

**EVALUACIÓN Y SIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
LÁCTICO CON *Lactobacillus casei* ATCC 7469**

DIEGO ANDRÉS SUÁREZ ZULUAGA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS
ESCUELA DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD EAFIT
MEDELLÍN
2007**

**EVALUACIÓN Y SIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
LÁCTICO CON *Lactobacillus casei* ATCC 7469**

DIEGO ANDRÉS SUÁREZ ZULUAGA

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

ASESOR

MRes. VALESKA VILLEGAS ESCOBAR

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

ESCUELA DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD EAFIT

MEDELLÍN

2007

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Jurado

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Se le expresa agradecimiento por su colaboración a:

MRes. Valeska Villegas E. por su asesoría.

MSc. Catalina Giraldo. Por su colaboración en varios temas.

MSc. Luz Deisy Marín. Por su ayuda con las cromatografías.

Personal del laboratorio de Ingeniería de Procesos: Edgar Arbelaez y
Sigifredo Cárdenas

Maria Adelaida Chica. Al trabajar conmigo en la simulación en HYSYS.

Esteban Jaramillo F. por sus consejos para las otras simulaciones.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ECUACIONES.....	XII
RESUMEN.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
1 MARCO TEORICO.....	18
1.1 EL ÁCIDO LÁCTICO.....	18
1.2 USOS DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	21
1.3 LOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ACIDO LÁCTICO.....	24
1.4 FERMENTACIONES.....	28
1.4.1 Parámetros de relevancia en la producción de ácido láctico.....	29
1.4.2 Consideraciones del proceso.....	33
1.5 LOS PROCESOS DE SEPARACIÓN.....	33
1.5.1 Extracción reactiva.....	35
1.5.2 Adsorción.....	35
1.5.3 Electrodialisis.....	35
1.5.4 Esterificación y destilación reactiva.....	36
1.5.5 Proceso de separación del ácido láctico.....	36
1.6 EL MERCADO DEL ÁCIDO LÁCTICO	37
1.6.1 Precios y costos.....	37
1.6.2 Producción y cuantificación de la oferta existente.....	38
1.6.3 Crecimiento esperado y factores que inciden.....	38
1.6.4 Proyección de la demanda.....	39

1.7	SIMULACIÓN DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS	40
1.7.1	Modelo de simulación.....	41
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
2.1	LOCALIZACIÓN.....	44
2.2	MEDIO DE CULTIVO.....	44
2.3	MICROORGANISMO UTILIZADO.....	44
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	47
2.4.1	MEDICIÓN DE BIOMASA.....	47
2.4.2	MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA.....	48
2.4.3	MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	48
2.5	FERMENTACIONES	49
2.5.1	Evaluación de la concentración de carbonato de calcio.....	49
2.5.2	Sistema batch en biorreactor.....	50
2.5.3	Sistema Fed-batch.....	51
2.6	SIMULACIÓN.....	53
2.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
3.1	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO	55
3.2	PROCESO FERMENTATIVO EN MODO BATCH EN BIORREACTOR.....	59
3.3	FERMENTACIONES FED-BATCH.....	63
3.3.1	Fed-batch 1.....	63
3.3.2	Fed-batch 2.....	65
3.3.3	Fed-batch 3.....	67
3.4	SIMULACIÓN.....	72
3.4.1	Simulación del biorreactor en modo batch.....	72
3.4.2	Simulación en Superpro Designer.....	76
3.4.3	Simulación en HYSYS.....	79
4	CONCLUSIONES.....	87

5	RECOMENDACIONES.....	90
6	BIBLIOGRAFIA.....	91
	ANEXO 1.	98
	ANEXO 2.....	101
	ANEXO 4.....	105
	ANEXO 5.....	110

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades del ácido láctico	18
Tabla 2. Estadísticas de las Importaciones de Colombia por Países para el ácido láctico.....	40
Tabla 3. Composición del medio de cultivo MRS.....	45
Tabla 4. Parámetros productivos bajo diferentes concentraciones de carbonato de calcio.....	58
Tabla 5. Parámetros productivos de ácido láctico en un biorreactor en modo batch.....	60
Tabla 6. Parámetros productivos en la fermentación fed-batch 1.....	65
Tabla 7. Parámetros productivos en la fermentación fed-batch 2.....	66
Tabla 8. Parámetros productivos en la fermentación fed-batch 3.....	68
Tabla 9. Resultados obtenidos con las diferentes configuraciones evaluadas.....	69
Tabla 10. Parámetros cinéticos obtenidos en Polymath 6.0.....	73
Tabla 11. Tabla de corrientes.....	78
Tabla 12. Tabla de corrientes.....	82
Tabla 13. Tabla de Equipos y Utilities.....	83
Tabla 14. Grados de libertad utilizados en los equipos.....	85
Tabla 15. Matriz de indicadores de proceso.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estéreofomas del ácido láctico.	19
Figura 2. Métodos de producción de ácido láctico.	20
Figura 3. Diagrama de los usos comerciales y aplicaciones del ácido láctico.	21
Figura 4. Álbum filogenético de bacterias ácido lácticas (LAB) y bacterias relacionadas.	25
Figura 5. Rutas metabólicas en LAB para obtener ácido láctico.	27
Figura 6. Proceso de separación del ácido láctico.	37
Figura 7. <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469.	45
Figura 8. Liófilo.	46
Figura 9. Sistema de perlas Cryobank.	47
Figura 10. Agitador lineal con control de temperatura.	50
Figura 11. Biorreactor BIOENGINEERING CH 8636.	51
Figura 12. Cinética de las fermentaciones variando la concentración de carbonato de calcio.	56
Figura 13. Cinética de Fermentación en biorreactor en modo batch.	60
Figura 14. Cinética de la fermentación fed-batch 1.	64
Figura 15. Cinética de la fermentación fed-batch 2.	66
Figura 16. Cinética de la fermentación fed-batch 3.	68
Figura 17. Resultados obtenidos con las diferentes configuraciones evaluadas.	71
Figura 18. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de la biomasa.	75
Figura 19. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de sustrato.	75
Figura 20. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de producción de ácido láctico.	76
Figura 21. Velocidad Especifica de Crecimiento vs. Concentración de	

Sustrato.....	77
Figura 22. Diagrama de flujo de la fermentación.....	78
Figura 23. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de producción de ácido láctico	79
Figura 24. Diagrama de flujo del proceso.....	84

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Modo diferencial del modelo de crecimiento logístico.....	40
Ecuación 2. Forma integrada de la ecuación de crecimiento logístico....	41
Ecuación 1. Modo diferencial de la ecuación de Luedeking-Piret.....	41
Ecuación 4. Ecuación de consumo de glucosa.....	41
Ecuación 5. Concentración (g/L) de biomasa.....	48
Ecuación 6. Rendimiento observado de sustrato en producto (g/g).....	52
Ecuación 7. Productividad volumétrica (g/L.h).....	53
Ecuación 8. Rendimiento observado de sustrato en biomasa (g/g).....	53
Ecuación 9. Ecuación de Monod.....	77

RESUMEN

El ácido láctico y sus derivados han sido ampliamente usados en el área alimenticia, farmacéutica y en aplicaciones industriales. Este puede sufrir una gran cantidad de conversiones químicas hacia compuestos potencialmente útiles como el óxido de propileno, el propilenglicol, el ácido acrílico, 2,3 pentanodionas, los ésteres de lactato y el ácido poliláctico (polímero biodegradable que podría ser un buen sustituto para plásticos sintéticos derivados del petróleo). Debido a la gran cantidad de oportunidades que existen en el mercado para este compuesto, la producción del ácido láctico se evaluó por medio de procesos de biotransformación con *Lactobacillus casei* ATCC 7469 bajo diferentes concentraciones de carbonato de calcio como agente regulador del pH, así como el modo de operación batch y fed-batch por pulsos en un biorreactor de 3 L. Adicionalmente, se ajustó la cinética de crecimiento de biomasa a la ecuación logística, la cinética de producción de ácido láctico a la ecuación de Luedeking–Piret, y la cinética de consumo de sustrato a la propuesta por Islam *et al.* (2003). Se encontró que la concentración de carbonato de calcio no tuvo efecto significativo sobre la producción de ácido láctico ($P > 0.05$), y que no habían diferencias significativas entre el modo batch y fed-batch. Contrario a lo reportado por Guoqiang *et al.* (1991) no hubo mejora de los parámetros productivos (productividad de ácido láctico, rendimiento observado de sustrato en producto, y concentración de ácido láctico) con el cambio en el modo de operación de batch a fed-batch, pero la cantidad en gramos producidos en el proceso fed-batch fue significativamente superior ($P < 0,05$). Sin embargo, el rendimiento de sustrato en producto (2,71 g/g), la productividad de ácido láctico (2,4 g/L.h), y la concentración final del metabolito (122,6 g/L) fue superior a otras reportados por diferentes investigadores (Schugerl *et al.*, 1993; Petrov *et al.*, 2007 y Vaccari *et al.*, 1993).

Adicionalmente, se realizó una simulación de la fermentación en modo batch, con los modelos que se ajustaron al proceso.

Palabras clave: Fermentación ácido láctica, *Lactobacillus casei*, modelos cinéticos, fed-batch, simulación.

INTRODUCCIÓN

El mercado del ácido láctico parece estar en crecimiento, con precios estables y a la espera de una demanda en aumento. Aunque el mercado de ácido láctico en alimentos y bebidas se está expandiendo, se espera que otras aplicaciones industriales crezcan rápidamente, por ejemplo que la demanda de polímeros y solventes ambientalmente amigables a partir de ácido láctico se incremente sustancialmente en los próximos años (Jarvis, 2001).

Actualmente, a nivel mundial, algunos observadores aseguran que la producción de esta compuesto tiene un incremento de 12-15% anual (Joglekar *et al.*, 2006), y se tiene proyectado un aumento de la demanda de un 45.5% anual para el uso en polímeros biodegradables (Jarvis, 2001).

Ante la demanda en aumento y ya que en Colombia no existen hasta ahora empresas que lo produzca, con este trabajo se pretende iniciar una investigación alrededor del tema que genere conocimiento para el sector productivo. Para esto se comenzó a estudiar la producción de ácido láctico por medio de la fermentación bacteriana, aunque también puede serlo a través de la hidrólisis del lactonitrilo (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

Debido a las razones anteriormente mencionadas, se estudiaron algunas de las variables del proceso de producción del ácido láctico. Inicialmente se evaluó la concentración de carbonato de calcio, el cual reacciona con el ácido láctico producido por la bacteria para evitar una caída del pH y por consiguiente evitar la inhibición del lactobacilo. Posteriormente, se

estudió el modo de fermentación, realizando una comparación entre el modo batch y el modo fed-batch con alimentación de sustrato por pulsos.

Para la realización de esta investigación se utilizó una cepa certificada, el *Lactobacillus casei* ATCC 7469, el cual ha tenido un buen comportamiento en la fermentación para producción de ácido láctico en estudios anteriores (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Evaluar y simular la producción de ácido láctico con *Lactobacillus casei* ATCC 7469, en sistemas de cultivo batch y fed-batch a nivel de laboratorio por medio de la cuantificación de los parámetros cinéticos y de la utilización de un software de simulación.

Objetivos específicos.

- Evaluar la cinética de crecimiento, consumo de sustrato y formación de ácido láctico con *Lactobacillus casei* ATCC 7469 por métodos gravimétricos en un sistema de fermentación batch variando las concentraciones de carbonato de calcio, para determinar las mejores condiciones de fermentación.
- Evaluar la cinética de formación de biomasa, de consumo de sustrato y formación de ácido láctico con *Lactobacillus casei* ATCC 746 por métodos gravimétricos en un sistema de alimentación fed-batch por pulsos variando el flujo de alimentación, para determinar las mejores condiciones de fermentación.
- Simular la fermentación de ácido láctico en modo batch por medio de la utilización de un software comercial.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 EL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico se ha usado como preservativo natural en productos alimenticios desde hace mucho tiempo. Actualmente, es usado en una amplia variedad de aplicaciones industriales especializadas (Reddy *et al.*, 2007).

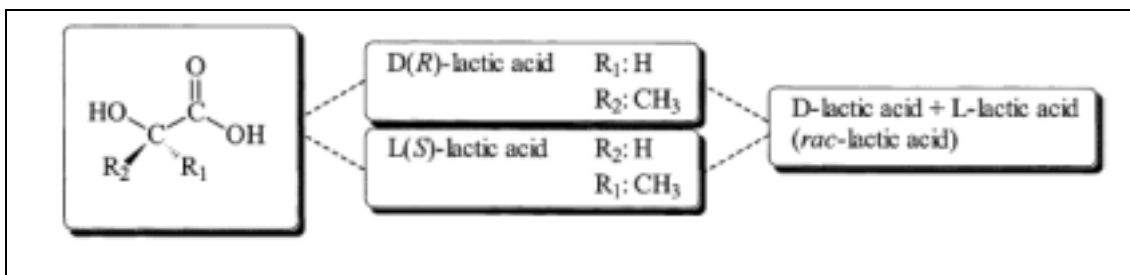
La Tabla 1 muestra algunas de las propiedades del ácido láctico.

Tabla 1. Propiedades del ácido láctico (Merck S.A., 2006).

PROPIEDAD	CONCENTRACIÓN	TEMPERATURA / PRESIÓN	VALOR / CUALIDAD	UNIDADES
Estado físico			aceitoso	
Color			incolore	
Olor			inodoro	
Valor pH	a 10 g/L H ₂ O	(20°C)	2.8	
Viscosidad Dinámica		(20°C)	20-40	mPa*s
Punto de Fusión			18	°C
Punto de ebullición		(20 hPa)	122	°C
Temperatura de ignición			no combustible	
Punto de inflamación			no inflamable	
Presión de vapor		(25°C)	0.1	hPa
Densidad		(20°C)	1.21	g/cm ³
Solubilidad en agua		(20°C)	Fácilmente soluble	

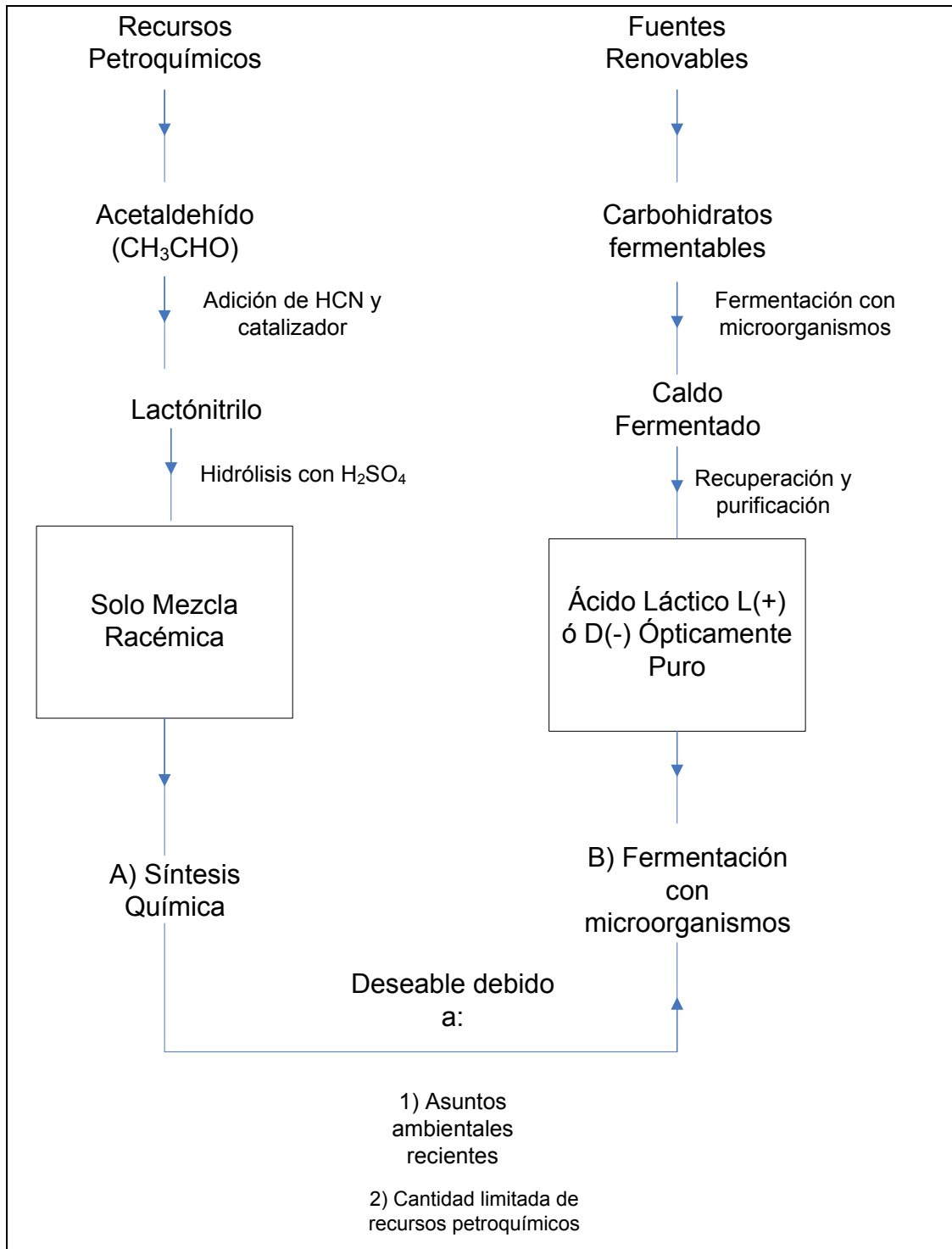
El ácido láctico (ácido 2-hidroxi-propanoico), es un compuesto incoloro de fórmula $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$. Es una de las moléculas ópticamente activas más pequeñas de la naturaleza y se encuentra bajo dos formas: la dextrógira D(-) y levógira L(+), frecuentemente denominadas ácido D-láctico y ácido L-láctico (Figura 1). Es producido por animales, plantas y microorganismos en la naturaleza. También puede ser derivado a partir de intermedios con un origen en materiales renovables (por ejemplo acetaldehído, etanol) o a partir de químicos derivados del carbón (acetileno) o aceites (etileno) (Sodergard y Stolt, 2002).

Figura 1. Estéreoformas del ácido láctico (Sodergard y Stolt, 2002).



Ya que niveles elevados del isómero D (-) son peligrosos para los humanos, el isómero L(+) es preferido (Akerberg *et al.*, 1998). Aproximadamente el 90% del total del ácido láctico es producido a través de fermentación bacteriana y el resto sintéticamente por la hidrólisis de lactonitrilo (Gokhale *et al.*, 2006) (Figura 2). Esta última siempre resulta en su mezcla racémica, lo cual es su mayor desventaja; mientras que la producción fermentativa puede originar ya sea uno de los isómeros, o la mezcla racémica, dependiendo en el microorganismo, sustrato y condiciones de cultivo usadas. La producción fermentativa ofrece las ventajas de utilización de carbohidratos renovables y de la producción del ácido L o D ópticamente puro. Las propiedades físicas de uno de los principales derivados del ácido láctico, el ácido poliláctico, dependen de la composición isomérica del monómero (Akerberg *et al.*, 1998).

Figura 2. Métodos de producción de ácido láctico. (a) Síntesis química, (b) fermentación microbiana. (SSF) Sacarificación y fermentación simultánea. (Wee *et al.*, 2006.)

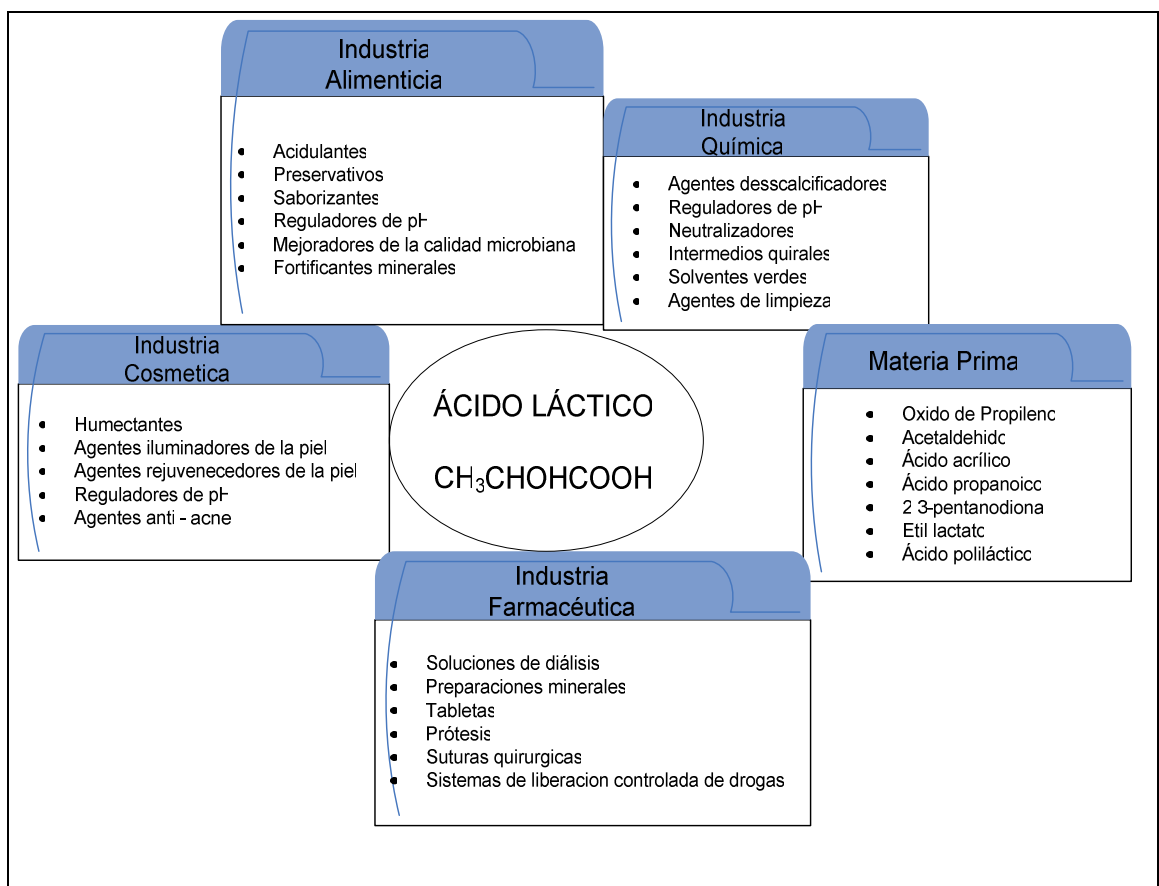


Para que el ácido láctico sea usado en nuevas aplicaciones y mercados emergentes, es esencial un proceso de manufactura económico, eficiente y ambientalmente seguro, capaz de optimizar los altos costos de separación y purificación (Bolaños *et al.*, 2000).

