



# Producción de ácido láctico a partir de suero de queso utilizando consorcios microbianos

Inés Etchelet

Orientadora: Claudia Etchebehere

Directora académica: Elena Castelló

Co-orientador/a: Antônio Djalma N. Ferraz Júnior y Laura Fuentes

Tribunal:

Karina Antunez, Gabriela Garmendia, Verónica Saravia

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Laboratorio de Ecología  
Microbiana

2023

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Claudia por darme la oportunidad de ser parte del grupo de trabajo y por guiarme durante todo el proceso siempre con la mejor disposición. También agradecer a mis tutores Djalma y Laura por su guía y apoyo a lo largo de todo el camino. Su experiencia y gran disposición fueron fundamentales, por lo que estoy muy agradecida. Además, quiero agradecer a Elena y a los integrantes del Laboratorio BioProa de la Facultad de Ingeniería por sus aportes al trabajo.

También quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio. Compartir con ellos fue un placer e hicieron que el día a día en el laboratorio fuera tan lindo y divertido, estando siempre presentes y dando una mano sin dudarlos cada vez que necesité.

Quiero agradecer a la quesería Rostán, que con la mejor disposición nos proporcionaron el suero de queso, haciendo posible este trabajo.

También agradecer a la ANII y la CAP por las becas de maestría, las cuáles fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

Por último, pero no menos importante, agradecer a mi familia y amigos, quienes me acompañaron y apoyaron durante todo el camino, siempre con palabras de aliento y contención. Su compañía fue fundamental en esta experiencia tan relevante para mí, tanto académica como personalmente.

Estoy enormemente agradecida con todas las personas que de diferentes formas formaron parte de este trabajo, haciendo que sea una de las experiencias más enriquecedoras que he vivido.

Muchas gracias!

## Resumen

El ácido láctico tiene una amplia variedad de aplicaciones, siendo actualmente producido por fermentación microbiana a partir de azúcares puros provenientes de cultivos comestibles, como maíz, lo que impacta en su costo de producción y lo que puede representar una competencia del suministro de alimentos. El uso de sustratos alternativos para la producción biológica de ácido láctico ha atraído gran atención, como el suero de queso, residuo que se genera durante la producción de queso en grandes cantidades y que presenta una gran disponibilidad de lactosa y otros nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos. El objetivo general de este trabajo es conocer las mejores condiciones para maximizar la producción fermentativa de ácido láctico utilizando suero de queso crudo como sustrato y comunidades microbianas obtenidas del mismo suero como inóculo.

A través de un Diseño Central Compuesto y ensayos en batch se evaluó el efecto sobre la producción de ácido láctico del pH inicial y la concentración de inóculo. Ambas variables tuvieron un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico. La concentración y el rendimiento máximos de ácido láctico (20,1 g/L y 1,3 mol de ácido láctico/mol lactosa) se obtuvieron en presencia de buffer, a pH inicial 7 y 5% de inóculo. La comunidad microbiana estuvo dominada por *Lactococcus*, con una abundancia relativa de aproximadamente 70%. En base a estos resultados, se evaluó la producción de ácido láctico a partir de suero de queso crudo pero en una fermentación semicontinua. La concentración y el rendimiento de ácido láctico máximos fueron:  $32,7 \pm 11,7$  g/L y  $2,5 \pm 0,9$  mol de ácido láctico/mol lactosa disponible respectivamente. El proceso fue reproducible y tuvo la capacidad de recuperarse ante perturbaciones. La comunidad estuvo dominada por el género *Lactobacillus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan al desarrollo de un proceso de producción de ácido láctico alternativo, operado a base de un residuo industrial y en condiciones que representan ventajas tanto técnicas como económicas, respondiendo a las necesidades actuales de producción. Esta tecnología además tiene el potencial de aplicarse a nivel local, ya que el suero de queso es un residuo generado en grandes cantidades en nuestro país.

# Índice

<b>Introducción</b> .....	6
Ácido láctico .....	6
Aplicaciones del ácido láctico .....	6
Producción de ácido láctico .....	8
Producción biológica de ácido láctico .....	9
Sustratos para la producción biológica de ácido láctico .....	9
Suero de queso como sustrato para la producción de ácido láctico .....	10
Microorganismos involucrados en la producción biológica de ácido láctico: bacterias ácido lácticas .....	13
Metabolismo fermentativo de las bacterias ácido lácticas .....	14
Fermentación de la lactosa .....	18
Respiración en bacterias ácido lácticas .....	20
Otras bacterias productoras de ácido láctico .....	21
Bacterias que consumen ácido láctico .....	22
Cultivos puros vs. cultivos mixtos .....	22
Parámetros que influyen sobre la producción biológica de ácido láctico .....	23
pH .....	23
Concentración de inóculo y relación alimento/microorganismos .....	24
Régimen del proceso de fermentación .....	25
Producción de ácido láctico en el contexto de biorrefinería .....	27
Antecedentes del trabajo .....	27
<b>Objetivos</b> .....	29
<u>Capítulo I: Ensayo de fermentación en batch</u> .....	30
<b>Materiales y métodos</b> .....	30
Sustrato: suero de queso .....	30
Inóculo: suero de queso fermentado .....	30
Diseño experimental .....	31
Ensayos de fermentación .....	33

