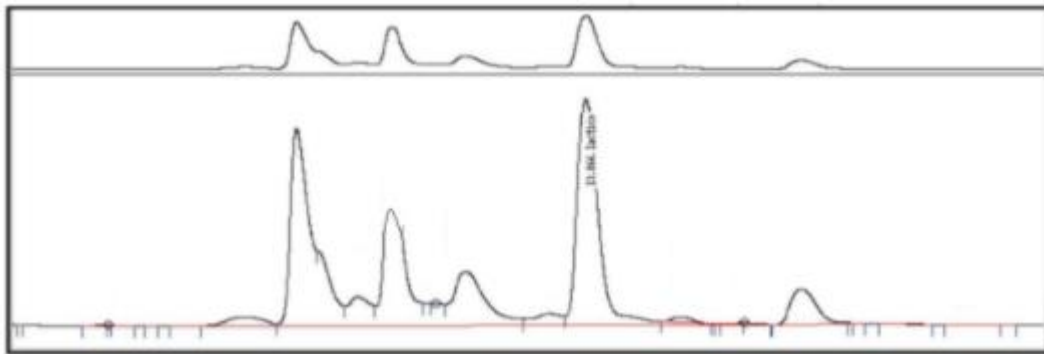
G. Cromatograma de la muestra a 72 horas de iniciada la fermentación.



H. Cromatograma de la muestra a 84 horas de iniciada la fermentación.



I. Cromatograma de la muestra a 96 horas de iniciada la fermentación.



J. Cromatograma de la muestra a 108 horas de iniciada la fermentación.