1.2 USOS DEL ÁCIDO LÁCTICO.

En la figura 3 se muestra una visión general de sus posibles usos:

Figura 3. Diagrama de los usos comerciales y aplicaciones del ácido láctico (Wee *et al.*, 2006).



El ácido láctico ha recibido bastante atención como químico debido a su

gran cantidad de usos potenciales. Existen cuatro grandes áreas en las que es usado actualmente: alimenticia, cosmética, farmacéutica y en aplicaciones químicas. Las aplicaciones potenciales están ilustradas en la Figura 3. Es clasificado como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro) para su uso como aditivo alimenticio, por lo cual es ampliamente usado en casi todos los segmentos de la industria alimenticia, debido a su gran cantidad de funciones, como saborizante, regulador del pH, mejorador de la calidad microbiana y fortificante mineral.

Este es un compuesto que también es usado comercialmente en las industrias de las aves de corral y de las carnes, ya que aumenta su tiempo de almacenamiento y sabor y controla patógenos. Debido a su sabor ácido, también es usado como acidulante en ensaladas, productos de panadería, bebidas, en confitería no solo como saborizante sino también como controlador del pH durante el proceso. Las ventajas de usar este compuesto en la industria incluyen su bajo costo, fácil manejo y la capacidad de producir dulces incoloros (Wee *et al.*,2006).

Este es un ácido que agrega ingredientes naturales para aplicaciones cosméticas. Aunque inicialmente fue usado como humectante y regulador del pH, posee múltiples propiedades, entre ellas la actividad antimicrobiana y rejuvenecedor e hidratante de la piel. El efecto humectante está directamente relacionado con la capacidad de retención de agua del lactato y el rejuvenecimiento de la piel es producido por la supresión de la formación de tironasa. Ya que son ingredientes naturales del cuerpo humano, tanto el ácido como sus sales tienen perfecta acogida en las nuevas tendencias hacia formulaciones naturales y seguras y con efectos que los hacen muy atractivos como ingredientes activos en los cosméticos (Wee *et al.*, 2006)

También es usado en la industria farmacéutica como electrolito en soluciones intravenosas que sirven para aumentar los fluidos del cuerpo.

Además, se emplea en una amplia variedad de productos minerales, como tabletas, prótesis, suturas quirúrgicas y sistemas controlados de entrega de droga (Wee *et al.*, 2006).

El ácido láctico y sus sales son usados en varios tipos de productos y procesos químicos, por ejemplo: como agente de desincrustación, regulador del pH, neutralizador, intermedio quiral, solvente, agente de limpieza, agente de liberación de acidez, agente antimicrobiano y agente humectante. También tiene un uso emergente como solvente seguro, el cual es una alternativa en muchas aplicaciones de limpieza fina en la industria metalmeccánica. Debido a la alta capacidad de solvencia y a la solubilidad de ácido láctico, es un excelente removedor de polímeros y resinas. Está disponible con una pureza isomérica mayor al 98%, y sirve como materia prima en la producción de herbicidas o productos farmacéuticos. Debido a que presenta mejores propiedades de desincrustación que los productos orgánicos tradicionales, es usado en muchos productos de este tipo, tales como, limpiadores de baños, cafeteras y sanitarios. El etil lactato es usado en preparaciones antiacné, ya que combina excelente solvencia contra aceites y manchas poliméricas, con el hecho de no tener impactos ambientales ni efectos toxicológicos (Wee *et al.*, 2006).

Actualmente, es considerado la materia prima monomérica con mayor potencial para conversiones químicas, pues tiene dos grupos funcionales reactivos, uno carboxílico y otro hidroxilo. Adicionalmente, este puede tener conversiones hacia químicos potencialmente útiles, como el óxido de propileno (vía hidrogenación), ácido propanoico (vía reducción), ácido acrílico (vía deshidratación), acetaldehído (vía descarboxilación), 3-pentanodiona (vía condensación), y diláctido (vía auto esterificación). También ha recibido mucha atención como monómero para la producción de ácido poliláctico, el cual es un polímero biodegradable. El ácido láctico ópticamente puro puede ser polimerizado en ácido poliláctico de alto peso

molecular a través de una serie de conversiones de policondensación, despolimerización y polimerización de apertura de anillo. El polímero resultante, tiene numerosos usos en una gran cantidad de aplicaciones, como ropa protectora, empaque de alimentos, bolsas de basura, contenedores rígidos, empaques flexibles y bandejas de vida corta (Wee *et al.*, 2006).

Diferentes reportes en los que se evalúan las propiedades de los polímeros del ácido láctico han demostrado sin duda alguna que tienen potencial para muchas aplicaciones diferentes, debido a la posibilidad de modificar las propiedades dentro de un rango amplio. Estos, en adición a su probada degradabilidad en sistemas biológicos y su verificada biocompatibilidad, hacen de estos polímeros muy promisorios especialmente en aplicaciones médicas (Sodergard y Stolt, 2002).

Se ha reportado que la estructura de estos polímeros tiene elevada estabilidad en sus propiedades mecánicas y termo físicas, lo que los hace aptos para ser usados en aplicaciones médicas en donde estas propiedades son muy importantes (Sodergard *et al.*, 2002).

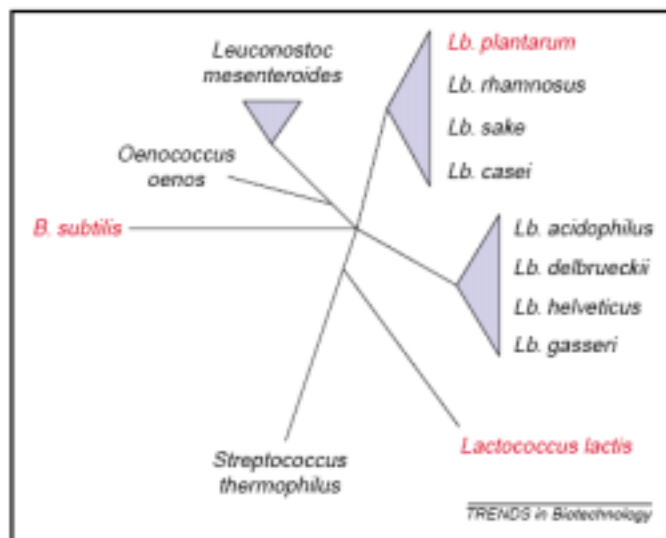
1.3 LOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ACIDO LÁCTICO.

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son ampliamente usadas en fermentaciones industriales de alimentos y están recibiendo gran atención por su uso como fábricas celulares para la producción de compuestos industriales y farmacéuticos. La conversión glicolítica de azúcares a ácido láctico es la ruta metabólica más importante en estas bacterias.

Las LAB son microorganismos de crecimiento rápido con pequeños genomas, metabolismo simple y relevancia industrial. Estas son un grupo

de bacterias Gram-positivas relacionadas filogenéticamente, que incluye *Lactococcus* y *Lactobacillus* sp. (Figura 4). Además, son consideradas fábricas celulares programadas que producen ácido láctico a partir de azúcares y son usadas en varias aplicaciones industriales (Vos y Hugenholtz, 2004).

Figura 4. Álbum filogenético de bacterias ácido lácticas (LAB) y bacterias relacionadas (Vos y Hugenholtz 2004).



Las LAB consisten en los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*(Ent), *Lactobacillus* (Lb), *Lactococcus* (Lc), *Leuconostoc* (Leu), *Oenococcus*, *Pediococcus* (Ped), *Streptococcus*(Str), *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*.(Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

Son microorganismos de tipo “coci”, con la excepción de los *Lactobacillus* y *Carnobacteria* que son bastones (*rods*), incapaces de sintetizar ATP por respiración, y que tienen el ácido láctico como el mayor producto final a partir de la conservación de energía en la fermentación de azúcares. La mayor parte de LAB son anaerobios facultativos, catalasa negativos, y no formadores de esporas. Tienen alta tolerancia a los ácidos y sobreviven a

pH de 5 y menores. Su tolerancia ácida les da ventaja sobre otras bacterias. Su temperatura de crecimiento óptima varía entre 20 y 45 °C. La mayor parte de ellas son consideradas GRAS, pero algunas de las cepas como *Streptococci* son patogénicas. Todos los géneros LAB pertenecen a la subdivisión *Clostridium* (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

Estos microorganismos tienen requerimientos nutricionales complejos, debido a su limitada habilidad para sintetizar vitaminas B y aminoácidos. Por lo que existen ambientes naturales ricos en nutrientes como plantas, leche y dentro de cuerpos de humanos y animales. Los LAB han sido usadas por los humanos para la fermentación de comidas y productos alimenticios desde la antigüedad y su mayor aplicación actual es todavía en la industria de alimentos, por ejemplo en la producción de productos lácteos, carne y vinos. Las aplicaciones técnicas actuales de las LAB incluyen la producción de dextrano a partir de sucrosa por *Leuconostoc mesenteroides*, la producción de lisina a partir de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y la producción de ácido láctico para diferentes aplicaciones. También se ha sugerido que las LAB podrían ser usadas como vectores para medicina oral.

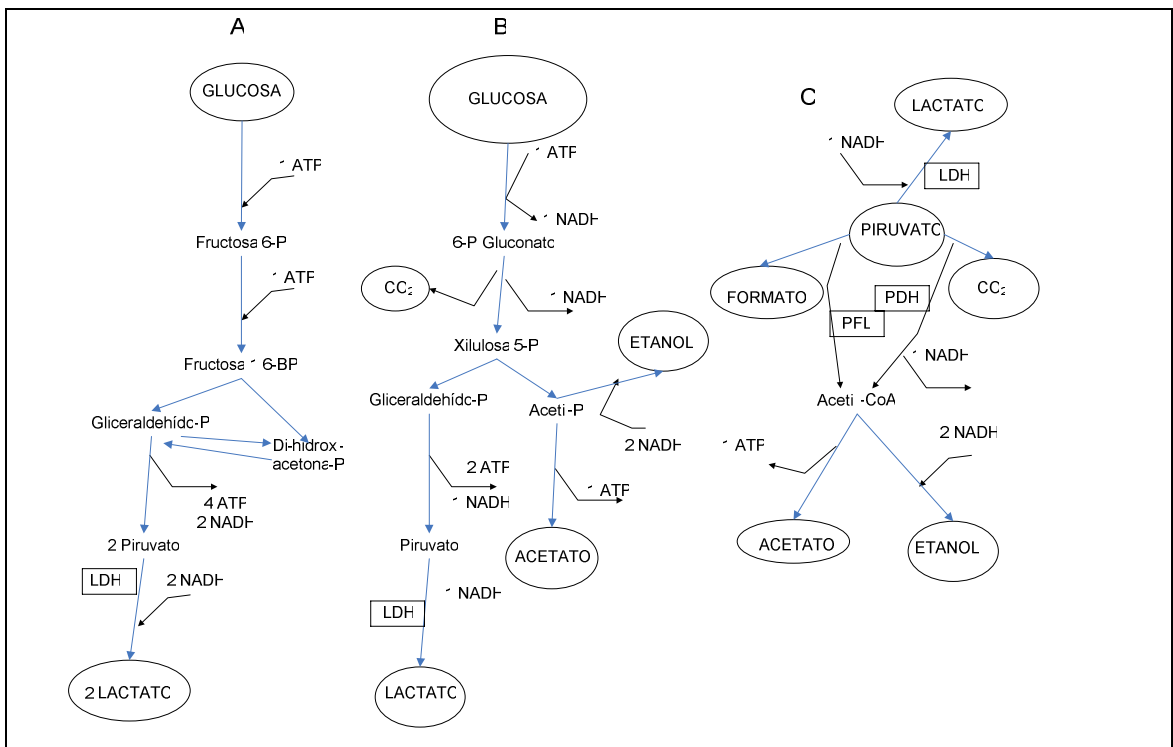
Las LAB fermentan azúcares a través de diferentes rutas metabólicas resultando en fermentaciones homo, hetero y ácida mezclada (Figura 5) (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

En la homofermentación se obtiene ácido láctico como el producto final del metabolismo de la glucosa, usando la ruta metabólica Embed-Meyerhof-Parnas (Figura 5A). En la fermentación se forman cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol o acetato, a partir de la glucosa a través de la ruta metabólica de la fosfoquetolasa (Figura 5B). La relación de etanol y acetato depende en el potencial redox del sistema. Esta ruta es usada por heterofermentadores facultativos como *Lactobacillus casei*, para la fermentación de pentosas, y la

fermentación de hexosas y pentosas por homofermentadores obligados como *Leuconostoc*. Todas las LAB excepto *Lactobacilli* tipo I (por ejemplo *Lactobacillus delbrueckii*) son capaces de fermentar pentosas, por lo que son heterofermentadores facultativos. (Hagerdal y Hofvendahl, 2000)

Figura 5. Rutas metabólicas en LAB para obtener ácido láctico (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

Homofermentación (A), heterofermentación (B), y fermentación ácida mezclada (C), P = fosfato, BP = bifosfato, LDH = lactato deshidrogenasa, PFL = liasa piruvato formato, y PDH = piruvato deshidrogenasa



Los ácidos mezclados son formados por homofermentadores como *Lactococci* durante la limitación de la glucosa y durante el crecimiento en otros azúcares, por ejemplo el *Lactococcus lactis* cuando crece en maltosa o lactosa o a pH elevados y bajas temperaturas produce, además del ácido láctico, etanol, acetato y formato. Durante estas condiciones la ruta metabólica homofermentativa es usada, pero la diferencia está en el

metabolismo del piruvato, que en adición al ácido láctico también es metabolizado en acetil-CoA por la piruvato formato liasa (PFL) (Figura 5C). En la presencia de oxígeno la PFL es inactivada y se activa una ruta alternativa del metabolismo del piruvato vía piruvato deshidrogenasa (PDH), resultando en la producción de dióxido de carbono, acetil-CoA y NADH (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

El grupo de los lactobacilos homofermentativos está integrado por *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus acidophilus* (Sánchez y Ramírez, 2004).

1.4 FERMENTACIONES.

Se han patentado numerosos procesos de producción fermentativa de ácido láctico. Ellos incluyen la fermentación de desecho de almidón industrial, por ejemplo de papa, con una mezcla de cinco cepas de *Lactobacillus*. También se ha reportado el uso de permeado de suero en un proceso continuo con recirculación celular y electrodiálisis (Bailey *et al.*, 1998) de material lignocelulósico y una cepa de *Lactobacillus* capaz de fermentar xilosa. Varias patentes describen la producción de ácido láctico ópticamente puro, ya sea L(+) (Veringa, 1994), o D(-) (Severson y Barrett, 1995). En una patente se describe el desarrollo de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* tolerante al ácido láctico (Robison, 1988), también han sido patentados métodos de purificación a partir del caldo de fermentación con electrodiálisis (Miura y Kumagai, 1995), separación por membranas (Russo y Kim, 1996) y esterificación (Kumagai *et al.*, 1994).

Muchos parámetros influyen la eficiencia de los procesos de fermentación. Debido a la tolerancia al oxígeno de las LAB la mayor parte de las fermentaciones son llevadas a cabo sin control de oxígeno. En todo caso se prefiere condiciones anaerobias a condiciones aerobias o

microaerofílicas (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

La efectividad de un proceso puede ser medida como la concentración del ácido láctico producida, como el rendimiento de ácido láctico basado en el sustrato y como la productividad.

1.4.1 Parámetros de relevancia en la producción de ácido láctico.

1.4.1.1 pH: El pH de la fermentación puede fijarse al comienzo y permitirse disminuir debido a la producción del ácido, o puede ser controlado por titulación, extracción, absorción o electrodiálisis del ácido láctico. Su efecto ha sido estudiado bajo diferentes valores. En todos los casos, la titulación a un pH constante ha resultado en concentraciones iguales o mayores, en comparación con los casos donde no hay control de este (Hagerdal y Hofvendahl, 2000). La remoción del ácido por electrodiálisis y extracción, incluyendo sistemas de dos fases acuosos, ha sido usado satisfactoriamente en varios sistemas, mientras en otros la titulación ha dado los mismos o mejores resultados (Ye *et al.*, 1996). El pH óptimo para la producción de ácido láctico varía entre 5.0 y 7.0. Un pH menor a 5.7 ha sido óptimo para las cepas de *Lactobacillus*, las cuales son conocidas por tolerar menores valores de pH que las *Lactococci* (Kashket, 1987).

1.4.1.2 Fuente de carbono: Diferentes sustratos han sido usados para la producción fermentativa de ácido láctico con LAB. El producto más puro ha sido obtenido cuando un azúcar puro es fermentado, resultando en menores costos de purificación; pero esto es económicamente desfavorable, porque los azúcares puros son costosos y el ácido láctico es un producto económico. En vez de ellos los productos de desechos de la agricultura y la silvicultura son utilizados. Comparando

diferentes fuentes de carbono se observa que la glucosa arroja mayores concentraciones de ácido láctico y rendimientos que con otros azúcares. La xilosa, galactosa, arabinosa, lactosa, fructosa y celulosa hidrolizada han sido menos efectivos (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

1.4.1.3 Fuente de Nitrógeno: La composición del medio ha sido investigada en muchos aspectos, incluyendo la adición de varios nutrientes en la forma de extracto de levadura, peptona o jarabe de maíz. Las concentraciones de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo se encuentran, por lo general, entre 10 y 25 gr/L, mostrando que la adición de nutrientes y concentraciones más altas de estos, tienen un efecto positivo en la producción de ácido láctico. Con solo extracto de levadura se obtiene mayor producción de ácido láctico que con extracto de levadura y peptona en bajas cantidades, pero lo opuesto ocurre cuando la concentración de extracto de levadura se mantiene constante y se adiciona peptona (Amrane y Prigent, 1997).

1.4.1.4 Temperatura: El efecto de la temperatura en la producción de ácido láctico ha sido estudiado en pocos reportes. La temperatura que da mayores productividades es en algunos casos menor que la temperatura que resulta en el mayor rendimiento y concentración de ácido láctico, mientras que en otros la misma temperatura obtuvo los mismos resultados en todas las categorías. Por ejemplo, para el *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* la temperatura óptima fue reportada entre 37 y 44°C (Linko y Javanainen, 1996).

1.4.1.5 Densidad Celular: Las más altas densidades celulares (48-103 gr/L) han sido logradas con recirculación, pero en fermentaciones sin recirculación se han alcanzado concentraciones entre 60 y 77 g/L de

células. La fermentación de las LAB, por lo general está acompañada de un incremento en la masa celular, lo que constituye un subproducto indeseado si el objetivo del proceso es la producción de ácido láctico. Pero, al obtener altas concentraciones de microorganismos, estos pueden ser usados como las materias primas principales en la producción de probióticos (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

1.4.1.6 Isómeros del Ácido Láctico: La mayor parte de las LAB producen solo un isómero, pero en algunos casos una pequeña cantidad del otro isómero es producida. *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus plantarum* producen una mezcla racémica cuya composición varía. La enzima lactato deshidrogenasa es estereoespecífica, produciendo ácido láctico D ó L; la(s) forma(s) de la enzima presente en la bacteria determina cual isómero es producido. Para algunas aplicaciones, como la síntesis de ácido poliláctico, se desea un producto ópticamente puro o una mezcla racémica de composición constante. Para la producción de ácido láctico L(+), en algunas LAB como *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus rhamnosus* no se produce el isómero D(-) cuando el pH es variado, ni cuando se cambian las concentraciones de los nutrientes. Por otro lado, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, solo produce ácido láctico D(-) en cultivos batch y continuo a partir de glucosa y lactosa y cuando se modifican las concentraciones de los nutrientes. La composición de la mezcla racémica formada por *Lactobacillus plantarum* cambia con la aireación y la concentración de NaCl. Comparando los modos batch y continuo, la concentración del isómero predominante fue mayor en el primero, ya sea L(+) ó D(-). La concentración del isómero deseado también ha variado aumentando el pH y la concentración de sustrato, pero disminuye con la temperatura y cuando el pH no es controlado (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

1.4.1.7 Modo de Fermentación: El ácido láctico, por lo general, se produce en modo batch, pero existen numerosos ejemplos de cultivo continuo así como fed-batch y fermentaciones repetidas batch semicontinuas. Cuando se compara los modos de fermentación batch y continuo, el primero resulta en mayores concentraciones de ácido láctico y mejores rendimientos en la mayoría de estudios. Esto es debido a que todo el sustrato es usado en el modo batch. Por otro lado, el modo continuo resulta en mayores productividades, probablemente por que se trabaja a altas tasas de dilución, en donde la ventaja sobre el modo batch es pronunciada. En general los modos fed-batch, semicontinuo y modo batch repetido han obtenido rendimientos mayores que el modo batch (Ishiaki y Vonktaveesuk, 1996).

- Inmovilización y recirculación de células: Las células de LAB pueden ser recirculadas o inmovilizadas en soportes sólidos en diferentes modos para aumentar la densidad celular; pero esto no ha sido muy exitoso en términos de aumento del rendimiento del ácido láctico y productividad. Por otro lado la recirculación de células ha dado mayores concentraciones de ácido láctico y rendimientos iguales o mayores (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).
- Fermentaciones fed-batch: El proceso batch consiste en realizar una alimentación inicial con todos los nutrientes necesarios para el microorganismo dentro del reactor, para que este se reproduzca en forma exponencial hasta el momento en que se agote el sustrato, posteriormente la fermentación llega a fase estacionaria. En contraste, la metodología fed-batch consiste en suministrar los nutrientes al microorganismo durante el proceso fermentativo sin la eliminación del medio agotado, esta corriente de alimentación puede ser suministrada de forma continua, con flujos variables o constantes, o de forma discontinua en forma de pulsos (Soto, 2004).