Cálculos y métodos analíticos .....	34
Análisis de la comunidad microbiana .....	35
<b>Resultados y discusión</b> .....	36
Producción de ácido láctico .....	36
Producción de ácidos grasos volátiles y etanol .....	48
Efecto de las condiciones operacionales sobre la producción de ácido láctico ...	49
Análisis de la comunidad microbiana .....	54
<b>Conclusiones</b> .....	61
<u>Capítulo II: Ensayo de fermentación semicontinua</u> .....	63
<b>Materiales y métodos</b> .....	63
Sustrato: suero de queso .....	63
Inóculo: suero de queso fermentado .....	63
Ensayos de fermentación .....	64
Cálculos y métodos analíticos .....	66
Análisis de la comunidad microbiana .....	67
<b>Resultados y discusión</b> .....	67
Producción de ácido láctico .....	67
Producción de ácidos grasos volátiles y etanol .....	77
Producción de biogás .....	78
Análisis de la comunidad microbiana .....	79
<b>Conclusiones</b> .....	83
<b>Conclusiones generales y perspectivas</b> .....	84
<b>Bibliografía</b> .....	88
<b>Anexos</b> .....	103
Trabajos presentados en congresos .....	107
Artículos científicos .....	107

# Introducción

## Ácido láctico

El ácido láctico, o ácido 2-hidroxi-propanoico, es un ácido ampliamente distribuido en la naturaleza (Holten, 1971). Tiene un átomo de carbono quiral presentándose en dos formas enantioméricas: ácido D y L- láctico (Holten, 1971). Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele a partir de leche agria. Luego, en 1789 Lavoisier le atribuyó el nombre “acide lactique”, pero no fue hasta 1857 que Pasteur descubrió que el ácido láctico era un producto de fermentación de algunos microorganismos. Su primera producción industrial biotecnológica comenzó en 1881 y desde ese entonces el ácido láctico ha encontrado diversas aplicaciones (Holten, 1971).

## Aplicaciones del ácido láctico

El ácido láctico tiene un amplio espectro de aplicaciones, ya que se utiliza en la industria alimenticia, química, cosmética, textil, del cuero, de la medicina, farmacéutica y del plástico (figura 1) (Abedi & Hashemi, 2020; Komesu et al., 2017).

En la industria alimenticia se utiliza como conservante, saborizante, regulador de pH, para aumentar la vida útil de los alimentos y para el control de patógenos, entre otras aplicaciones (Krishna et al., 2018). En la industria farmacéutica y en la medicina, se utiliza como electrolito en diversas soluciones parenterales/intravenosas, también en preparaciones minerales, tabletas, prótesis, sistemas de administración controlada de medicamentos, suturas quirúrgicas y en la preparación de soluciones de diálisis (Krishna et al., 2018). En la industria química, el ácido láctico se utiliza como neutralizador, agente de limpieza, agente desincrustante, regulador de pH y agente antimicrobiano. Debido a la presencia de dos grupos funcionales reactivos (grupo carboxílico y grupo hidroxilo) el ácido láctico puede sufrir una variedad de reacciones químicas produciendo otras sustancias químicas útiles, como óxido de propileno, acetaldehído, ácido acrílico y ácido propanoico (Krishna et al., 2018). En el área del cuidado de la piel y la industria cosmética, el ácido láctico actúa como humectante, agente antiacné, hidratante,

agente antisarro, regulador de pH, agente aclarador y rejuvenecedor de la piel (Krishna et al., 2018).

Además, el ácido láctico ha recibido gran atención como precursor para la síntesis de ácido poliláctico (PLA), un polímero biodegradable que puede reemplazar al plástico producido a partir de recursos fósiles (Singhvi et al., 2019). Actualmente el PLA es ampliamente utilizado como material de *packaging* (Klotz et al., 2016). Sin embargo, junto con la creciente demanda, el aumento del precio del ácido láctico es una de las principales preocupaciones para producir PLA comercialmente viable (Juturu & Wu, 2016).