1.4.2 Consideraciones del proceso.

Las mejores condiciones de fermentación no siempre son las más favorables para todo el proceso desde el punto de vista económico, porque el costo del sustrato y de los procesos de separación son proporcionalmente altos. El sustrato, por lo general, es un asunto de disponibilidad geográfica. Los desechos de agricultura y silvicultura, debido a su bajo precio, son preferibles a azúcares puros y costosos. Para sustratos lignocelulósicos una cepa que fermenta pentosas y hexosas como *Lactobacillus pentosus* es requerida para maximizar el rendimiento. El almidón puede ser hidrolizado y fermentado por algunas cepas de *Lactobacillus* productoras de amilasas, como *Lactobacillus amylovorus*, o, después de ser hidrolizado a glucosa, ser fermentado. Una cepa homofermentativa maximiza la productividad de ácido láctico producido.

Independientemente de la fuente de carbono, la fermentación batch ha sido superior a la fermentación continua en todos los aspectos, excepto en la productividad volumétrica. En modo continuo o en repetidos batch, se incrementa el rendimiento aun más. Si el sustrato es costoso el rendimiento debe ser maximizado (como en operación batch o semicontinua), mientras que la productividad volumétrica debe ser maximizada mediante operación continua si los costos de inversión son altos. Una alta productividad puede ser alcanzada reciclando las células, resultando en alta masa celular sin reducir el rendimiento (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

1.5 LOS PROCESOS DE SEPARACIÓN.

La síntesis química de ácido láctico siempre lleva a la mezcla racémica ópticamente inactiva, mientras que la selectividad puede ser alcanzada mediante fermentación usando el microorganismo apropiado. De cualquier

manera, el proceso biológico requiere el uso de un proceso de separación económico y eficiente para recuperar ácido láctico y aislarlo de varias impurezas en el caldo de fermentación.

Los carbohidratos son fermentados a ácido L-láctico por varios microorganismos, haciendo que el pH del caldo de fermentación disminuya afectando la productividad de los microorganismos. Se han realizado investigaciones para desarrollar cepas que puedan producir ácido láctico a bajos pH, pero no son todavía comercialmente viables. Se tienen dos procesos convencionales para mantener el pH del fermentador estable:

- El caldo de fermentación clarificado es concentrado al 32%, muy por encima del punto de cristalización y acidificado con ácido sulfúrico para obtener el ácido láctico crudo (Joglekar *et al.*, 2006).
- El carbonato de calcio es adicionado al caldo para mantener una concentración de ácido láctico baja para prevenir la inhibición de la bacteria. La solución de lactato de calcio caliente es después clarificada mediante filtración y lavada; subsecuentemente es cristalizada y convertida a ácido láctico agregando ácido sulfúrico, el cual se convierte en grandes cantidades de sulfato de calcio como subproducto (Jackman *et al.*, 2004). Este sulfato de calcio es eliminado mediante filtración. Una mayor purificación es alcanzada mediante tratamiento con carbón activado, resinas de intercambio iónico, extracción con solventes o esterificación, seguida por destilación e hidrólisis (Ohkouchi y Inoue, 2006).

1.5.1 Extracción reactiva.

El ácido láctico es poco extraíble con solventes orgánicos comunes debido a su naturaleza hidrofílica, por lo que la extracción reactiva ha sido considerada para su recuperación a partir de procesos convencionales.

La extracción reactiva usa la reacción entre el extractante y el material a ser extraído. El extractante en la fase orgánica reacciona con un material en fase acuosa y el complejo que reacciona es solubilizado en la fase orgánica. El ácido láctico es recuperado de la capa orgánica mediante una desorción. El prerrequisito de una recuperación económica mediante distribución es un alto coeficiente de distribución (K_d) (Joglekar *et al.*, 2006.).

1.5.2 Adsorción.

La recuperación de ácidos carboxílicos de caldos de fermentación presenta un problema de separación desafiante debido a la compleja naturaleza de estos. Métodos de recuperación que utilizan agentes de separación, como adsorbentes sólidos que son selectivos para ácidos carboxílicos, son atractivos. Características importantes de los extractantes y de los adsorbentes sólidos son una alta capacidad, una alta selectividad para el ácido sin serlo para el agua ni el sustrato, regenerabilidad y, dependiendo del proceso, configuración y biocompatibilidad con los microorganismos (Joglekar *et al.*, 2006).

1.5.3 Electrodialisis.

La fermentación con electrodialisis es promisorio porque puede remover ácido láctico continuamente y mantener el pH del medio. La mayor parte

de la literatura muestra la producción de ácido láctico a sales de lactato en dos pasos: electrodiálisis convencional y purificación con electrodiálisis bipolar para la conversión de las sales de lactato en ácido láctico con la recuperación del compuesto alcalino (Joglekar *et al.*, 2006).

1.5.4 Esterificación y destilación reactiva.

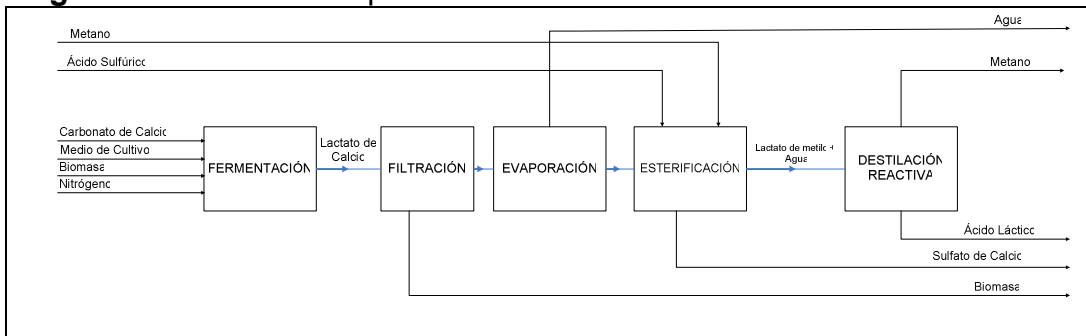
La esterificación es el único proceso de separación que separa el ácido láctico de otros ácidos orgánicos. El ácido láctico de alta pureza puede ser preparado mediante la formación de un éster al reaccionar el ácido láctico con alcohol. Posteriormente, la purificación del éster se da por destilación o extracción y luego se realiza su conversión en ácido láctico.

La destilación simultánea con esterificación-hidrólisis es llamada destilación reactiva. El caldo fermentado con ácido láctico necesita ser pretratado para remover algunas impurezas antes de la destilación reactiva, para lo cual se usan camas de resinas que sirven como catalizador y como relleno para la columna de destilación (Joglekar *et al.*, 2006).

1.5.5 Proceso de separación del ácido láctico.

En la figura 6 se muestra el proceso de separación de ácido láctico cuando el pH de la fermentación es controlado con carbonato de calcio.

Figura 6. Proceso de separación del ácido láctico.



En la fermentación se produce el ácido láctico y ya que el pH de esta es controlado con carbonato de calcio estos reaccionan para generar lactato de calcio. Posteriormente, se realiza una filtración con el fin de eliminar la biomasa y una evaporación para separar el exceso de agua y así disminuir el tamaño de los equipos posteriores.

Después de la evaporación se realiza una esterificación en donde el lactato de calcio reacciona con ácido sulfúrico en presencia de metanol para generar lactato de metilo y sulfato de calcio (el cual es un subproducto).

El lactato de metilo generado junto con el agua que esta presente en el proceso desde el comienzo van a una destilación reactiva donde estos dos compuestos reaccionan para regenerar y separar el metanol y el ácido láctico.

1.6 EL MERCADO DEL ÁCIDO LÁCTICO

1.6.1 Precios y costos.

El ácido láctico tiene un precio comercial que varia entre 1.38 US\$/kg (para 50% de pureza) y 1.54 US\$/kg (para 88% de pureza) (Wee *et al.*, 2006). La producción sintética de este tiene un costo entre 1.30 y 1.40

US\$/kg. (Zacchi y Akerberg, 2000); pero para ser competitivo el costo del monómero debe ser menor a 0.8 US\$/kg, (Datta *et al.*, 1995). En todo caso, todavía hay varios tópicos que deben ser estudiados para producir ácido láctico por medios biotecnológicos en el rango de costos señalado, como el desarrollo de microorganismos de alto desempeño en la producción de ácido láctico, la disminución de los costos de las materias primas y los procesos fermentativos. Los procesos biotecnológicos para la producción de ácido láctico a partir de materias primas de bajo costo deben ser mejorados para hacerlos competitivos con los procesos químicos (Wee *et al.*, 2006).

1.6.2 Producción y cuantificación de la oferta existente.

Se estima que la demanda actual del ácido láctico en el mundo está entre 130,000 a 150,000 toneladas métricas por año (Wee *et al.*, 2006). Este compuesto posee un uso potencial como insumo para aplicaciones de gran volumen, con ventas proyectadas que exceden los US \$ 3 billones anuales sólo en Estados Unidos (72 millones de libras), (Wisconsin Biorefining Development Initiative, 2006).

Para resumir cabe decir que el mercado mundial para sustitución de solventes sería de US\$ 4.5 billones/año, el de polímeros biodegradables US\$ 0.9 billones/año y el de químicos oxigenados US\$ 5.4 billones/año (Bolaños *et al.*, 2000.).

1.6.3 Crecimiento esperado y factores que inciden.

Actualmente, a nivel mundial, algunos observadores estiman que la producción de ácido láctico tiene un incremento de 12-15% anual (Joglekar *et al.*, 2006) y se tiene proyectado un aumento de la demanda

de ácido láctico de un 45.5% anual para el uso en polímeros biodegradables (Jarvis, 2001).

Los productores de ácido láctico están esperando aumentar sus ganancias con el potencial del producto como monómero del ácido poliláctico. La industria espera que haya suficiente capacidad de ácido láctico para mantener la demanda de polímeros biodegradables y solventes. El mercado por el ácido poliláctico crece, además, con los requerimientos de los consumidores de productos “verdes”; igual ocurre con los solventes y agentes de limpieza biodegradables, en donde el consumo de lactatos crece debido a su biodegradabilidad. El etil lactato es el producto primario, y es usado como agente de limpieza en las industrias de la microelectrónica, metalmecánica y de impresión (Jarvis, 2001).

1.6.4 Proyección de la demanda.

Actualmente, todo el ácido láctico consumido en Colombia es de origen extranjero, el cual se encuentra distribuido según se muestra en la tabla 2.

Proyectando las tendencias mostradas hasta el 2010, se esperarían volúmenes de 297.3, 320.6, 343.9 y 367.2 Ton para los años 2007, 2008, 2009 y 2010, respectivamente, considerando incrementos acordes con el comportamiento de la tendencia en los últimos años.

Tabla 2. Estadísticas de las Importaciones de Colombia por Países para el ácido láctico (Comunidad Andina de Naciones, 2007).

	Volumen en Toneladas				
	2000	2001	2002	2003	2004
MUNDO	140	159	170	198	237
Alemania	1	0	0	0	4
Bélgica	9	28	25	76	109
Brasil	114	115	107	104	135
China	13	5	27	1	20
España	0	3	2	4	1
Estados Unidos	0	0	4	0	5
Italia	0	0	0	0	4
Japón	0	0	0	0	1
México	0	0	1	6	32
Países Bajos	3	7	5	7	74
Perú	0	0	0	0	9

1.7 SIMULACIÓN DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

En la actualidad, se han venido implementando la utilización de herramientas computacionales para realizar simulaciones de bioprocesos con el fin de optimizarlos. Par esto se cuenta con herramientas tales como Superpro designer, Excel, Matlab o ASPEN, en donde es posible la manipulación de distintos tipos de datos y utilización de ambientes gráficos que representan los comportamientos descritos por los modelos. La simulación puede ser usada como una importante herramienta para el desarrollo de bioprocesos, jugando un importante rol para lograr un diseño óptimo de ellos, mientras acelera el desarrollo de los proceso para la industria bioquímica.

Las ventajas de la simulación para el desarrollo y escalamiento de bioprocesos han sido conocidas por largo tiempo. Los simuladores de procesos ofrecen la oportunidad de reducir el tiempo requerido para el desarrollo de estos. Ellos permiten la comparación de alternativas de

proceso para que un gran número de ideas puedan ser sintetizadas y analizadas interactivamente en poco tiempo (Zhou *et al.*, 1997).

1.7.1 Modelo de simulación.

Un modelo es aquel que describe las relaciones entre las principales variables de estado y explica cuantitativamente el comportamiento de un sistema. El modelo puede proveer sugerencias para el análisis, diseño y operación de un fermentador. Los modelos de fermentación normalmente son divididos en dos clases: en modelos estructurados en donde las rutas metabólicas intracelulares son consideradas y modelos no estructurados, en donde la biomasa es descrita por una variable. Los modelos estructurados parecen ser complicados para el uso regular, mientras que los modelos no estructurados son mucho más fáciles de usar y han demostrado que tienen la capacidad de describir adecuadamente muchas fermentaciones (Liu *et al.*, 2003).

A continuación se muestran algunos modelos que describen las cinéticas de crecimiento microbiano, producción de ácido láctico y consumo de glucosa (Islam *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003):

1.7.1.1 Crecimiento microbiano (X): Los modelos no estructurados más ampliamente usados para describir el crecimiento celular son el modelo cinético de Monod, la ecuación logística y el modelo de Haldane. La ecuación logística es un modelo independiente del sustrato que puede describir la inhibición de crecimiento de la biomasa que se presenta en muchas fermentaciones batch. El modelo logístico se describe en la ecuación 1.

Ecuación 1. Modo diferencial del modelo de crecimiento logístico (Liu *et al.*, 2003).

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

La forma integrada de la Ecuación1 usando $X=X_0$ ($t=0$) (ecuación 2) da una variación de X como función de t, el cual puede representar tanto la fase exponencial como la fase estacionaria.

Ecuación 2. Forma integrada de la ecuación de crecimiento logístico (Liu *et al.*, 2003).

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

Donde X_m representa la concentración de biomasa (g/L) máxima obtenida durante la fermentación, X_0 la concentración inicial de biomasa (g/ L), y μ_m la velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1}).

1.7.1.2 Formación de producto (P): La cinética de la formación de ácido láctico se basó en las ecuaciones de Luedeking-Piret. Este modelo fue originalmente desarrollado para la formación de ácido láctico por *Lactobacillus delbrucckii* (Gong y Lun, 1996). De acuerdo con este modelo, la velocidad de formación de producto depende de la concentración de biomasa y de la velocidad de crecimiento dX/dt , de manera linear (ecuación 3).

Ecuación 3. Modo diferencial de la ecuación de Luedeking-Piret (Liu *et al.*, 2003).

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

Donde α (g/g) y β (g/g.h) representan la constantes de producción de ácido láctico asociada y no asociada al crecimiento respectivamente.

1.7.1.3 Consumo de glucosa (S): Una fuente de consumo de carbono como la glucosa es usada para formación de biomasa, de productos resultantes del metabolismo celular y para el mantenimiento de las células. La Ecuación 4 muestra como se relacionan:

Ecuación 4. Ecuación de consumo de glucosa (Islam *et al.*, 2003).

$$S = S_0 - \frac{X_0}{\mu} \left[\left(\frac{\mu_m}{Y_{xs}} + m_s \right) + \frac{\mu + \beta}{Y_{xs}} \right] (e^{\mu^* t} - 1)$$

Donde S_0 representa la concentración inicial de sustrato (g/L), Y_{xs} el rendimiento real de sustrato en biomasa (g/g), m_s el coeficiente de mantenimiento (g/g.h) y μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

2 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 LOCALIZACIÓN.

Los análisis y pruebas correspondientes a este trabajo, se realizaron en los laboratorios de Biotecnología y Análisis Instrumental de la Universidad EAFIT, en la ciudad de Medellín.

2.2 MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo usado fue el MRS, el cual es un medio creado por DeMan, Rogosa y Sharpe (1960) para el enriquecimiento, cultivo y aislamiento de las diferentes especies de *Lactobacillus*. Las concentraciones de los nutrientes en el medio (Tabla 3) fueron las reportadas por Guoqiang *et al.* (1991), cambiando la concentración de glucosa. Las soluciones de sales y la glucosa fueron autoclavadas por separado a 15 psi y 120°C durante 20 minutos.

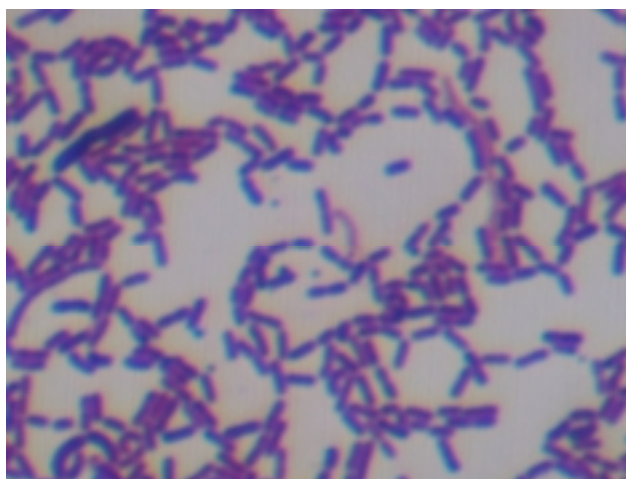
2.3 MICROORGANISMO UTILIZADO.

Se utilizó el microorganismo, *Lactobacillus casei* ATCC 7469 (Figura 7) obtenido en la American Type Culture Collection (ATCC).

Tabla 3. Composición del medio de cultivo MRS (Guokiang *et al.*, 1991).

Compuesto	Composición (g/L)
Glucosa	100
Extracto de levadura	10
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
Citrato de sodio	1.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.005
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0031
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002
Acido ascórbico	0.005
Agar Agar	13.0

Figura 7. *Lactobacillus casei* ATCC 7469



Inicialmente el microorganismo se encontraba liofilizado por lo que fue activado de la siguiente forma:

- Una asada del liofílico (Figura 8) se agregó a 20 mL de medio MRS líquido (Tabla 3) y se ubicó en un shaker a 37°C y 90 rpm, durante dos días.
- El caldo de cultivo resultante fue el inóculo para sembrar una caja petri, la

cual a su vez sirvió para almacenar la cepa en el sistema de perlas Criobank (

- Figura 9), para lo cual:

- o De una caja petri de cultivo fresco se retiró toda la biomasa con un asa estéril y se disolvió en el medio que el sistema de perlas contiene.
- o Se agitó hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el vial. Esto permitió que las bacterias se adhirieran a las perlas.
- o Con una pipeta estéril, se removió el medio de cultivo de Cryobank y se almacenaron las perlas a 4°C.

- Para generar las cepas de trabajo se tomó una perla del vial con un asa de siembra y se extendió sobre la superficie de una caja petri con agar MRS.

- Las cajas petri se incubaron a 37°C durante dos días y posteriormente se almacenaron a 4°C.

Figura 8. Liófilo.

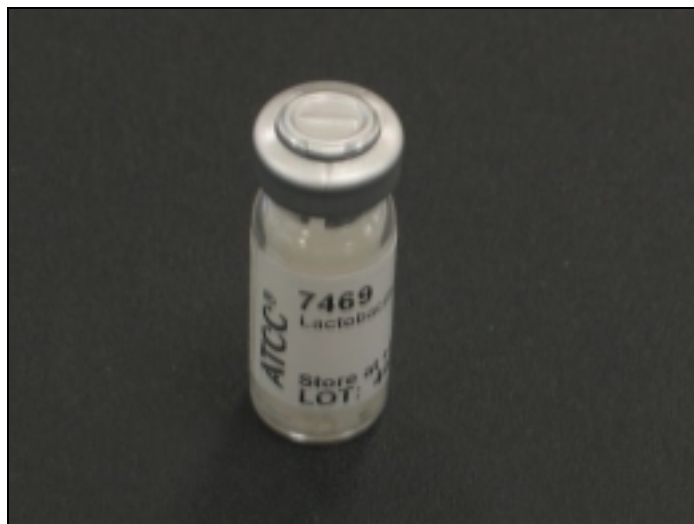
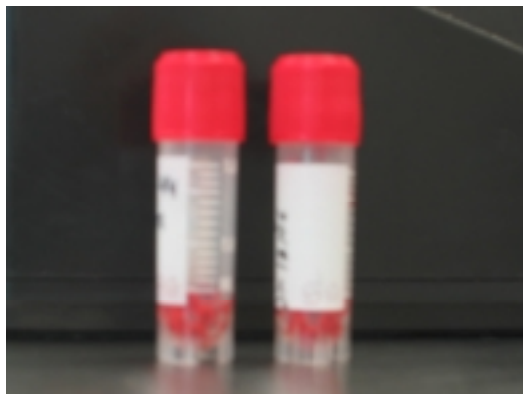


Figura 9. Sistema de perlas Cryobank.



2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Las muestras para realizar las curvas de crecimiento, generación de producto y consumo de sustrato fueron tomadas por duplicado a tiempos dados desde el tiempo cero que corresponde a la inoculación, hasta que termina cada fermentación. Luego, las muestras fueron analizadas para determinar la concentración celular por peso seco, el consumo de sustrato por DNS (Miller, 1959) y la concentración de ácido láctico por cromatografía líquida de alta resolución, HPLC.

Las fermentaciones, los análisis y la toma de muestras fueron llevadas a cabo por duplicado y los valores aquí presentados son el promedio de las mediciones con su respectivo error estándar.