Para algunas industrias es indiferente la naturaleza óptica del ácido láctico. Sin embargo, otras lo requieren de forma ópticamente pura. Por ejemplo, para su uso como precursor del PLA, el ácido láctico debe estar en su forma ópticamente pura, ya sea su isómero D o L, debido a que el polímero formado por la mezcla racémica (cantidades equimolares de ambos isómeros) resulta en un material amorfo (Juturu & Wu, 2016; Klotz et al., 2016). Otro ejemplo es el de la industria alimenticia y farmacéutica, las cuales requieren el ácido L-láctico ópticamente puro (Klotz et al., 2016), debido a que el cuerpo humano no es capaz de metabolizar el isómero D (Pohanka, 2020).



Figura 1. Aplicaciones del ácido láctico en la industria.

## Producción de ácido láctico

El ácido láctico puede ser producido por síntesis química o biológica mediante fermentación microbiana (figura 2) (Oh et al., 2005). La síntesis química de ácido láctico implica un primer paso en donde el acetaldehído reacciona con cianuro de hidrógeno en medio básico y a alta presión para formar lactonitrilo. Luego el lactonitrilo es recuperado por destilación e hidrolizado en medio ácido haciendo uso de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, produciéndose ácido láctico y una sal de amonio como subproducto (Rawoof et al., 2021). Es decir que la producción química de ácido láctico se basa en el uso de materias primas de origen petroquímico (Wang et al., 2015), lo que representa una gran desventaja. Además, la síntesis química siempre resulta en una mezcla racémica de ácido láctico, lo cual no es deseable para su uso en varias industrias (Hofvendahl & Hahn–Hägerdal, 2000; Jem et al., 2009). En cambio, la producción biológica de ácido láctico presenta varias ventajas frente a la producción química, como el uso de sustratos baratos (por ejemplo residuos), bajas temperaturas de producción, bajo consumo de energía y producción de ácido D o L láctico ópticamente puro (cuando el proceso ocurre por intermedio de cultivos puros) (Abdel-Rahman et al., 2013; Juturu & Wu, 2016). La producción fermentativa de ácido láctico, al ser un proceso biológico, está influenciada por varios factores, tales como la temperatura, la fuente de carbono y nitrógeno, el modo de fermentación, el pH y la concentración de inóculo (Ferraz et al., 2021; Hofvendahl & Hahn–Hägerdal, 2000; Mussatto et al., 2008). El estudio del efecto de estas condiciones es necesario para lograr una mayor producción de ácido láctico (Mussatto et al., 2008).