2.4.1 MEDICIÓN DE BIOMASA

La medición de biomasa de *L. casei* se realizó por el método de peso seco. Para ello se tomó de manera estéril 1 mL de muestra, luego se centrifugó a 14000 rpm a 4°C,

durante 60 minutos para eliminar el sobrenadante. Al pellet resultante se le agregó 1 mL de ácido clorhídrico 1 M para que el carbonato de calcio presente reaccionara y se centrifugó a las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el eppendorf fue secado a 50°C durante 24 h para luego ser pesado. El cálculo de la concentración de biomasa en g/L se computó de acuerdo a la ecuación 5:

Ecuación 5. Concentración (g/L) de biomasa

$$Biomasa = \frac{(Peso_Final_Eppendorf - Peso_Inicial_Eppendorf)}{0,001L} * 100\%$$

2.4.2 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

La cinética de consumo de sustrato se determinó por el método de Ácido Dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), que permite cuantificar la presencia de azúcares reductores (Anexo 1). Para llevar a cabo la cuantificación se realizó una dilución del sobrenadante obtenido después de la centrifugación de 1:165.7.

2.4.3 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

La concentración de ácido láctico y del lactato de calcio presente en el cultivo debido a la reacción del ácido con el carbonato de calcio, fue determinada por medio de cromatografía líquida (HPLC). El equipo usado fue un HPLC Agilent Technologies serie LC 1200 Series Quaternary a temperatura ambiente, en una columna C18, con ácido sulfúrico 0.01 M como fase móvil y con un flujo de 0.7 mL/min, se usó un detector de absorción ultravioleta a 210 nm, con un volumen de inyección de 10 µl.

Como preparación de las muestras se siguieron los protocolos encontrados en

Sánchez y Ramírez (2004) y Wang *et al.* (2007).

A cada muestra primero se le eliminó la biomasa por medio de la centrifugación de 2 mL, a 14000 rpm, por 60 minutos, a 4°C; después, para desproteinizar la muestra se tomaron 1.5 mL de esta y se le agregó 0.1 mL de H₃PO₄ 0.1 N, luego se centrifugó durante 60 minutos, a 12000 rpm, a 4°C y se tomó el sobrenadante.

Posteriormente, se calentó el sobrenadante durante 10 minutos a 30°C en baño María para despolimerizar al ácido y se filtró por acetato de celulosa con un diámetro de puro de 0.3 µm. En este punto las muestras estaban listas para ser llevadas al cromatógrafo y realizar las mediciones.

Para cada muestra, se leyó en el cromatograma el área del pico correspondiente tanto al ácido como al lactato presente, los cuales aparecen a 6 y 3.1 minutos respectivamente y se obtiene la concentración a partir de las curvas de calibración (Anexo 2 y 3), teniendo en cuenta los factores de dilución usados.

2.5 FERMENTACIONES

2.5.1 Evaluación de la concentración de carbonato de calcio.

Las fermentaciones fueron realizadas en el agitador lineal con control de temperatura (Figura 10) a 37°C y a una velocidad de 90 rpm. Estas fueron llevadas a cabo por duplicado en erlenmeyers de 500 mL con 300 mL de medio MRS. Los erlenmeyers fueron cubiertos con algodón, aluminio y vinipel, para crear condiciones parcialmente anaerobias.

Figura 10.Agitador lineal con control de temperatura.



La inoculación fue realizada con 3 asadas del microorganismo, provenientes de cajas petri preparadas a partir del sistema de perlas Criobank.

Para la toma de muestras, los erlenmeyers fueron llevados a la cámara de flujo laminar y allí se les retiró la cubierta y se tomó de manera estéril 1 mL de muestra por duplicado. Los erlenmeyers fueron nuevamente tapados y llevados al agitador.

Las concentraciones de carbonato de calcio evaluadas fueron 15, 37.5 y 60 g/L.

2.5.2 Sistema batch en biorreactor.

Primero se realizó un preinóculo a partir de tres asadas de las cajas petri en erlenmeyers de 50 mL con 20 mL de medio de cultivo MRS. Después de 2 días de cultivo a 37°C y 90 rpm en el agitador lineal con control de temperatura, el contenido fue pasado, en condiciones estériles, a erlenmeyers de 500 mL con 180 mL de medio

de cultivo MRS. El proceso se llevó a cabo a 37°C, 90 rpm, por 48 horas para ser usado después como inóculo con una OD de $1.9 \pm 0,5$ en el biorreactor.

El equipo utilizado fue un biorreactor BIOENGINEERING CH 8636 (Figura 11) con un volumen total de 3 L, cuatro baffles y 2 agitadores de seis hojas planas tipo Rushton.

Figura 11. Biorreactor BIOENGINEERING CH 8636



2.5.3 Sistema Fed-batch.

En las fermentaciones batch se realizó el mismo procedimiento descrito para las fermentaciones batch, en el cual fue preparado el preinóculo y el inóculo, adicionalmente, se prepararon las soluciones para la alimentación del biorreactor.

La estrategia de alimentación fed-batch se dividió en tres etapas: primero se operó el biorreactor en modo batch con 2 L de medio de cultivo hasta finalizar la fase exponencial, posteriormente, comenzó la alimentación fed-batch hasta que fue agregado 1 litro de solución de glucosa y por último se operó nuevamente el biorreactor en modo batch durante las últimas 24 horas del proceso

Los procesos fed-batch realizados fueron los siguientes:

- Fed-batch 1: flujo 74 mL/h, concentración de glucosa de 850 g/L.
- Fed-batch 2, flujo 43mL/h, una concentración de glucosa de 100 g/L.
- Fed-batch 3 flujo 14 mL/h y concentración de glucosa de 100 g/L.

Todos los procesos fed-batch operaron con una agitación de 90 rpm, una temperatura de 37° C y una concentración inicial de CaCO₃ de 15 g/L.

2.5.3.1 Cálculo de los parámetros productivos en las fermentaciones.

- **Rendimiento observado de sustrato en producto (Y'_{ps}).**

El cálculo del rendimiento de sustrato en producto se define como los gramos de ácido láctico producidos sobre los gramos de glucosa consumida, por esto el cálculo de este parámetro está definido por la ecuación 6:

Ecuación 6. Rendimiento observado de sustrato en producto (g/g).

$$Y'_{ps} = \frac{\text{Gramos de Ácido Láctico Producidos}}{\text{Gramos de Glucosa Consumida}}$$

El rendimiento teórico de sustrato en producto está definido como los gramos de ácido láctico producidos sobre los gramos de glucosa consumida para la producción

de este ácido, por lo tanto, ya que esta es solo una fracción de la glucosa total consumida, el rendimiento teórico es mayor que el rendimiento observado.

- **Productividad Volumétrica (Q).**

La productividad volumétrica está definida como los gramos de ácido láctico producidos por unidad de volumen, en un tiempo dado (ecuación 7)

Ecuación 7. Productividad volumétrica (gr/L.h)

$$Q = \frac{\text{Gramos de Ácido Láctico Producidos}}{\text{Tiempo de Fermentación} * \text{Volumen}}$$

- **Rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{xs})**

El rendimiento observado de sustrato en biomasa esta definido como los gramos de biomasa obtenida sobre los gramos de glucosa consumida y se calcula con la ecuación 8:

Ecuación 8. Rendimiento observado de sustrato en biomasa (g/g).

$$Y'_{xs} = \frac{\text{Gramos de Biomasa Obtenida}}{\text{Gramos de Glucosa Consumida}}$$

2.6 SIMULACIÓN.

Para la implementación del modelo de simulación, fueron escogidas las ecuaciones que describen el proceso de fermentación, propuestas por Liu, *et al.* (2003) para la producción de biomasa y de ácido láctico e Islam *et al.* (2003) para el consumo de sustrato. En ellas se presentan los modelos que representan a estos parámetros en el tiempo; siendo estas las Ecuación 2, 3 y 4. Ellas fueron usadas para simular los

resultados experimentales, mediante el uso de EXCEL, los valores de los parámetros cinéticos fueron encontrados con el software Polymath 6.0.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron diferentes análisis estadísticos según la etapa del proceso en el software Statgraphics 5.0. El primero fue llevado a cabo para las fermentaciones realizadas en el agitador lineal, en donde se evaluaron diferentes concentraciones de carbonato de calcio.

A estas fermentaciones se les realizó un análisis de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para ello se evaluaron las diferencias que existían entre las diferentes concentraciones de carbonato y los diferentes parámetros productivos (concentración de ácido láctico, Yps, Q).

Posteriormente se realizó un análisis estadístico para comparar las diferencias existentes entre todas las fermentaciones realizadas en el biorreactor. También consistió en un análisis de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Además, se llevó a cabo un análisis de rangos múltiples para determinar que grupos eran homogéneos y así identificar cuales medias eran significativamente diferentes de las otras.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO

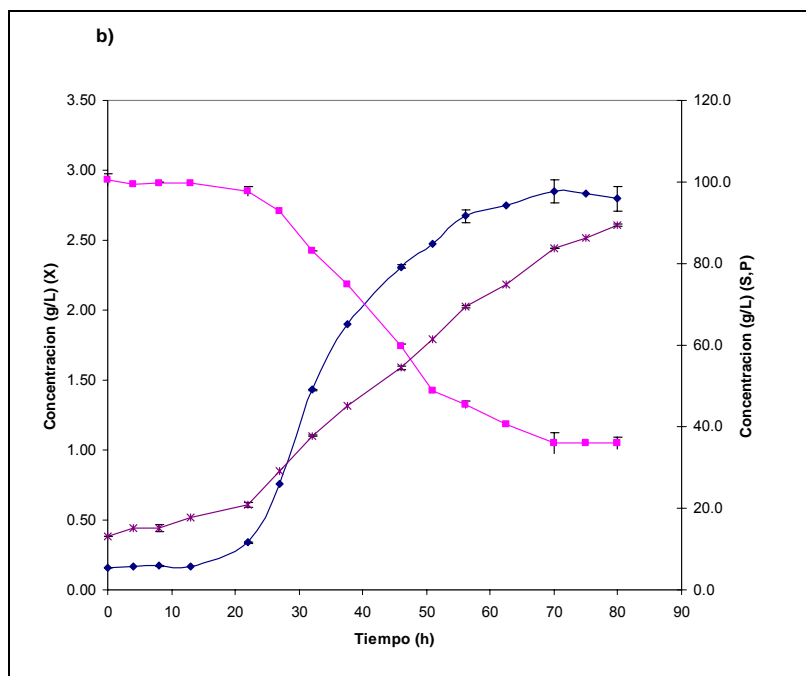
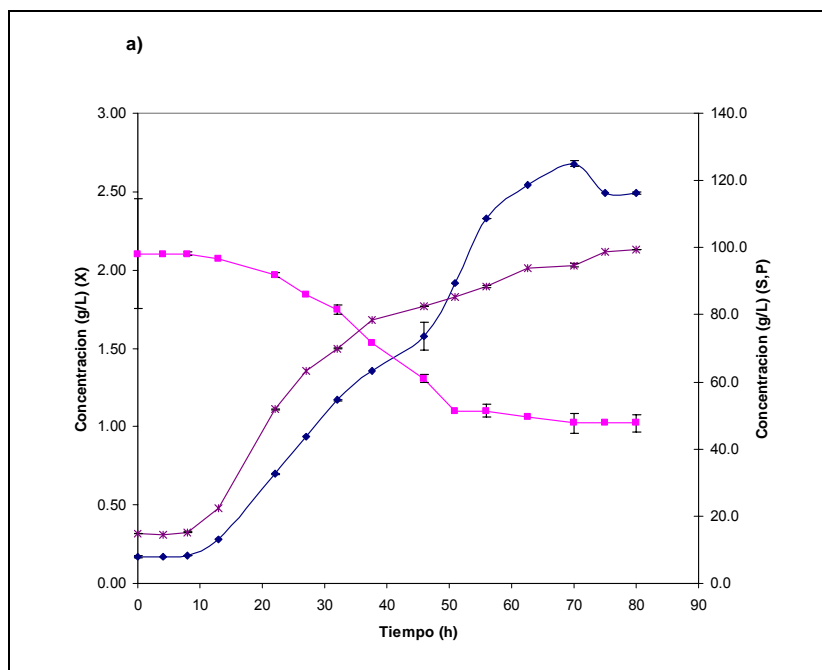
El carbonato de calcio es un agente regulador de pH, el cual reacciona con el ácido láctico formando lactato de calcio. Por ello, es importante determinar la concentración de este compuesto que permita altas productividades y buenos rendimientos. En este estudio, se evaluaron diferentes concentraciones de este compuesto en un sistema de fermentación batch (15, 37.5 y 60 g/L)

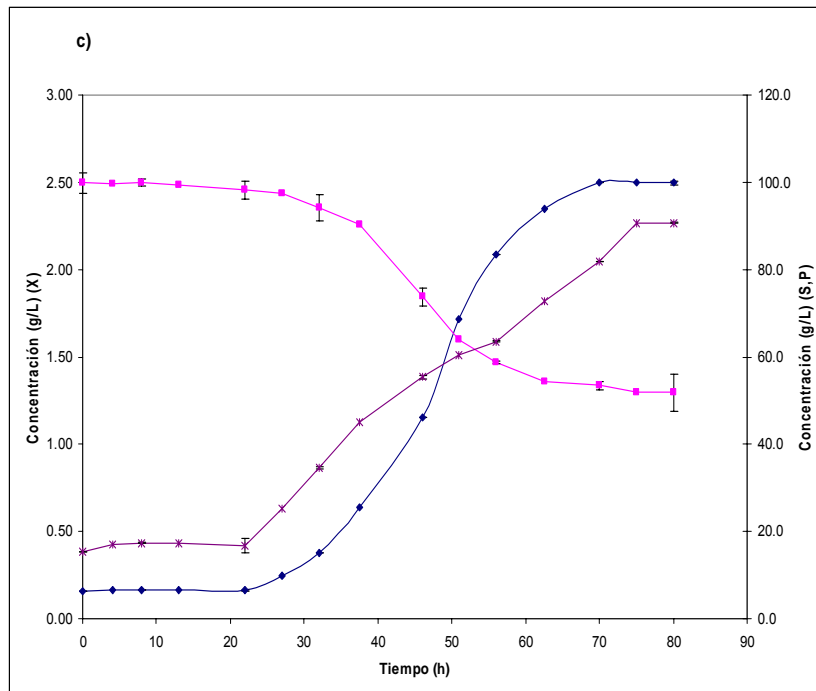
Se observó un comportamiento muy similar en todas las concentraciones evaluadas, en la Figura 12 se puede observar su comportamiento.

En la figura 12a se observa que durante el crecimiento de *L. casei* se hallaron diferentes fases de crecimiento. La fase lag correspondió a un período de 8 horas, donde el microorganismo se adaptó a las condiciones físico químicas del proceso. Posteriormente, ocurrió la fase exponencial con una duración de 54,5 h, en donde aumentó considerablemente la concentración del microorganismo, para luego entrar en la etapa de fase estacionaria y muerte celular evidenciada por la disminución en la concentración de biomasa de 2.68 a 2.49 g/L.

La disminución en la concentración de glucosa está relacionada con el aumento en la concentración de biomasa y la mayor velocidad en el consumo de este se da durante la fase exponencial de crecimiento, llegando a un valor final de 47.7 gr/L de glucosa.

Figura 12. Cinética de las fermentaciones variando la concentración de carbonato de calcio. a) 15 g/L, b) 37.5, c) 60 g/L. Biomasa (—◆—) , Glucosa (—■—) , Ácido láctico (—*—).





Finalmente, se puede ver cómo la producción de ácido láctico comenzó al igual que el crecimiento celular a las 8 horas y al finalizar el crecimiento exponencial se alcanzó el 95% (94.7 g/L) del ácido total que se produjo en la fermentación completa. Al final de la fermentación, se encontraron 99.3 g/L de ácido láctico, habiéndose generado aun una pequeña fracción de este (5%) durante la fase estacionaria. Por ello, bajo las condiciones evaluadas, este metabolito está relacionado parcialmente con el crecimiento celular, ya que se produjo principalmente en la fase exponencial, pero también, aunque en menor proporción, en la fase estacionaria tal como fue reportado por Islam *et al.*, (2003).

Para cada fermentación se evaluaron los siguientes parámetros a las 80 horas: concentración final de ácido láctico (AL), rendimiento observado de sustrato en producto (Y'_{ps}), productividad volumétrica de ácido láctico (Q) y rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{xs}) (Tabla 4). Los datos reportados son el

promedio de sus duplicados.

Las figuras 12b y 12c tienen el mismo comportamiento que la figura 12a, pero al aumentar la concentración de carbonato de calcio aumentó la fase lag de estas, esto pudo ser debido a que el inóculo de estas fue obtenido directamente de cajas petri y en estas el medio de cultivo no contenía carbonato de calcio. Por esto, para estas fermentaciones el carbonato consistió en un agente nuevo en el medio y al aumentar la concentración de este también aumentó el tiempo de adaptación de la bacteria al medio de cultivo.

Tabla 4. Parámetros productivos bajo diferentes concentraciones de carbonato de calcio.

Parámetro	Carbonato de calcio		
	15 g/L	37.5 g/L	60 g/L
AL (g/L)	99.1	94.9	92.4
Y'_{ps} (g/g)	2.38	1.70	1.72
Q (g/L.h)	1.24	1.19	1.23
Y'_{xs} (g/g)	0.056	0.061	0.053

A estas fermentaciones se les realizó un análisis de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para ello se evaluaron las diferencias que existían entre las concentraciones de carbonato y los parámetros productivos (concentración de ácido láctico, Y_{ps} , Q). No se hallaron diferencias significativas entre estas variables dependientes y la concentración de CaCO_3 ($P > 0,05$) (Anexo 5) concluyendo así que la producción de este ácido no se ve afectada por la concentración de esta sal bajo las condiciones evaluadas en este proyecto.

El carbonato de calcio es un agente inerte para la bacteria ya que esta no lo puede consumir y a las concentraciones trabajadas tampoco es nocivo para ella. La única función de este compuesto en el medio de cultivo es reaccionar con el ácido láctico

producido, posiblemente por esto es que su concentración en el medio no afectó de manera significativa a los parámetros productivos.

Los resultados obtenidos son mejores a los de Vázquez *et al.* (2003) en donde con una concentración de 100 g/L de carbonato de calcio se obtuvo 58,9 g/L de ácido láctico con *L. coryniformis* en erlenmeyers de 250 mL y 100 mL de medio de cultivo.

Las concentraciones obtenidas también son más altas que aquellas logradas por Elibol *et al.* (2004) quienes estudian diferentes fuentes de carbono para la producción de ácido láctico con *Rhizopus oryzae*, logrando una concentración máxima de 60 g/L del ácido en erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo y 50 g/L de carbonato de calcio.

En Patel *et al.* (2007) trabajando con *Lactobacillus sp.* KCP01 se obtuvo un aumento de 23,48 g/L a 45,59 g/L en la concentración final de ácido láctico al pasar de realizar las fermentaciones sin control de pH, a llevarlas a cabo con 20 g/L de carbonato de calcio. Esto evidencia que un control adecuado del pH puede aumentar significativamente la producción de ácido láctico.

Por esto, y para disminuir el gasto de reactivos, se decidió trabajar con la menor concentración de carbonato de calcio, correspondiente a 15 g/L de la misma manera como lo realizaron Tan y Ding (2006).

3.2 PROCESO FERMENTATIVO EN MODO BATCH EN BIORREACTOR.

El proceso de fermentación a nivel de agitador lineal se llevó a un biorreactor de 3 L, con el fin de evaluar la producción de ácido láctico a una escala mayor y posteriormente, comparar el proceso batch con uno fed-batch. La cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto se describe

en la Figura 13.

Figura 13. Cinética de Fermentación en biorreactor en modo batch.

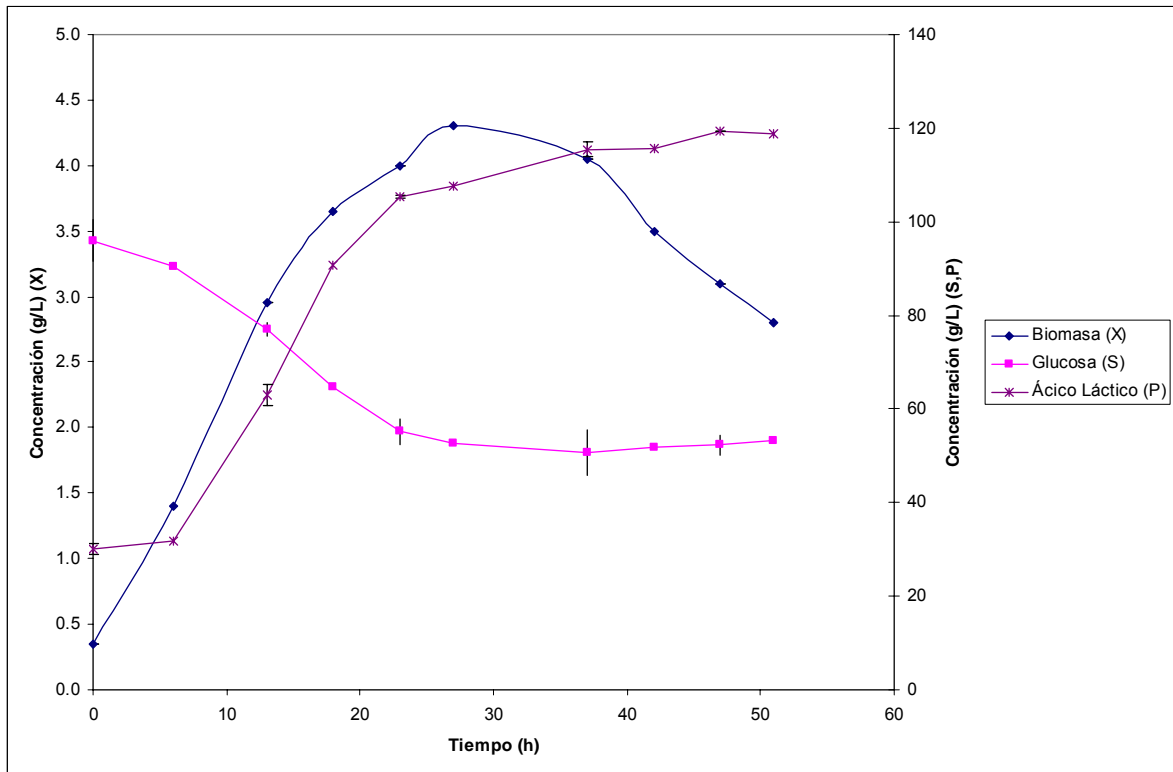


Tabla 5. Parámetros productivos de ácido láctico en un biorreactor en modo batch.

AL (g/L)	122.6
Y'_{ps} (g/g)	2.71
Q (g/L.h)	2.4
Y'_{xs} (g/g)	0.058

La fase de adaptación de crecimiento encontrada a nivel de los agitadores orbitales, desapareció en el biorreactor, probablemente debido a mejores condiciones de fermentación. Ellas pueden ser una mejor agitación, un mejor control sobre la

temperatura del proceso y la posibilidad de garantizar anaerobiosis desde el comienzo de la fermentación, lo cual no se podía garantizar en el montaje realizado en el agitador. El efecto inmediato se evidencia por el aumento inmediato de la concentración de biomasa observado en la Figura 13. La fase exponencial se extiende entonces desde el tiempo cero hasta las 27 horas, terminando esta fase 37.5 horas antes que en la fermentación en frascos agitados (70 horas), debido a las condiciones de fermentación explicadas anteriormente.

La corta fase estacionaria y la acelerada muerte celular se deben a la acelerada tasa de consumo de glucosa, alcanzando límites inhibitorios muy rápidamente, ya que la bacteria deja de consumir sustrato casi completamente desde las 27 horas.

La concentración de glucosa disminuyó desde 98.2 g/L hasta 52.7 g/L, valor alcanzado a las 27 horas, momento en el que se alcanzó el final del crecimiento exponencial de las células.

Finalmente, la concentración de ácido láctico que comenzó en 30 g/L (producidos en los inóculos) aumentó hasta un valor de 118.9 g/L, produciéndose la mayor cantidad de este metabolito (90.6%) durante las primeras 27 horas de la fermentación en la fase exponencial, de manera similar a lo que ocurrió en el agitador lineal. La proporción de ácido láctico producido durante la fase estacionaria y de muerte celular se incrementó respecto al montaje anterior, aumentando de 5 a 9,4%. Este resultado muestra una vez más cómo el ácido láctico, en las condiciones de proceso evaluadas, se comportó como un metabolito parcialmente relacionado con el crecimiento celular. Esto se concluye ya que la fase de crecimiento exponencial terminó a las 27 horas, y es durante este tiempo que se dio la mayor producción de ácido láctico; por lo cual en las próximas fermentaciones en modo fed-batch, la alimentación de sustrato comenzó en este tiempo.

El rendimiento observado de sustrato en biomasa fue muy bajo (0.058 g/g)

comparado con el de sustrato en producto (2.71 g/g). Esto muestra cómo las condiciones que se están trabajando son las apropiadas para favorecer la producción de ácido láctico sobre el crecimiento de biomasa. Esto se debe a que los rendimientos de sustrato en biomasa siempre son mucho menores en fermentaciones anaerobias, ya que se favorece la producción de otros metabolitos sobre la biomasa (Hagerdal y Hofvendahl, 2000).

La concentración final de ácido láctico, el rendimiento observado de sustrato en producto y la productividad volumétrica obtenidos en modo batch en el biorreactor, fueron un 28.4%, 42.63% y 96.8% respectivamente, superiores a aquellas logradas en el agitador, indicando que en el primero, se dan mejores condiciones tales como la anaerobiosis y un mejor control en la agitación y temperatura que favorecen la producción de ácido láctico.

En los trabajos consultados en la siguiente comparación de resultados los estudios fueron realizados con *Lactobacillus casei* ATCC 7469:

La producción de ácido láctico obtenida en el modo batch (118.9 g/L) es mayor a la obtenida por Schugerl *et al.* (1993), los cuales lograron una concentración de ácido láctico de 26.8 g/L trabajando en un reactor de 3 L y una concentración inicial de glucosa de 30 g/L.

En el trabajo realizado por Guoqiang *et al.* (1991), lograron concentraciones de ácido láctico de 68 g/L en erlenmeyers de 100 mL y una concentración inicial de glucosa de 140 g/L.

En este estudio se presentó una mayor producción de ácido láctico a la encontrada por Petrov *et al.* (2007), los cuales obtuvieron una concentración de 10g/L de ácido láctico con células inmovilizadas y 30 g/L de lactosa.

La concentración de ácido láctico obtenida en este estudio es comparable con la producida por Vaccari *et al.* (1993) los cuales con una concentración inicial de glucosa de 119.6 g/L obtuvieron una producción de ácido láctico de 99.9 g/L en un reactor de 3 L.

El rendimiento de 2.71 g/g es más alto que los reportados en la literatura, como en los estudios de Schugerl *et al.* (1993) los cuales encontraron un rendimiento de 0.93 g/g y en Guoqiang *et al.* (1991) que fue de 1.1 g/g.

Por otra parte la productividad volumétrica lograda (2,4 g/L.h) tiene un valor cercano al reportado por Guoqiang *et al.* (1991) el cual fue de 2.6 g/L.h.

3.3 FERMENTACIONES FED-BATCH

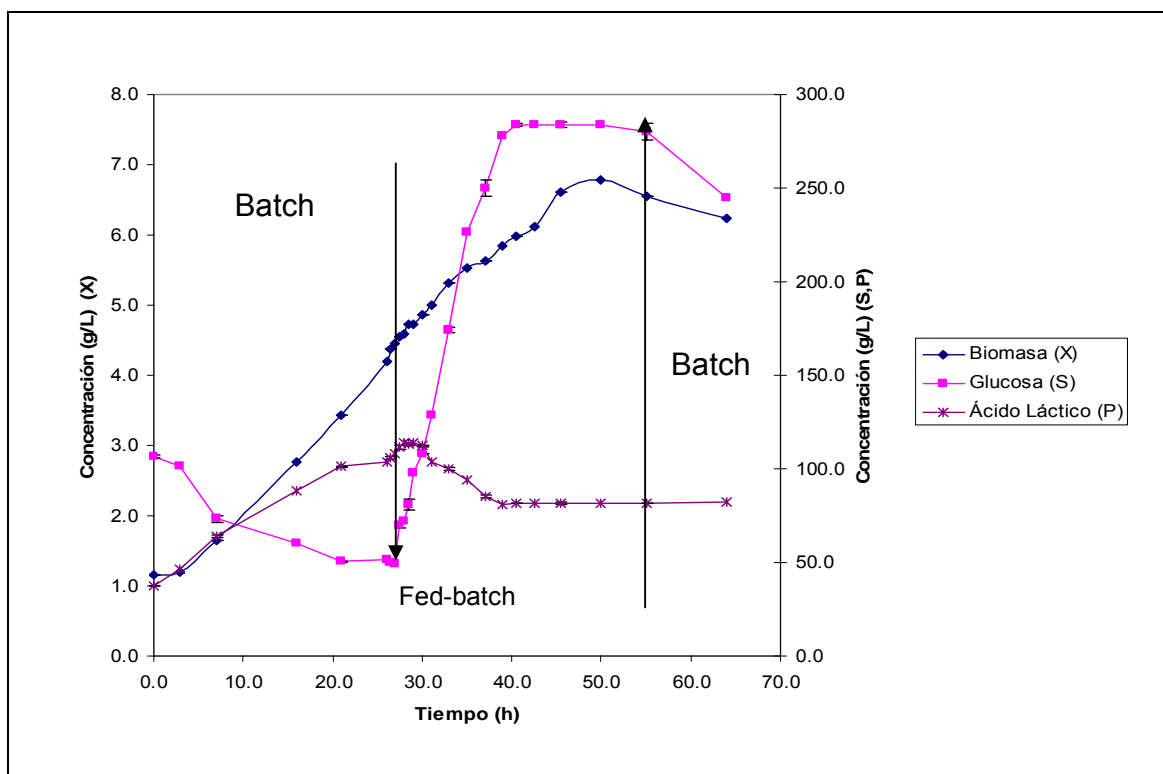
3.3.1 Fed-batch 1

Un proceso fed-batch es usado para complementar los contenidos del reactor y proveer control sobre la concentración de sustrato. Idealmente, al comenzar con una solución diluida de sustrato y añadiendo nutrientes, se evaden altas velocidades de crecimiento. Esto es de gran importancia para cultivos que demandan grandes cantidades de oxígeno por sus altas tasas de crecimiento, al igual que para fermentaciones que puedan sufrir inhibición por sustrato y cambiar sus rutas metabólicas a algunas deseadas. Por lo anterior, si el reactor se opera en modo batch hasta obtener una alta concentración celular y una baja concentración de sustrato, y posteriormente se comienza la adición de sustrato, se espera que la concentración de ambas permanezcan aproximadamente constantes durante la operación fed batch.

Después de tener los datos de las fermentaciones batch, se procedió a evaluar

diferentes estrategias fed-batch con el fin de mejorar el proceso para obtener mayores productividades. La primera estrategia de evaluación se realizó con un flujo de 74 mL/h y una concentración de glucosa de 850 g/L de acuerdo con lo reportado por Tan y Ding (2006).

Figura 14. Cinética de la fermentación fed-batch 1.



En la figura 14 se puede observar que la concentración de biomasa aumentó durante todo el tiempo, lo cual indica que el lactobacilo se adaptó al cambio en las condiciones de fermentación provocado por la adición de sustrato. Una vez comenzó la adición de glucosa su concentración aumentó desde 49.3 g/L hasta 283.9 g/L y la fermentación solo tuvo la capacidad de disminuirla después de 13.5 horas de haber finalizado el proceso de adición de sustrato. Por ende, la cantidad de glucosa

adicionada fue elevada, aunque no tanto para inhibir el crecimiento del microorganismo.

Al comenzar el proceso fed-batch hubo un pequeño aumento en la concentración de ácido láctico, sin embargo este se diluyó y bajó desde 107.8 g/L hasta 52.5 g/L. Este comportamiento indica que el flujo trabajado fue mayor al requerido para poder ver un efecto positivo en este modo de fermentación.

Tabla 6. Parámetros productivos en la fermentación fed-batch 1.

AL (g/L)	82.7
Y'_{ps} (g/g)	0.78
Q (g/L.h)	1.29
Y_{xs} (g/g)	0.059

Nota: estos resultados se refieren a toda la fermentación

En Tan y Ding (2006) la cepa *Lactobacillus casei* LA-04-1 fue usada para realizar procesos fed-batch. Allí todas las fermentaciones fed-batch fueron iniciadas como cultivos batch con una concentración inicial de glucosa de 90 g/L. Posteriormente una solución de glucosa de 850 g/L comenzó a alimentar al fermentador a un flujo de 30 mL/h cuando la concentración de glucosa en el biorreactor se encontraba entre 0-5 g/L. En este estudio se alcanzó una concentración final de 152.5 g/L de ácido láctico y una productividad volumétrica de 1.82 g/L.h.

3.3.2 Fed-batch 2

Debido a los resultados obtenidos en el sistema anterior, se disminuyó la concentración de glucosa en la solución a 100 g/L y el flujo a 43 mL/h, obteniendo los resultados reportados en la figura 15.

Figura 15. Cinética de la fermentación fed-batch 2.

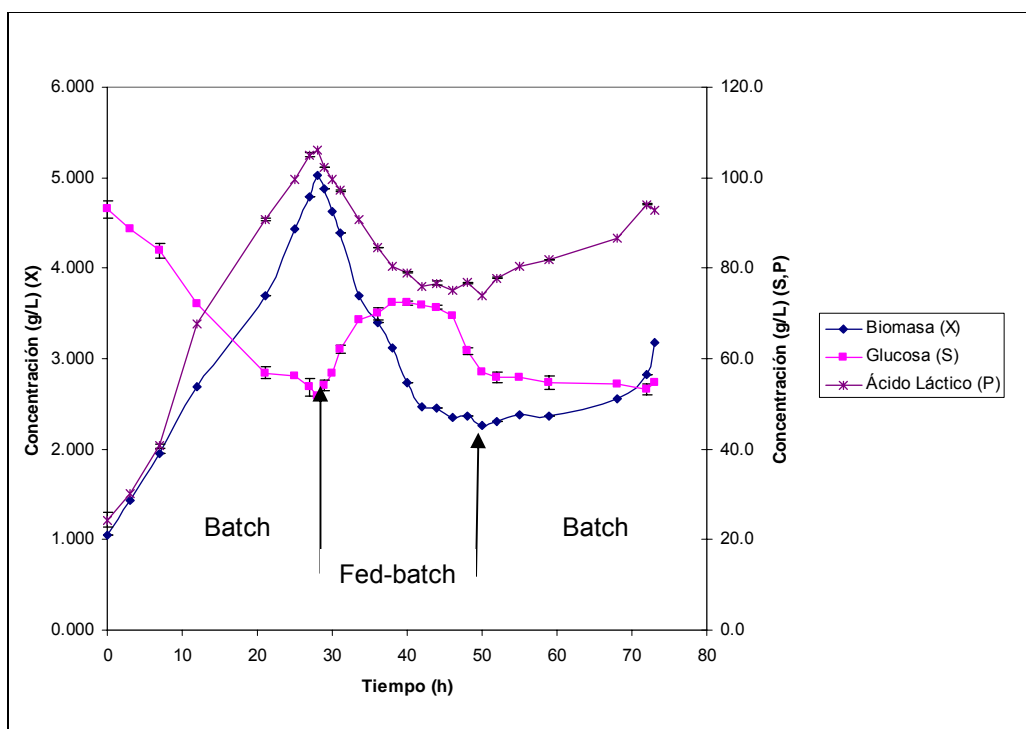


Tabla 7. Parámetros productivos en la fermentación fed-batch 2.

AL (g/L)	92.9
Y'_{ps} (g/g)	2.05
Q (g/L.h)	1.27
Y_{xs} (g/g)	0.070

En la figura 15 se puede observar que a las 27 horas, justo en el momento que comenzó a ingresar la solución de glucosa en el reactor, tanto la concentración de ácido como de biomasa empezaron a diluirse, indicando que el flujo era todavía bastante alto para que el sistema pudiera asimilarlo de forma adecuada.

En una fermentación en modo fed-batch se espera que la concentración de glucosa suba un poco en el momento que la adición de sustrato comienza, pero debido a la

alta cantidad de biomasa presente en el fermentador, la concentración de glucosa baja rápidamente.

En la fermentación mostrada en la Figura 15 comenzó a verse un poco este comportamiento, ya que aunque la concentración de glucosa aumentó en el momento que comienza el proceso fed-batch, esta baja un poco antes de que se acabe el proceso. Esto indica que a diferencia de la fermentación anterior, en esta configuración del sistema, el microorganismo asimiló la glucosa que entró al biorreactor, aunque no con la rapidez esperada.

En el caso del ácido láctico, también hubo una dilución inicial, sin embargo, la concentración de este comenzó a aumentar antes de terminar la adición de sustrato al reactor.

3.3.3 Fed-batch 3

Para este proceso fed-batch se mantuvo la concentración de glucosa en 100 g/L pero se disminuyó el flujo a 14 mL/h (Figura 16).

Figura 16. Cinética de la fermentación fed-batch 3.

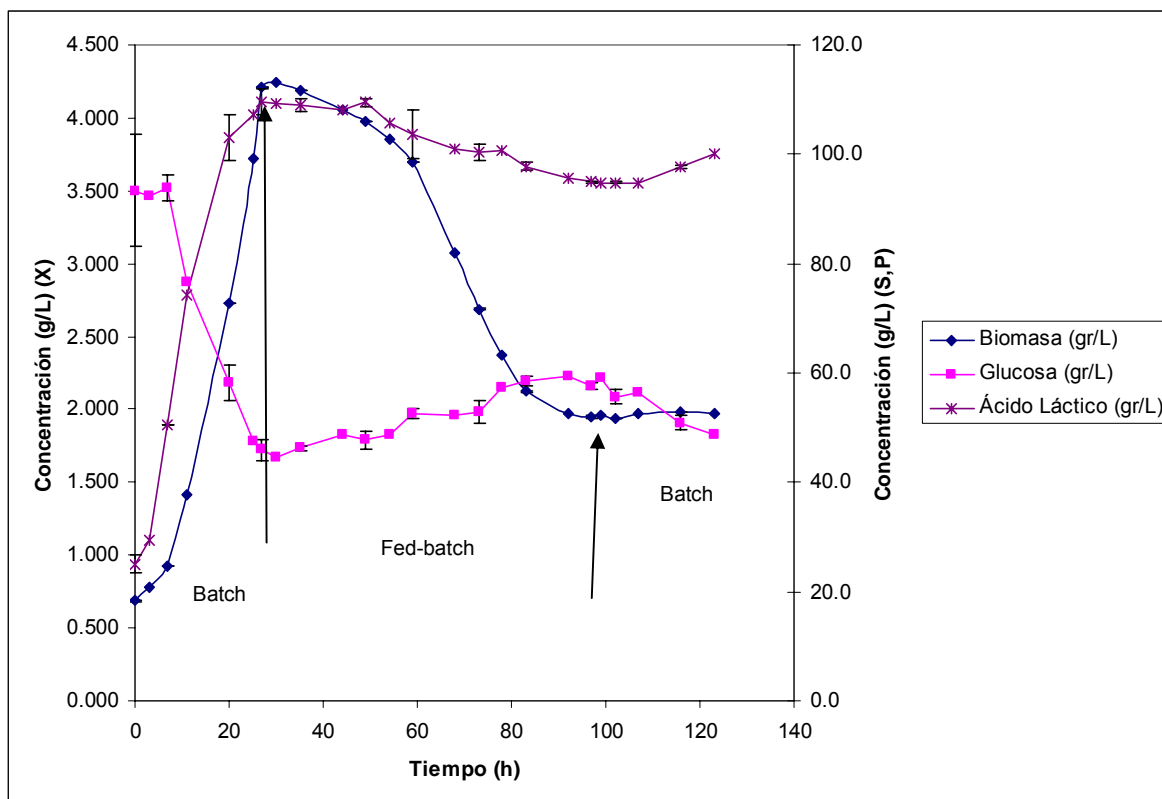


Tabla 8. Parámetros productivos en la fermentación fed-batch 3.

AL (g/L)	100.3
Y'_{ps} (g/g)	1.95
Q (g/L.h)	0.81
Y_{xs} (g/g)	0.038

Durante este proceso fermentativo, la concentración de ácido láctico disminuyó un poco en el modo de operación fed-batch. La concentración de glucosa permaneció aproximadamente constante durante este proceso, lo cual muestra que tanto la concentración de la solución de glucosa como el flujo usado fueron los adecuados

como para permitir que la bacteria consumiera prácticamente toda la glucosa entrante.

Por otra parte, la concentración de células disminuyó, debido posiblemente a que le faltaron los demás nutrientes del medio de cultivo, aunque la glucosa fuera consumida inmediatamente al ingresar al reactor.

Cabe anotar que lo que se busca en un proceso fed-batch, es que la concentración de células permanezca constante durante la fermentación y no que disminuya. Esto podría explicar por que no se obtiene un aumento en la concentración de ácido láctico.

En todas las fermentaciones realizadas en este estudio (batch y fed-batch) el rendimiento observado de sustrato en producto (Y'_{ps}) fue mucho mayor que el de sustrato en biomasa (Y'_{xs}) (Tablas 5, 6, 7 y 8). Esto indica que las condiciones de fermentación fueron apropiadas para favorecer la producción de ácido láctico sobre el crecimiento de biomasa.

En la tabla 9 se muestran los valores obtenidos en las diferentes configuraciones del sistema trabajadas.

Tabla 9. Resultados obtenidos con las diferentes configuraciones evaluadas.

	Vo (L)	Va(L)	Sf(g/L)	F(mL/h)	AL (g/L)	Y'_{ps} (g/g)	AL(g)	Q (g/(L.h))
Batch	2	0	0	0	122.6	2.71	245.2	2.4
Fed-batch 1	2	1	850	74	82.7	0.78	248.1	1.29
Fed-batch 2	2	1	100	43	92.9	2.05	278.7	1.27
Fed-batch 3	2	1	100	14	100.3	1.95	300.9	0.81

V_o : Volumen inicial del reactor.

V_a : Volumen total alimentado.

S_f : Concentración de glucosa en la alimentación.

F: Flujo de la alimentación.

Al: Concentración de ácido láctico obtenido.

Y'_{ps} : Rendimiento observado de sustrato en producto.

Q: Productividad volumétrica.

Para comparar los resultados obtenidos en las diferentes fermentaciones se realizó un análisis de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para ello se evaluaron las diferencias que existían entre las fermentaciones y los diferentes parámetros productivos (concentración de ácido láctico, Y_{ps} , Q) (Anexo 5).

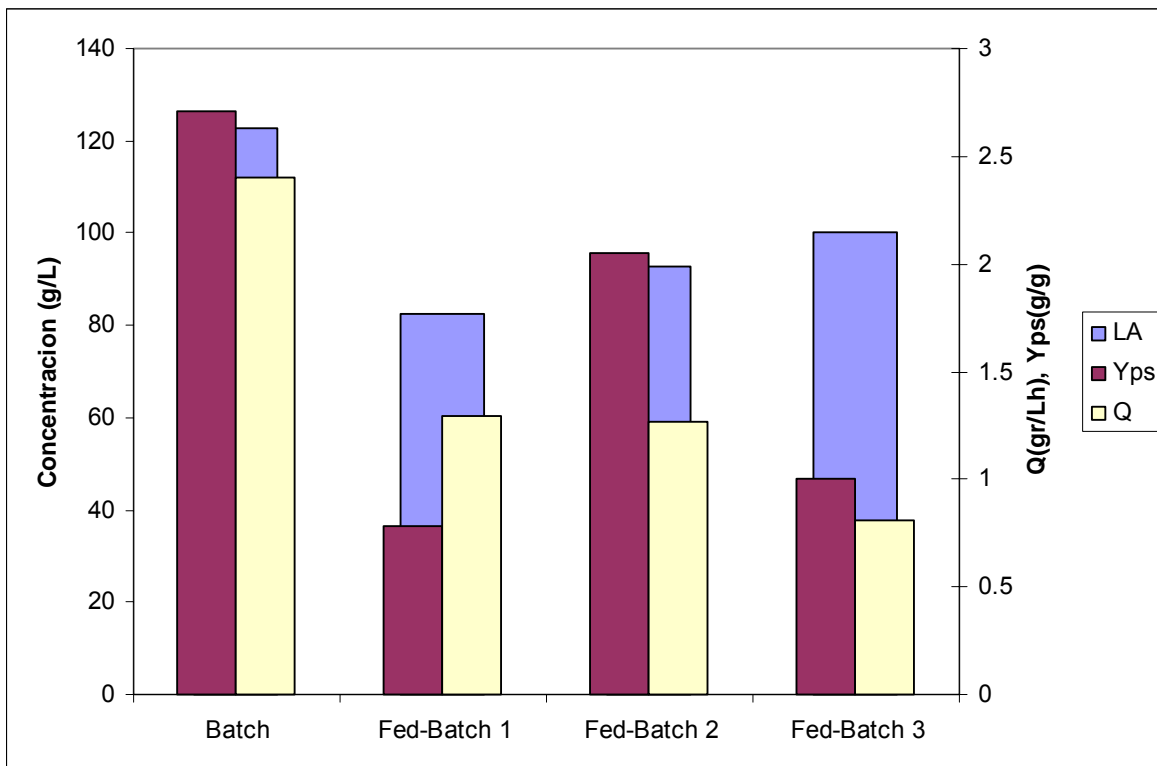
Se hallaron diferencias significativas entre la concentración de ácido láctico producido y las diferentes configuraciones de fermentación ($P < 0,05$). Con la prueba de rangos múltiples, se mostró que existen diferencias significativas entre todas las configuraciones de fermentación. Cabe anotar que aunque con ninguna fermentación fed-batch se obtuvo una concentración de ácido láctico mayor a la obtenida en modo batch, sí se obtuvieron mayores cantidades de este metabolito, tal como se describe en Hagerdal y Hofvendahl (2000).

Con respecto al rendimiento de sustrato en producto se obtuvo un valor P menor que 0.05, lo cual indica que existen diferencias significativas. Posteriormente mediante la prueba de rangos múltiples se identificó que estas diferencias se presentan entre todas las condiciones de fermentación.

Se le realizaron las mismas dos pruebas a los resultados obtenidos con las productividades volumétricas y se encontró que existen diferencias significativas entre todos los modos de fermentación, excepto entre las fermentaciones fed-batch 1 y 2.

En la Figura 17 se observa más claramente las diferencias encontradas.

Figura 17. Resultados obtenidos con las diferentes configuraciones evaluadas.



En la figura 17 se puede observar los resultados obtenidos después de evaluar las diferentes configuraciones. La mayor concentración de ácido láctico obtenida corresponde al proceso batch, mientras que en los procesos fed-batch, esta aumenta cada vez que el flujo de alimentación es menor, indicando una mayor capacidad de la bacteria para metabolizar la solución de glucosa entrante.

Respecto al rendimiento de sustrato en producto, el mayor valor obtenido corresponde igualmente al proceso batch, mostrando cómo en este tipo de fermentación la mayor cantidad de sustrato es usado por la bacteria.

Los productividades volumétricas fueron menores cada vez que se disminuía el flujo adicionado al biorreactor; esto es claro, ya que la concentración final de ácido láctico no aumentó en ninguno de los proceso fed-batch, y la productividad volumétrica tiende a disminuir mientras el tiempo de fermentación aumenta.

En este estudio, a diferencia de Tang y Ding (2006) y Roukas y Kotzekidou (1998), no se logró un aumento en la concentración final de ácido láctico durante el proceso fed-batch. Sin embargo, se obtuvieron mayores cantidades en gramos de este metabolito en este proceso semicontinuo en comparación con el proceso batch, tal como se describe en Hagerdal y Hofvendahl (2000). A pesar de esto, de acuerdo a los resultados se prefiere la fermentación batch sobre la fed-batch, ya que aunque en la última se obtuvo una mayor cantidad en gramos del metabolito de interés, esto solo se logro a expensas de más tiempo y sustrato.

3.4 SIMULACIÓN.

3.4.1 Simulación del biorreactor en modo batch.

Para la implementación del modelo de simulación, se trabajó con las ecuaciones propuestas por Liu *et al.* (2003), en donde se describen la ecuación logística para la cinética de crecimiento de biomasa (ecuación 2) y la ecuación de Luedeking–Piret (Luedeking y Piret, 1959) para la cinética de producción de ácido láctico (ecuación 3). Finalmente, para la cinética de consumo de sustrato (ecuación 4) se usó el modelo propuesto por Islam *et al.* (2003)

Ecuación 2. Forma integrada de la ecuación de crecimiento logístico.

$$X = \frac{X_o * X_m * e^{\mu m * t}}{X_m - X_o + X_o * e^{\mu m * t}}$$

Ecuación 3. Formación de Producto.

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

Ecuación 4. Consumo de sustrato.

$$S = S_0 - \frac{X_0}{\mu} \left[\left(\frac{\mu_m}{Y_{xs}} + m_s \right) + \frac{\mu + \beta}{Y_{xs}} \right] (e^{\mu^* t} - 1)$$

Para escoger el modelo a trabajar se realizó una comparación de diferentes ecuaciones con el software Polymath 6.0 y se escogieron los modelos de acuerdo con el que tuviera menor Rms (Root Mean Square Deviation) y R^2 . A partir de estas regresiones se obtuvieron los parámetros cinéticos que fueron usados para realiza las simulaciones (tabla 10).

Tabla 10. Parámetros cinéticos obtenidos en Polymath 6.0.

$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	0,355
$Y_{x/s} (\text{g/g})$	0.0654
$\beta (\text{g/g.h})$	0.525
$\alpha (\text{g/g})$	12,57
$X_0 (\text{g/l})$	0,35
$m_s (\text{g/g.h})$	4,03
$S_0 (\text{g/l})$	97,82
$X_m (\text{g/l})$	4.3

El valor de Y_{xs} corresponde al rendimiento teórico de sustrato en biomasa y debe ser mayor al rendimiento observado, en este caso la relación se da ya que el rendimiento observado en la fermentación batch fue de 0.058 g/g.

El valor obtenido para la constante de producción de ácido láctico no relacionada con

el crecimiento (β) al ser diferente de cero, muestra una vez mas que de acuerdo a las condiciones de fermentación evaluadas, la producción de este metabolito está parcialmente relacionada con el crecimiento celular.

Estos resultados son similares a los presentados en Islam *et al.* (2003) y Hagerdal y Hofvendahl (2000) en donde el α es mucho mayor que el valor β ; indicando así que de acuerdo al modelo, la producción de ácido láctico es llevada a cabo principalmente durante la fase de crecimiento celular. Así mismo, el alto valor del coeficiente de mantenimiento (m_s) es similar al obtenido por Islam *et al.* (2003): $2,65 \text{ h}^{-1}$), muestra una alta necesidad de las células en realizar gastos energéticos en aspectos diferentes a su reproducción y a la producción del ácido, tales como la movilidad celular, la adaptación a los cambios de pH y la reparación celular.

Luego de efectuar las fermentaciones batch en el biorreactor y obtener los parámetros cinéticos para los modelos a usar, se llevó a cabo la implementación del modelo de simulación, obteniendo las figuras 18, 19 y 20 (en EXCEL) donde los subíndices exp y sim se refieren a los valores experimentales y simulados, respectivamente.

Figura 18. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de la biomasa.

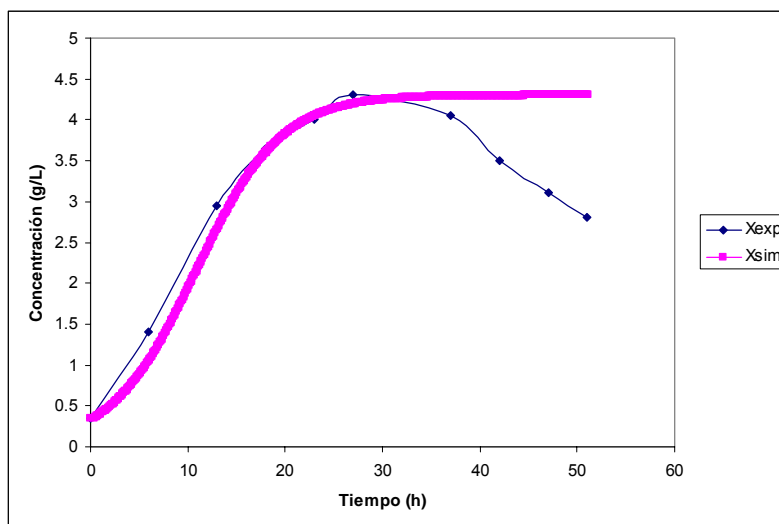


Figura 19. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de sustrato.

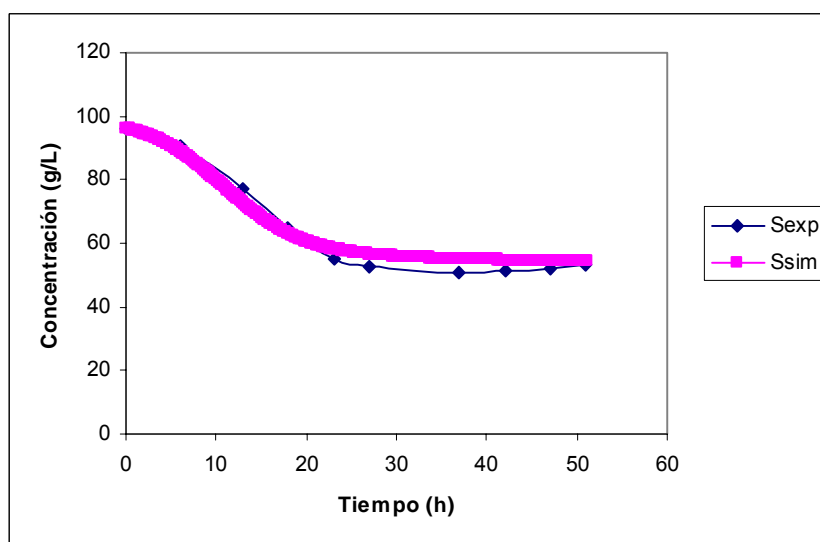
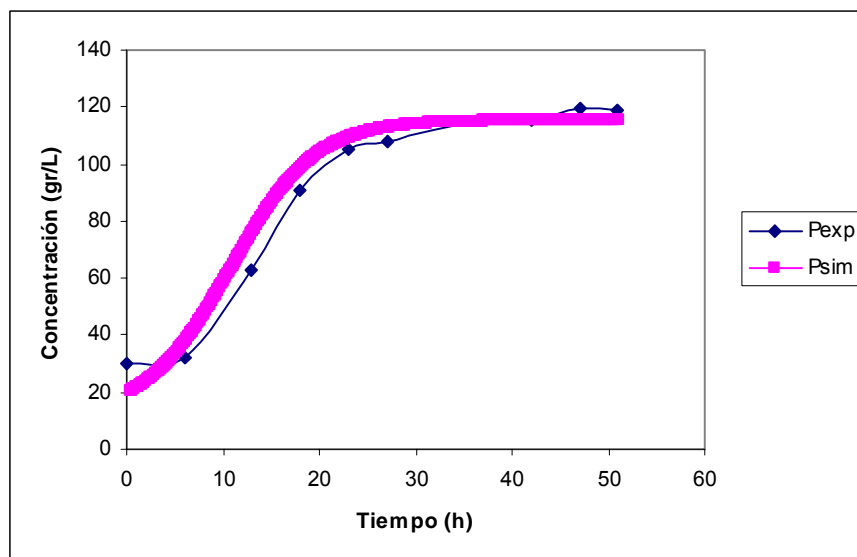


Figura 20. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de producción de ácido láctico.



A partir de estos resultados (figuras 18, 19 y 20) se puede observar que los modelos usados describen correctamente el comportamiento presentado en la fermentación, aunque el modelo usado para predecir la concentración de biomasa en el fermentador no tenga en cuenta la fase de muerte celular.

3.4.2 Simulación en Superpro Designer

La simulación del proceso fermentativo se realizó en el software Superpro Designer. Este programa solo cuenta con los modelos cinéticos de Monod, Naldane (inhibición debido al producto), primer orden (la velocidad de cambio depende de la concentración de los reactivos) y orden cero (la velocidad de cambio es independiente de la concentración de los reactivos). Para ajustar los datos obtenidos en fermentación batch se buscó cual de ellos arrojaba la mejor correlación.

El mejor ajuste se logró con el Modelo de Monod en comparación con los modelos restantes. Desafortunadamente las correlaciones obtenidas no fueron satisfactorias.

Para poder realizar la simulación del proceso con el modelo de Monod, se hizo necesario encontrar una velocidad específica de crecimiento y una constante de saturación (K_s), a pesar de que la fermentación real no obedece a esta expresión (ecuación 9).

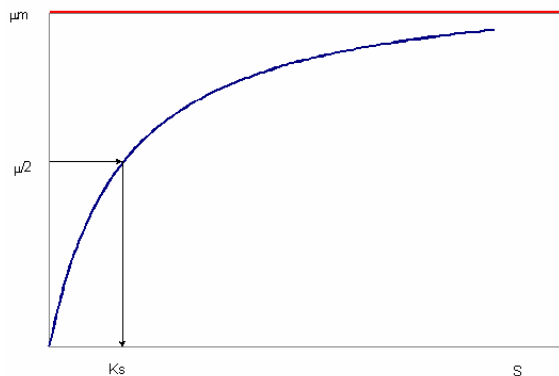
Ecuación 9. Ecuación de Monod

$$u_x = u_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Para determinar velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{\max}), se graficó $\ln X$ vs t de la fase exponencial siendo μ_{\max} la pendiente de esta línea.

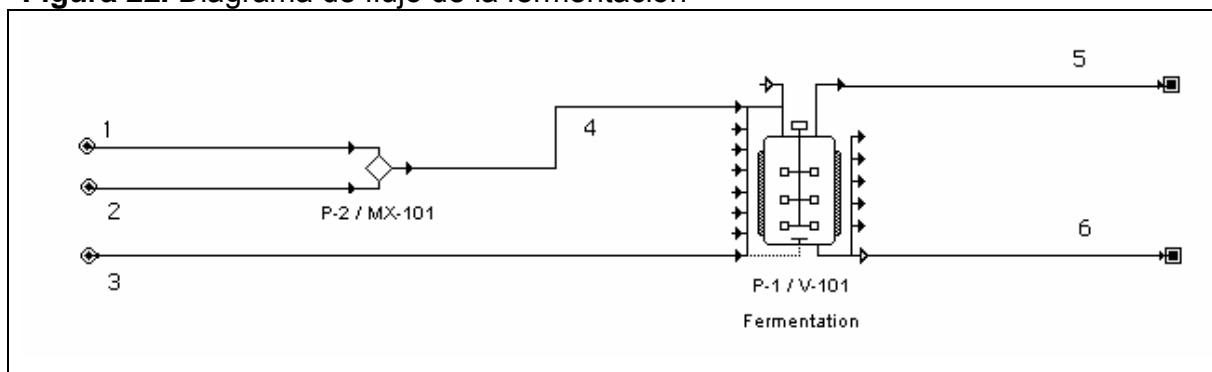
Por definición K_s es igual a la mitad del valor de μ_{\max} (Figura 21), por lo tanto ya se tienen los dos parámetros cinéticos para simular la fermentación de acuerdo al modelo de Monod.

Figura 21. Velocidad específica de crecimiento vs. concentración de sustrato



Como ya se había mencionado, en el laboratorio se trabajó con un inóculo equivalente al 10% del volumen total y este se mezcló con el medio nuevo para realizar las fermentaciones, lo cual fue simulado en Superpro Designer (Figura 22).

Figura 22. Diagrama de flujo de la fermentación



En el proceso que se muestra en la Figura 22, la corriente 1 corresponde al medio nuevo y la corriente 2 al inóculo, estas son mezcladas en el mezclador (MX-101) para su ingreso al fermentador.

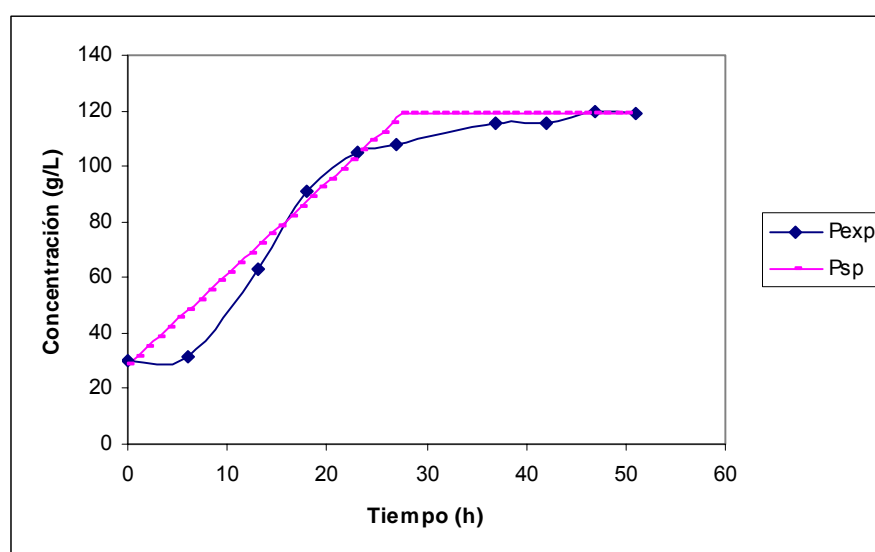
La corriente tres es el nitrógeno gaseoso utilizado para purgar el reactor, la 5 es el venteo del nitrógeno y del dióxido de carbono generado por la fermentación, mientras que la corriente 6 es la de salida.

Tabla 11. Tabla de corrientes

CORRIENTE	1	2	3	4	5	6
PARÁMETRO						
TEMPERATURA (°C)	25	25	25	25	37	37
PRESIÓN (ATM)	1	1	1	1	1	1
FLUJO MÁSSICO (kg/Batch)	1.88	0.251	3.6	2.1	3.6	2.131
AGUA (kg)	1.7	0.18	0	1.88	0	1.88
GLUCOSA (kg)	0.18	0.01		0.19	0	0
ÁCIDO LÁCTICO (kg)	0	0.06	0	0.06	0	0.25
BIOMASA (kg)	0	0.0007	0	0.007	0	0.007
NITRÓGENO (kg)	0	0	3.6	0	3.6	0

Como se puede observar en la tabla 11, debido a las limitaciones que tiene el programa solo se simuló la variable más importante en el proceso trabajado: la producción de ácido láctico. La cinética se muestra en la figura 23, en donde P_{exp} se refiere a los datos experimentales y P_{sp} a los valores simulados.

Figura 23. Comparación de los valores experimentales y simulados para la cinética de producción de ácido láctico



3.4.3 Simulación en HYSYS

El proceso simulado en HYSYS consiste en la esterificación del ácido láctico crudo con metanol, destilación del lactato de metilo producido e hidrólisis de lactato de este para obtener el alcohol y el ácido láctico.

Para la simulación del proceso se presentó un inconveniente. Debido a que el pH en la fermentación fue controlado con carbonato de calcio, la mayor parte del ácido láctico producido se encontraba en forma de lactato de calcio, pero este compuesto no está registrado en la base de datos de HYSYS, debido a esto se obvió el proceso

de separación de biomasa y la reacción del lactato de calcio con el ácido sulfúrico en presencia de metanol, que regenera el ácido láctico. Es en esta etapa, reacción de esterificación, donde la simulación comenzó, el ácido láctico impuro se disuelve en metanol en cantidades equimolares para después ser calentado y completar la esterificación con el metanol presente.

La mezcla resultante compuesta de lactato de metilo y agua entra entonces a una columna de destilación, en donde la hidrólisis continua del éster a presión atmosférica. El alcohol (metanol) producido por la hidrólisis es removido por la parte superior de la columna y el ácido láctico es recuperado por los fondos.

Teniendo en cuenta las tendencias para el mercado del ácido láctico en Colombia, se simuló un proceso en el cual se producen 250 toneladas de ácido láctico al año, equivalente a un 70% del mercado nacional para el año 2010.

3.4.3.1 Suposiciones y aproximaciones del proceso

- **Fermentador (R-001)**

En el fermentador se utilizó un sistema batch. El medio utilizado era agua con una concentración inicial de glucosa de 96 g/l, siendo este el factor limitante de la reacción, se asumió que el ácido láctico sale del fermentador como tal y no como lactato de calcio, ya que como se mencionó anteriormente este compuesto no está registrado en la base de datos de HYSYS.

- **Reactor de esterificación (R-101)**

La reacción de esterificación se trabajó de acuerdo a lo descrito en Yang *et al.* (2004) y Sanz *et al.* (2007).

- **Flash (TK-101)**

Se utilizó un *Adjust* para determinar la temperatura necesaria en el flash, a la cual la salida de los líquidos fuera una mezcla equimolar de lactato de metilo y agua, de modo que entraran a la torre de destilación reactiva en estas cantidades.

- **Torre de destilación de separación (T-101)**

Debido a que del flash sale una mezcla y es necesario que estos reactivos entren por separado a la destilación reactiva, se usó esta torre de destilación para separarlos.

Se utilizó una torre de 10 platos con condensador total y se alimentó en la etapa 5.

- **Torre de destilación reactiva (T-102)**

Esta torre fue especificada de acuerdo a lo reportado por Cardona *et al.* 2004.

Las especificaciones utilizadas fueron:

- Número de platos: 40
- Sección reactiva: Platos 10 al 30
- Plato de alimentación del lactato de metilo: 10
- Plato de alimentación del agua: 30
- Temperatura de entrada de los reactivos: 50°C

Las tablas 12 y 13 corresponden a la tabla de corrientes del proceso simulado y a la de equipos y utilidades respectivamente.

En la figura 24 se muestra el diagrama de flujo del proceso simulado en HYSYS.

Tabla 12. Tabla de corrientes

CORRIENTE													
PARÁMETRO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
TEMPERATURA (°C)	60	60	60	60	114.39	114.39	50	100.04	144.66	50	50	64.725	210.78
PRESIÓN (atm)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FLUJO MÁSIICO (kg/h)	16.021	54.047	0	70.068	26.521	43.547	43.547	6.4832	37.063	6.4832	37.063	11.663	31.883
FLUJO MOLAR (kmol/h)	0.5	1	0	1.5	0.78675	0.71325	0.71325	0.35668	0.35657	0.35668	0.35657	0.35668	0.35657
FRACCIÓN MOLAR													
AGUA	0	0.5	0	0.667	0.82	0.5	0.5	0.9981	0.0019	0.9981	0.0019	0.001	0.0093
ÁCIDO LÁCTICO	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.99
LACTATO DE METILO	0	0	0	0.333	0.18	0.5	0.5	0.0019	0.9981	0.0019	0.9981	0.0093	0.0007
METANOL	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.9897	0

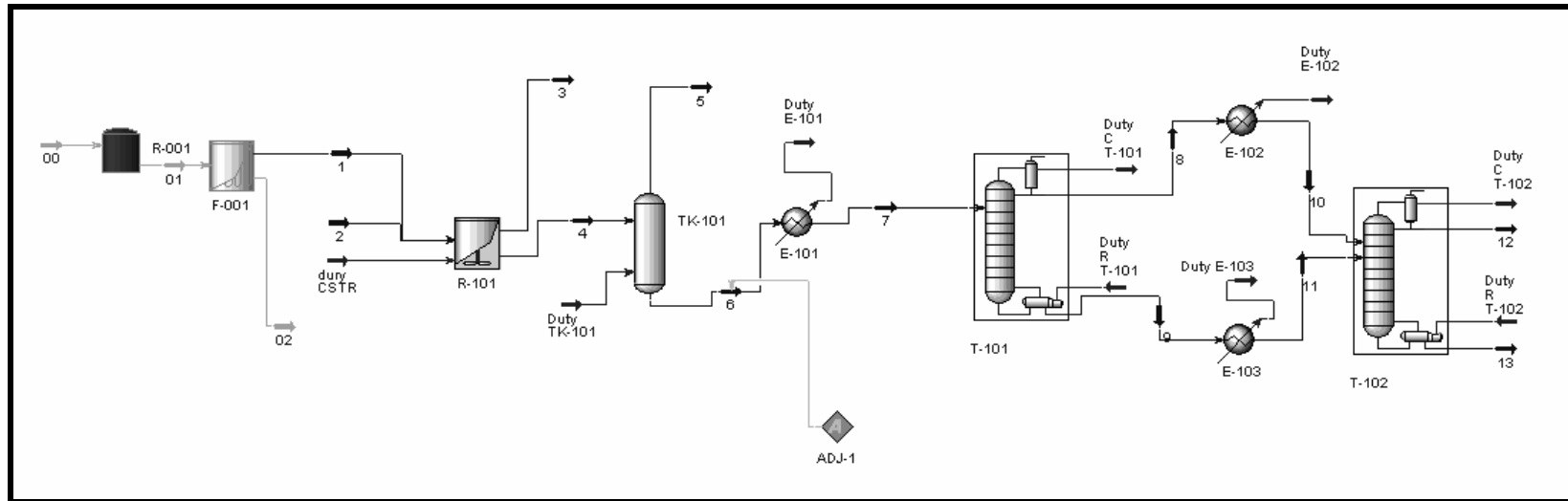
Las corrientes 00, 01 y 02 son ficticios en la simulación, por lo que no fueron simulados en HYSYS, así como los equipos R-001 y F-001.

La corriente 00 es la entrada de células y medio de cultivo al biorreactor (R-001). La corriente 01 es la salida del biorreactor, que corresponde al ácido láctico diluido producido y las células formadas. La corriente 02 es la salida de lodos del filtro (F-001), la cual contiene células y agua.

Tabla 13. Tabla de Equipos y Utilities

	Duty CSTR	Duty TK-101	Duty E-101	Duty C T-101	Duty R T-101	Duty E-102	Duty E-103	Duty C T-102	Duty R T-102
EQUIPO	R-101	TK-101	E-101	T-101	T-101	E-102	E-103	T-102	T-102
UTILITY	Lps	Lps	cw	cw	lps	Cw	cw	cw	lps
ENERGIA (Kj/h)	4890	4.17E+04	6730	4.35E+04	5.24E+04	1.36E+03	7.51E+03	2.03E+04	2.71E+04
ENERGIA (MJ/ton)	153.339605	1307.93352	211.037943	1364.06397	1642.20759	42.4898087	235.559737	635.308874	848.855441
PRESIÓN (atm)	11.2	11.2	1	1	11.2	1	1	1	11.2
T ENTRADA (°C)	186.02	186.02	30	30	186.02	30	30	30	186.02
T SALIDA (°C)	186.02	186.02	45	45	186.02	45	45	45	186.02
Cp (kJ/kmol°C)			79.889	79.889		79.889	79.889	79.889	
Δ H vap (kJ/kmol)	36231	36231			36231				36231
Flujo (kg/h)	2.42941128	20.7220336	101.090263	653.406602	2.60E+01	20.3532401	112.836561	304.322247	1.34E+01
Flujo total (Kg/año)	19240.9373	164118.506	800634.881	5174980.29	2.06E+05	161197.662	893665.561	2410232.2	1.07E+05
Costo unitario (US\$/ton)	16.4	16.4	0.0148	0.0148	16.4	0.0148	0.0148	0.0148	16.4
Costo total (US\$/año)	315.551372	2691.5435	11.8493962	76.5897082	3379.43259	2.38572539	13.2262503	35.6714365	1746.82528

Figura 24. Diagrama de flujo del proceso



3.4.3.2 Grados de Libertad

Dependiendo de los equipos utilizados, se tomaron diferentes variables como grados de libertad (tabla 14)

Tabla 14. Grados de libertad utilizados en los equipos

Equipo	Grados de libertad	Valor
Fermentador	pH	4-7
	Temperatura	37 °C
R-101	Temperatura	60 °C
	Presión	1 atm
TK-101	Temperatura	114.4 °C
	ΔP	0
E-101	Temperatura de salida	50 °C
	ΔP	0
T-101	Flujo de destilado	0.3567 kmol/h
	Flujo de fondo	0.3566 kmol/h
E-102	Temperatura de salida	50 °C
	ΔP	0
E-103	Temperatura de salida	50 °C
	ΔP	0
T-102	Flujo de fondo	0.3566 kmol/h
	Fracción de ÁCIDO LÁCTICO en los fondos	0.99

3.4.3.3 Matriz de indicadores

Tabla 15. Matriz de indicadores de proceso

Condiciones del proceso	Nombre del proceso	Producción de ácido láctico por fermentación	
	Producción (ton/año)	252	
	Pureza	99,70%	
	Presión de los reactores (atm)	1	
	Temperatura de los reactores (°C)	R-001	37
		R-101	60
	Xr (Conversión por paso)	Rendimiento en R-001	Yps=1
		X en R-101, R-102 y T-101	= 1
	X global	1	
	Listado de las operaciones unitarias de separación	Separación por flash	
Destilación			
Destilación reactiva			
		Consumo	
Indicadores Tecnológicos	Agua de enfriamiento (t/t)	37,46	
	Lps (low pressure steam) (Mj/t)	3.952,34	
Indicadores económicos	Ventas (US\$/año)	388.080	
	Costo de capital (US\$) ¹	737.854	
	Costo de utilities (US\$/año)	8.273	
	Costo de materias primas (US\$/año)	185.648	
	Utilidades (US\$/año)	194.158	
	VPN (valor presente neto) (US\$)	241.139	

De acuerdo al VPN (tabla 15) obtenido a partir de la matriz de indicadores de gestión se observa que el proyecto es rentable a 10 años.

A pesar del alto costo de capital, este se logra recuperar y obtener utilidades en menos de 10 años.

¹ Realizados en CAPCOST.

4 CONCLUSIONES

La concentración de carbonato de calcio como agente regulador del pH en el biorreactor, no tuvo un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico bajo las condiciones evaluadas.

El proceso de fermentación batch generó una gran cantidad de ácido láctico (122.6 g/L), con un muy buen rendimiento de sustrato en producto (2.71 g/g). Esto indica que el *Lactobacillus casei* ATCC 7469 logró metabolizar el sustrato para producir mayores cantidades de ácido láctico y mantener en niveles mas bajos sus necesidades de mantenimiento y formación de biomasa.

La concentración final de ácido láctico, el rendimiento observado de sustrato en producto y la productividad volumétrica obtenidos en modo batch en el biorreactor, fueron un 28.4%, 42.63% y 96.8% respectivamente, superiores a aquellas logradas en el agitador, indicando que en el primero, se dan mejores condiciones de agitación, temperatura y anaerobiosis.

La producción de ácido láctico bajo las condiciones evaluadas, es un proceso parcialmente relacionado al crecimiento, ya que aunque la mayor parte de él fue producida durante la fase exponencial, un menor porcentaje se produjo en la fases estacionaria y de muerte celular.

El proceso de fermentación fed-batch no arrojó buenos resultados en términos de productividad volumétrica, rendimiento de sustrato en producto, ni concentración de ácido láctico siendo estos menores a los parámetros obtenidos en el modo batch. Los resultados mostraron que

una adición de sustrato al biorreactor siempre resultó en una dilución del ácido láctico.

En la fermentación fed-batch con 14 mL/h y 100 g/L de solución de glucosa, se pudo observar que estas condiciones fueron las adecuadas para mantener la concentración del sustrato aproximadamente constante. Sin embargo, tanto en esta configuración, como en los otros procesos semicontinuos se presentó una dilución del ácido láctico.

El rendimiento de sustrato en producto fue mucho mayor en todas las fermentaciones en comparación con el rendimiento de sustrato en biomasa. Esto indica que las condiciones de fermentación fueron apropiadas para favorecer la producción de ácido láctico sobre el crecimiento de biomasa.

La cantidad de ácido láctico en gramos obtenido en todos los procesos fed-batch fue superior al obtenido en los procesos batch. Sin embargo, este aumento implicaría mayores tiempos de proceso y mayores costos de producción.

La cinética de la fermentación ácido láctica por medio del *Lactobacillus casei* ATCC 7469, se ajustó adecuadamente al modelo de la ecuación logística para el crecimiento de biomasa, la ecuación de Luedeking–Piret para la producción de ácido láctico y a la ecuación propuesta por Islam *et al.* (2003) para describir el consumo de glucosa. Se encontró en el modelo propuesto una descripción razonable para los diferentes parámetros de la fermentación batch.

La cinética de crecimiento de biomasa no se ajusta adecuadamente a la fase estacionaria y muerte celular del microorganismo, ya que el modelo evaluado no tiene en cuenta esta fase. Adicionalmente, una de las

limitaciones de este modelo es que la concentración máxima de biomasa debe ser encontrada experimentalmente con muy buena precisión ya que una pequeña variación de este, genera cambios drásticos en los resultados obtenidos.

La cinética de crecimiento de biomasa de la simulación realizada en Superpro Designer, no se ajusta a los valores reales, debido a que el modelo de Monod no concuerda con los datos experimentales. No obstante, los errores arrojados son pequeños y pueden acoplarse los resultados a procesos de preparación de materias primas y de separaciones.

Los resultados obtenidos en la simulación en HYSYS permitieron realizar el estudio de los equipos necesarios para la producción de ácido láctico, así como los balances de materia y energía del proceso y el cálculo de aspectos económicos tales como los costos de materias primas, de utilities y el valor presente neto.

5 RECOMENDACIONES

Se observó que la producción de ácido láctico está parcialmente relacionada con el crecimiento celular, por eso, a pesar de que en este estudio no se obtuvieron los resultados esperados con la fermentación fed-batch, se pueden buscar configuraciones del sistema que permitan que la bacteria continúe más tiempo durante su fase de crecimiento exponencial, lo cual favorecería la producción de ácido láctico.

Durante la última fermentación fed-batch el flujo fue tal que la concentración de glucosa no aumentó a pesar de que esta era adicionada en el reactor. Esto significa que la bacteria tuvo la capacidad de consumir completamente todo el sustrato entrante, por lo tanto se sugiere aumentar la concentración de glucosa entrante lo cual podría generar una mayor producción de ácido láctico.

Se recomienda evaluar el efecto de una fuente de carbono diferente a la glucosa, ya que al tratarse de un sustrato puro tiene altos costos, lo cual puede ser una desventaja a la hora de escalar el proceso.

Se sugiere un sistema de fermentación fed-batch, en donde la solución entrante consista en todos los nutrientes del medio de cultivo, para así evitar la dilución y/o consumo de estos en el biorreactor.

6 BIBLIOGRAFIA

AKERBERG C, HOFVENDAHL K, ZACCHI, (1998) Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. Appl Microbiol Biotechnol. 49: 682-690.

AMRANE A, PRIGENT Y.(1997), Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: influence of peptidic nitrogen deficiency. J Biotechnol . 55:1– 8.

BAILEY R, JOSHI D, MICHAELS S, WISDOM R. (1998) Production of lactic acid from whey by continuous fermentation and lactic acid purification by solvent extraction. U. S. Patent (Se:13), 4,771,001.

BOLAÑOS G, ACEVEDO A, YÉPEZ B, JIMÉNEZ AR. (2000) Acido láctico y sus derivados. Proyecto de investigación. Grupo de diseño de procesos. Universidad del Valle.

CARDONA C, LÓPEZ L, LÓPEZ F. (2004) Separación de ácido láctico por destilación reactiva. Revista Universidad EAFIT. 40 (135): 40-53.

COMUNIDAD ANDINA DE NACIONES. (2007) Sección brújula empresarial. (2007). <http://www.comunidad.andina.org>. (Consultado en Mayo de 2007).

DATTA R, TSAI S, BONSIGNORE P, MOON S, FRANK J. (1995) Technological and economic potencial of poly(lactic acid) and lactic acid derivates. FEMS Microbiology Reviews. 16: 221-231.

DEMAN JC, ROGOSA M, SHARPE ME. (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* 23:130-135

ELIBOL M, BULUT S, OZER D. (2004) Effect of different carbon sources on L (+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal.* 21: 33-37

GOKHALE D, KADAM S, PATIL S, BASTAWDE K, KHIRE J. (2006) Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry.* 41: 120–126.

GONG H, LUN S. (1996) The kinetics of lysine batch fermentation, *Chin. J. Biotechnol.* 12 (Suppl.) 219–225.

GUOQIANG D, KAUL R, MATTIASSON B. (1991) Evaluation of alginate-immobilized *Lactobacillus casei* for lactate production. *Applied Microbiology Biotechnology.* 36:309-314

HAGERDAL B, HOFVENDAHL K. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology.* 26: 87–107.

ISHIZAKI A, VONKTAVEESUK P. (1996). Optimization of substrate feed for continuous production of lactic acid by *Lactococcus lactis* IO-1. *Biotechnology Letters.* 18: 1113-1118

ISLAM R, BIAZARA J, TANGOB B, BABOLIANC E. (2003). Solution of the kinetic modeling of lactic acid fermentation using Adomian decomposition method. *Applied Mathematics and Computation.* 144: 433–439

JARVIS LISA. (2001) Lactic acid outlook up as polylactide nears market. Chemical Market Reporter. 2001: 5-6

JACKMAN S, LI H, MUSTACCHI R, KNOWLES C, SKIBAR W, SUNDERLAND G, DALRYMPLE I. (2004). An electrokinetic bioreactor: using direct electric current for enhanced lactic acid fermentation and product recovery. Tetrahedron.60: 655–661.

JOGLEKAR HG, RAHMAN I, BABU S, KULKARNI B, JOSHI A. (2006). A Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. Separation and Purification Technology.52: 1-17.

KASHKET E. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. FEMS Microbiol Rev. 46: 233– 44.

KUMAGAI A, YAGUCHI M, ARIMURA T, MIURA S. (1994) Method for the production of lactic acid and lactic esters. Eur Pat Appl Patent (Se:14), EP 0 614 983 A2.

LINKO Y-Y, JAVANAINEN P. (1996) Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch Enzyme and Microbial Technology, 19: 118-123.

LIU J, JI L, WENG L, ZHANG Q, XU H. (2003) A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal. 14: 137–141

LUDEKING R. PIRET (1959) Transient and steady state in continuous fermentation. Theory and experiment. J Biochem Microbio Technol Eng. 1: 431-450.

MERCK S. A. (2006) .Ficha de datos de seguridad. Merck S.A.

MILLER, GL.(1959).Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426–428.

MIURA S, KUMAGAI A. (1995) Method for fermentative production of lactic acid. Eur Pat Appl Patent (Jun 14);0 657 542 A1.

OHKOUCHI A, INOUE Y. (2006). Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011 Y. Bioresource Technology. 97: 1554–1562

PATEL K, CHAUHAN K, TRIVEDI U. (2007) Statistical screening of medium components by Plackett–Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus sp.* KCP01 using date juice. Bioresource Technology. 98: 98-103.

PETROV K, PETROVA P, BESCHKOV V. (2007). Improved immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in polyacrylamide gel, preventing cell leakage during lactic acid fermentation. World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 423-428.

REDDY G, ALTAF MD, NAVEENA B. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. Bioresource Technology. 98: 498-503.

ROBISON P. (1988) Improved lactic acid fermentation with novel *Lactobacillus delbrueckii* strain. US Patent (Jun 7); 4,749,652.

ROUKAS T, KOTZEKIDOU P. (1998) Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized

Lactobacillus casei and *Lactococcus lactis* using fedbatch culture.

RUSSO L, KIM H. (1996) Membrane-based process for the recovery of lactic acid by fermentation of carbohydrates containing sugars. US Patent 5;503:750.

SÁNCHEZ N, RAMÍREZ D. (2004) Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico. Proyecto de Grado de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Pg: 44-45.

SANZ M, DELGADO P, BELTRAN S. (2007) Kinetic study for esterification of lactic acid with ethanol and hydrolysis of ethyl lactate using an ion-exchange resin catalyst. Chemical Engineering Journal. 126:111-118.

SCHUGERL K, ROPER H, SIEBOLD M, JOPPIEN RM, RINDFLEISCH D.(1993) Comparison of the production of lactic acid by three different lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis. Process Biochemistry. 30:81-95.

SEVERSON D, BARRETT C. (1995) *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Bulgaricus* strain and fermentation process for producing L-(1)-lactic acid. US Patent (May 16);5,416,020.

SODERGARD A, STOLT M. (2002) Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. Prog. Polym Sci. 27: 1123-1163.

SOTO M. (2004) Estudio de la producción de biomasa en un cultivo de *Bacillus thuringensis* por medio de una metodología de alimentación fed-

batch continua. Proyecto de grado de ingeniería química. Universidad de los Andes. Pg: 14.

TAN T, DING S.(2006). L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*. 41: 1451–1454

VACCARI G, GONZALES A, CAMPI A, DOSI E, BRIGIDI P, MATTEUZZI D. (1993) Fermentative production of l-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM 20011 and product recovery using ion exchange resins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 40: 23-27.

VÁSQUEZ M, BUSTOS G, MOLDES A.B, ALONSO J.L.(2003) Optimization of d -lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiology*. 21: 143-148

VERINGA H. (1994). Procedure for the preparation of D-(-)-lactic acid with *Lactobacillus bulgaricus*. US Patent (Jun 21);US 5,322,781.

VOS W, HUGENHOLTZ J. (2004) Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *TRENDS in Biotechnology*. 22: 72-79.

WANG Q, XU Z, WANG P, CHENG G, JI Y, JIANG Z. (2007) Production of lactic acid from soybean stalk hydrolysate with *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*. 42: 89–92

WEE Y, KIM J, RYU H. (2006) Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technol. Biotechnol*. 44: 163-172.

WISCONSIN BIOREFINING DEVELOPMENT INITIATIVE (2006)

<http://www.wisbiorefine.org>. (Consultado en Noviembre de 2006).

YANG J, ZHANG Y, MA L. (2004) Kinetics of esterification of lactic acid with ethanol catalyzed by cation-exchange resins. *Reactive & Functional Polymers*. 61: 101-114.

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

ZACCHI G, AKERBERG C. (2000) An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technology*. 75: 119-126

ZHOU Y, HOLWILL I, TITCHENER-HOOKER. (1997) A study of the use of computer simulations for the design of integrated downstream processes. *Bioprocess Engineering*.16: 367–374.

ANEXO 1.

Determinación de azúcares reductores por el método del DNS

Reactivos: Ácido dinitrosalicílico al 1% (DNS), stock de glucosa de 0.4% (4 g/l)

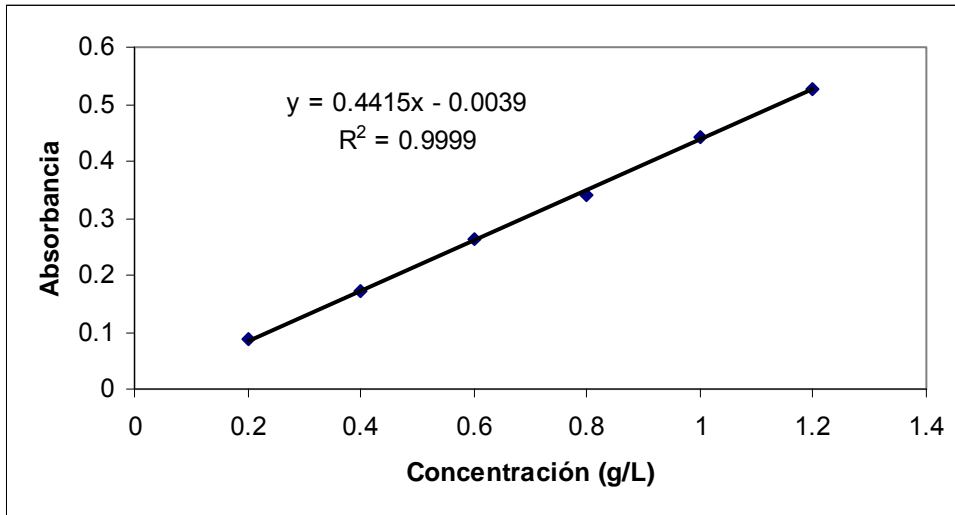
Procedimiento:

- Preparación de la curva de calibración

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa mil stock	0.0	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150
H2O destilada mil	0.500	0.475	0.450	0.425	0.400	0.375	0.350
Gr./l de glucosa	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

- Preparar en cada tubo (soluciones de curva patrón, las muestras problema diluida si es necesario y agua como blanco) 0.5 mL de solución en total
- Adicionar 0.5 mL del reactivo del DNS a cada tubo
- Agitar todos los tubos en Vortex.
- Llevar a ebullición por 5 min. en baño maría
- Enfriar hasta temperatura ambiente
- Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada y agitar en Vortex
- Dejar en reposo 15 min. y leer a 540 nm.
- Realizar la curva absorbancia vs. concentración.

Curva de Calibración DNS



Normativa:

- La curva de calibración debe ser comparable con la validada por el laboratorio, de lo contrario se debe repetir el ensayo corrigiendo las posibles fallas cometidas. (Verificar que el DNS esté en buen estado y que el stock de glucosa no esté vencido o fermentado)
- La ley de Beer-Lambert solo es aplicable a bajas concentraciones al elaborar la curva de calibración para garantizar la linealidad, por lo tanto las muestras deben ser diluidas adecuadamente para poder leerlas dentro de la curva sin necesidad de extrapolar. Los rangos de linealidad de las curvas de absorbancia vs concentración para el caso de la glucosa está entre 0.0-1.2 g/l.
- Se debe hacer una curva de calibración cada vez que se haga un ensayo.

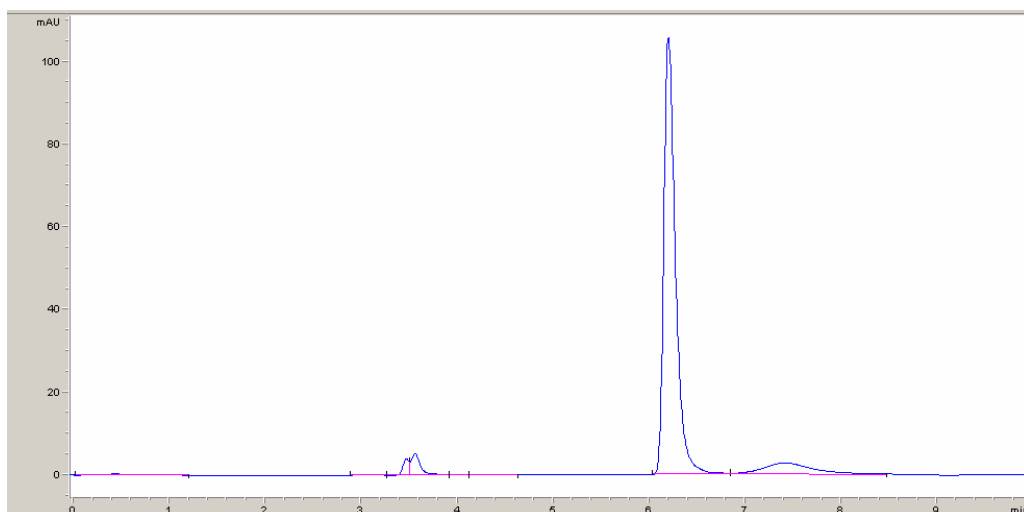
- Tanto la curva de calibración como las muestras se deben hacer por duplicado.
- Para muestras con altas concentraciones de azúcares reductores no es consistente la relación lineal entre absorbancia y concentración, por lo tanto las muestras deben ser diluidas según el contenido de azúcares; algunas diluciones pueden ser al 5%, 10% y 20%

ANEXO 2

Determinación de la concentración de ácido láctico

1. Preparar diluciones de ácido láctico con concentraciones conocida a partir de ácido láctico de alta pureza, que generalmente se encuentra en presentaciones del 88 al 99% de pureza. Las soluciones deben ser realizadas con agua grado HPLC.
2. Filtrar las soluciones por filtros de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0.3 μm .
3. Leer las muestras en el cromatógrafo, el equipo usado es un cromatógrafo líquido HPLC Agilent Technologies serie LC 1200 Series Quaternary a temperatura ambiente, en una columna C18, con ácido sulfúrico 0.01 M como fase móvil y con un flujo de 0.7 mL/min, se usó un detector de absorción ultravioleta a 210 nm, con un volumen de inyección de 10 μl .

Cromatograma ácido láctico.

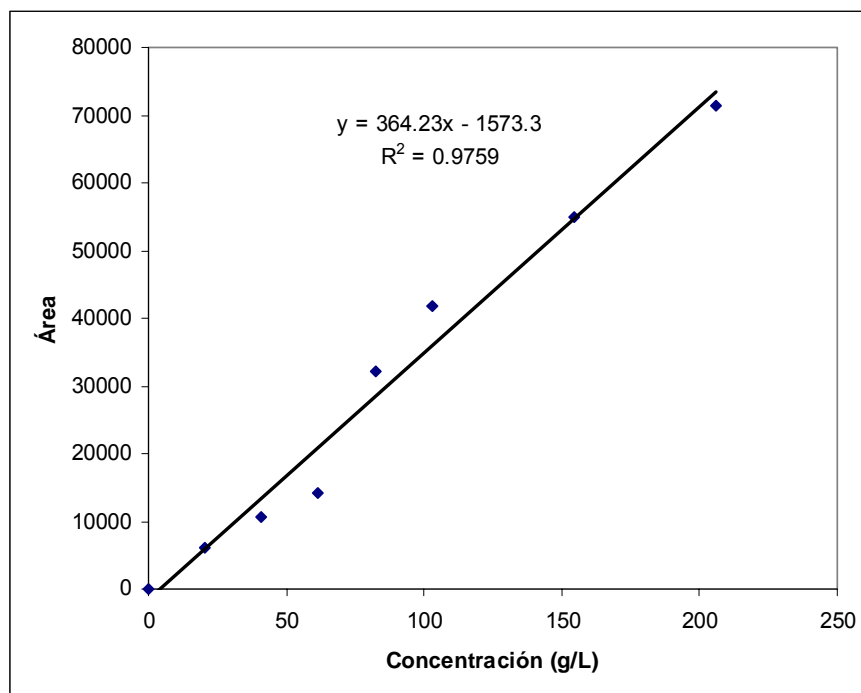


Realizar a partir del cromatograma, el gráfico de área de pico contra las concentraciones de las diluciones así:

Curva de calibración de ácido láctico

ÁREA	Concentración (g/L)
0	0
6201.5	20.57
10518.7	41.14
14108.2	61.71
32149.1	82.28
41765.1	102.85
54825.8	154.275
71341.2	205.7

Curva de calibración de ácido láctico.

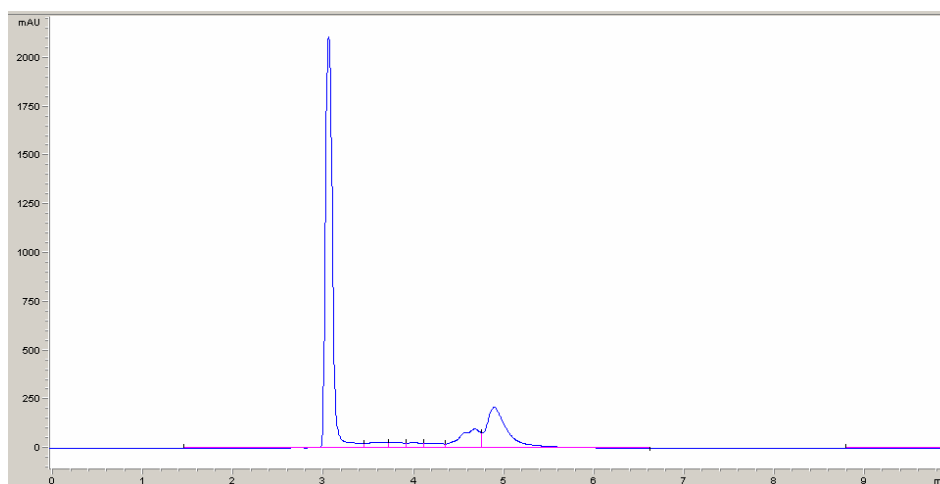


ANEXO 3

Determinación de la concentración de lactato de calcio.

1. Preparar una solución de ácido láctico con concentración conocida, a partir de ácido láctico de alta pureza, que generalmente se encuentra en presentaciones del 88 al 99% de pureza. Las soluciones deben ser realizadas con agua grado HPLC.
2. Mientras se agita, agregarle lentamente carbonato de calcio dándole tiempo de reaccionar y formar lactato de calcio. Realizar esta acción hasta que el carbonato de calcio no reaccione más.
3. Filtrar la solución obtenida en el paso anterior por un filtro de acetato de celulosa de 0.3 μm . y realizar diluciones de concentraciones conocidas para obtener los cromatogramas.

Cromatograma lactato de calcio. (Se observa los picos, a los 3.1 minutos el pico debido al lactato de calcio, y en 6 el causado por el ácido láctico)



4. Como se puede observar, aparte del pico a los 3.1 minutos debido al lactato de calcio, se observa a los 6 minutos uno característico

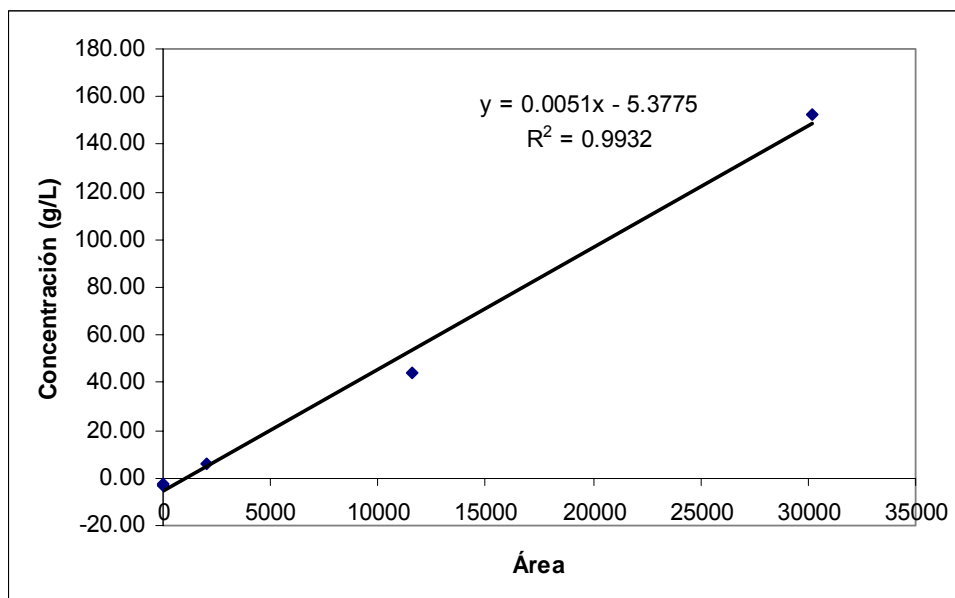
del ácido láctico. Debido a esto, se debe determinar en el cromatograma de la solución sin diluir, la concentración de ácido láctico presente en la muestra, y con este valor y con la concentración de la solución de ácido láctico preparada en el paso 1, determinar la concentración de lactato de calcio presente en cada una de las muestras diluidas.

- Realizar a partir del cromatograma, el gráfico de área de pico contra las concentraciones de las diluciones así:

Curva de calibración lactato de calcio.

Área	Concentración Lactato
30213.2	152.18
11582.7	44.05
2035.0	6.27
24.0	-2.70
26.8	-3.07

Curva de calibración lactato de calcio.



ANEXO 4

Datos de los parámetros medidos en las fermentaciones.

Cinética de la fermentación con una concentración de 37.5 g/L de carbonato de calcio en el agitador lineal.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0	0.16	100.5	13.3
4	0.16	99.5	15.1
8	0.17	99.6	15.2
13	0.17	99.6	17.8
22	0.34	97.7	20.9
27	0.76	93.0	29.1
32	1.43	83.0	37.8
37.5	1.90	74.8	45.1
46	2.31	59.8	54.5
51	2.48	49.0	61.4
56	2.67	45.4	69.4
62.5	2.75	40.7	75.0
70	2.85	36.0	83.7
75	2.83	35.9	86.4
80	2.80	36.1	89.5

Cinética de la fermentación con una concentración de 60 g/L de carbonato de calcio en el agitador lineal.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0	0.16	99.9	15.3
4	0.16	99.8	17.1
8	0.16	99.9	17.4
13	0.16	99.3	17.4
22	0.16	98.2	16.7
27	0.25	97.5	25.2
32	0.38	94.3	34.6
37.5	0.64	90.3	44.9
46	1.15	73.8	55.4
51	1.72	63.9	60.4
56	2.08	58.7	63.6
62.5	2.35	54.3	72.9
70	2.50	53.5	81.9
75	2.50	51.8	90.6
80	2.50	51.8	90.6

Cinética de la fermentación con una concentración de 15g/L de carbonato de calcio en el agitador lineal.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0	0.17	98.2	14.7
4	0.17	98.2	14.5
8	0.17	98.2	15.2
13	0.28	96.7	22.3
22	0.70	91.9	51.8
27	0.94	86.1	63.4
32	1.17	81.5	70.0
37.5	1.35	71.6	78.3
46	1.58	61.0	82.6
51	1.92	51.4	85.4
56	2.33	51.4	88.4
62.5	2.55	49.4	93.8
70	2.68	47.7	94.7
75	2.49	47.7	98.8
80	2.49	47.7	99.3

Cinética de Fermentación batch en biorreactor.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0	0.3	96.1	30.0
6	1.4	90.4	31.8
13	3.0	77.0	63.0
18	3.6	64.6	90.8
23	4.0	55.1	105.2
27	4.3	52.7	107.7
37	4.0	50.6	115.5
42	3.5	51.7	115.6
47	3.1	52.3	119.4
51	2.8	53.3	118.9

Cinética de la fermentación fed-batch 1.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0.0	1.2	106.7	37.7
3.0	1.2	101.4	46.4
7.0	1.6	73.2	63.9
16.0	2.8	60.1	88.3
21.0	3.4	50.6	101.3
26.0	4.2	51.2	103.8
26.5	4.4	50.1	105.8
27.0	4.4	49.3	107.8
27.5	4.6	69.9	111.6
28.0	4.6	72.1	114.2
28.5	4.7	81.1	113.0
29.0	4.7	97.7	114.1
30.0	4.9	108.1	112.3
31.0	5.0	128.7	103.5
33.0	5.3	174.2	100.3
35.0	5.5	226.1	94.3
37.0	5.6	249.7	85.3
39.0	5.8	277.7	80.9
40.5	6.0	283.9	81.5
42.5	6.1	283.9	81.5
45.5	6.6	283.9	81.5
50.0	6.8	283.9	81.5
55.0	6.5	280.5	81.5
64.0	6.2	244.5	82.7

Nota: los datos que se encuentran con negrita se refieren a los puntos dentro de tiempo de alimentación fed-batch.

Cinética de la fermentación fed-batch 2.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0	1.053	93.0	24.4
3	1.440	88.8	30.1
7	1.957	83.9	40.7
12	2.687	72.1	67.7
21	3.698	56.9	90.8
25	4.429	56.1	99.6
27	4.794	53.7	105.1
28	5.031	51.6	106.0
29	4.880	54.0	102.3
30	4.623	56.9	99.6
31	4.386	62.0	97.1
33.5	3.698	68.4	90.8
36	3.397	69.9	84.6
38	3.117	72.3	80.3
40	2.730	72.3	79.0
42	2.473	71.7	75.8
44	2.451	71.4	76.7
46	2.343	69.6	75.2
48	2.365	61.7	76.7
50	2.257	57.2	73.8
52	2.300	55.8	77.8
55	2.387	55.8	80.3
59	2.365	54.6	81.9
68	2.552	54.5	86.5
72	2.817	53.3	94.0
73	3.182	54.6	92.9

Cinética de la fermentación fed-batch 3.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)
0	0.687	93.3	25.0
3	0.775	92.3	29.4
7	0.925	93.8	50.4
11	1.412	76.5	74.3
20	2.725	58.1	103.1
25	3.725	47.6	107.1
27	4.212	45.9	109.5
30	4.240	44.6	109.3
35	4.188	46.3	109.0
44	4.050	48.8	108.2
49	3.975	47.8	109.5
54	3.850	48.8	105.7
59	3.700	52.5	103.6
68	3.075	52.4	101.1
73	2.688	52.9	100.4
78	2.375	57.5	100.6
83	2.125	58.5	97.8
92	1.975	59.3	95.7
97	1.950	57.6	94.9
99	1.963	59.0	94.9
102	1.938	55.7	94.9
107	1.975	56.5	94.9
116	1.979	50.9	97.7
123	1.975	48.8	100.1

ANEXO 5

Análisis Estadísticos

Tabla ANOVA para la concentración de ácido láctico obtenida con diferentes concentraciones de CaCO₃.

ANOVA Table for AL by C_01					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	45.13	2	22.565	1.04	0.4531
Within groups	64.925	3	21.6417		
Total (Corr.)	110.055	5			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of AL into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 1.04266, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean AL from one level of C_01 to another at the 95.0% confidence level.

Tabla ANOVA para el rendimiento observado de sustrato en producto obtenido con diferentes concentraciones de CaCO₃.

ANOVA Table for Yps by C_01					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.12893	2	0.564467	1.86	0.2979
Within groups	0.909	3	0.303		
Total (Corr.)	2.03793	5			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Yps into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 1.86293, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Yps from one level of C_01 to another at the 95.0% confidence level.

Tabla ANOVA para la productividad volumétrica obtenido con diferentes concentraciones de CaCO₃

ANOVA Table for Q by C_01					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.00333333	2	0.00166667	0.20	0.8288
Within groups	0.025	3	0.00833333		
Total (Corr.)	0.0283333	5			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Q into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 0.2, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the mean Q from one level of C_01 to another at the 95.0% confidence level.

Tabla ANOVA para la concentración de ácido láctico obtenida al final de cada fermentación

ANOVA Table for Col_2 by Col_1					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1726.76	3	575.587	28779.33	0.0000
Within groups	0.08	4	0.02		
Total (Corr.)	1726.84	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Col_2 into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 28779.3, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Col_2 from one level of Col_1 to another at the 95.0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Tabla ANOVA para el rendimiento observado de sustrato en producto al final de cada fermentación.

ANOVA Table for Col_2 by Col_1					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.86495	3	1.28832	6441.58	0.0000
Within groups	0.0008	4	0.0002		
Total (Corr.)	3.86575	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Col_2 into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 6441.58, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Col_2 from one level of Col_1 to another at the 95.0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Análisis de Rangos múltiples para la concentración de ácido láctico obtenida al final de cada fermentación

Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1

Method: 95.0 percent LSD

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
Fed-Batch 1	2	82.6	X
Fed-Batch 2	2	92.9	X
Fed-Batch 3	2	100.3	X
Batch	2	122.6	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Batch - Fed-Batch 1	*40.0	0.39265
Batch - Fed-Batch 2	*29.7	0.39265
Batch - Fed-Batch 3	*22.3	0.39265
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 2	*-10.3	0.39265
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 3	*-17.7	0.39265
Fed-Batch 2 - Fed-Batch 3	*-7.4	0.39265

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 6 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 4 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

Análisis de Rangos múltiples para el rendimiento observado de sustrato en producto al final de cada fermentación.

Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1			

Method: 95.0 percent LSD			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups

Fed-Batch 1	2	0.78	X
Fed-Batch 3	2	1.95	X
Fed-Batch 2	2	2.05	X
Batch	2	2.71	X

Contrast		Difference	+/- Limits

Batch - Fed-Batch 1		*1.93	0.039265
Batch - Fed-Batch 2		*0.66	0.039265
Batch - Fed-Batch 3		*0.76	0.039265
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 2		*-1.27	0.039265
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 3		*-1.17	0.039265
Fed-Batch 2 - Fed-Batch 3		*0.1	0.039265

* denotes a statistically significant difference.			
The StatAdvisor			

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 6 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 4 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.			

Tabla ANOVA para las productividades volumétricas al final de cada fermentación.

ANOVA Table for Col_2 by Col_1					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.778	3	0.926	974.74	0.0000
Within groups	0.0038	4	0.00095		
Total (Corr.)	2.7818	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Col_2 into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 974.737, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Col_2 from one level of Col_1 to another at the 95.0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Tabla ANOVA para los gramos de ácido láctico obtenidos al final de cada fermentación.

ANOVA Table for Col_2 by Col_1					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4225.1	3	1408.37	70418.25	0.0000
Within groups	0.08	4	0.02		
Total (Corr.)	4225.18	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of Col_2 into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 70418.3, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean Col_2 from one level of Col_1 to another at the 95.0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Análisis de Rangos múltiples para las productividades volumétricas al final de cada fermentación.

Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1			

Method: 95.0 percent LSD			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups

Fed-Batch 3	2	0.81	X
Fed-Batch 2	2	1.22	X
Fed-Batch 1	2	1.29	X
Batch	2	2.4	X

Contrast		Difference	+/- Limits

Batch - Fed-Batch 1		*1.11	0.085576
Batch - Fed-Batch 2		*1.18	0.085576
Batch - Fed-Batch 3		*1.59	0.085576
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 2		0.07	0.085576
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 3		*0.48	0.085576
Fed-Batch 2 - Fed-Batch 3		*0.41	0.085576

* denotes a statistically significant difference.			
The StatAdvisor			

<p>This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 5 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 3 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.</p>			

Análisis de Rangos múltiples para los gramos de ácido láctico obtenidos al final de cada fermentación.

Multiple Range Tests for Col_2 by Col_1			

Method: 95.0 percent LSD			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups

Batch	2	245.2	X
Fed-Batch 1	2	248.1	X
Fed-Batch 2	2	278.7	X
Fed-Batch 3	2	300.9	X

Contrast		Difference	+/- Limits

Batch - Fed-Batch 1		*-2.9	0.39265
Batch - Fed-Batch 2		*-33.5	0.39265
Batch - Fed-Batch 3		*-55.7	0.39265
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 2		*-30.6	0.39265
Fed-Batch 1 - Fed-Batch 3		*-52.8	0.39265
Fed-Batch 2 - Fed-Batch 3		*-22.2	0.39265

* denotes a statistically significant difference.			
The StatAdvisor			

<p>This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 6 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 4 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.</p>			