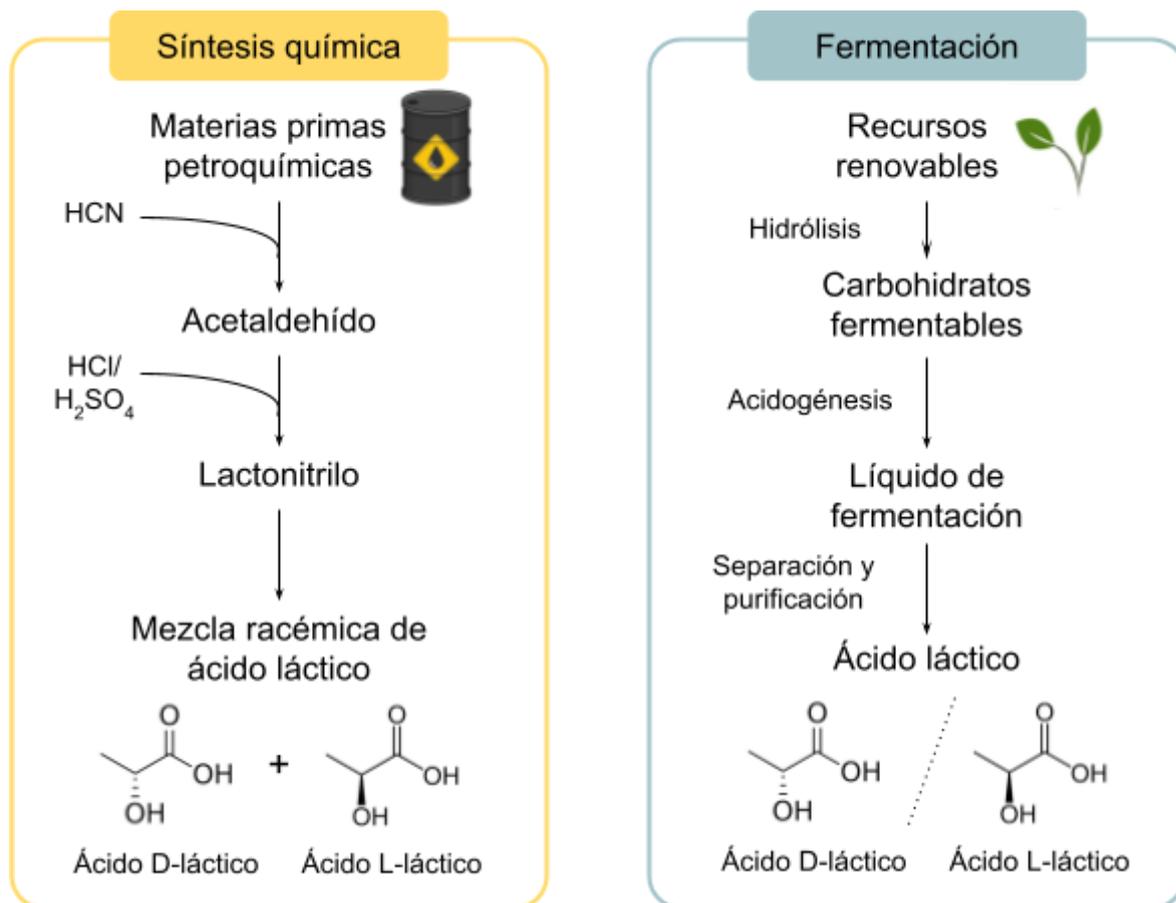


Figura 2. Vías de producción de ácido láctico: síntesis química o fermentación microbiana.

## Producción biológica de ácido láctico

### Sustratos para la producción biológica de ácido láctico

Actualmente el ácido láctico es principalmente producido mediante fermentación microbiana a partir de azúcares puros provenientes de cultivos comestibles, como maíz (Abdel-Rahman et al., 2013). El uso de este tipo de materias primas es ventajoso a la hora de obtener ácido láctico puro y recuperarlo, y también para evitar el proceso de pretratamiento del sustrato (Abdel-Rahman et al., 2013). Sin embargo, su uso representa uno de los mayores costos de producción del ácido láctico y además puede convertirse en competencia del suministro de alimentos (Alves de Oliveira et al., 2018; Juturu & Wu, 2016; M. Singhvi et al., 2018). Como consecuencia, el uso de residuos como fuente de carbono alternativa ha atraído gran atención para la producción de ácido láctico, ya que son materiales

abundantes, no destinados a la alimentación y muchas veces renovables y más económicos (Singhvi et al., 2018). De hecho, ya se ha estudiado una gran variedad de residuos agro industriales y diferentes fuentes de biomasa para obtener ácido láctico a través de su fermentación (tabla 1). Entre ellos se encuentran residuos como cáscara de papa, yerba mate, suero de queso, glicerol, residuos sólidos orgánicos municipales, biomasa algal, biomasa lignocelulósica, entre muchos otros (Cheah et al., 2022; Choubisa et al., 2012; Ferraz et al., 2021; Liang et al., 2014; Ouyang et al., 2013; Probst et al., 2015).

Tabla 1. Residuos orgánicos utilizados como sustrato para la producción fermentativa de ácido láctico.

Sustrato	Inóculo	[AL]* (g/L)	Referencia
Biomasa algal	<i>Lactobacillus casei</i>	11,0	Overbeck et al., 2016
Glicerol	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4,37	Choubisa et al., 2012
Suero de queso y yerba mate	Compost	12,6	Ferraz et al., 2021
Cáscara de papa	Lodo activado	14,7	Liang et al., 2014
Suero de queso en polvo	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	113,2	Ouyang et al., 2013
Bagazo de yuca	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Bacillus coagulans</i>	112,5	Chen et al., 2020
Desechos de frutas y vegetales	Lodo anaerobio	20,0	Wu et al., 2015
Salvado de arroz	<i>Bacillus coagulans</i>	117,0	Wang et al., 2015

\*[AL] Concentración de ácido láctico

#### *Suero de queso como sustrato para la producción de ácido láctico*

El suero de queso es el residuo líquido que se genera durante la producción de queso. Aproximadamente 85% de la leche utilizada para producir queso es descartada como suero (Panesar et al., 2007). El suero retiene alrededor del 55%

de los nutrientes de la leche y está compuesto principalmente por lactosa (70%), proteínas funcionales y péptidos (14%), lípidos, minerales y vitaminas (Božanić et al., 2014; Guimarães et al., 2010; P. Panesar et al., 2007). Se estima que la producción de suero de queso es 9 veces la producción de queso, resultando en una producción aproximada de 190.000 millones de litros por año, con una tasa de crecimiento anual del 1-2% (Asunis et al., 2020; Guimarães et al., 2010). En Uruguay, se produjeron aproximadamente 625 millones de litros de suero de queso en 2012 (sin incluir las queserías artesanales) (Muset and Castells, 2017). Considerando un crecimiento anual de 1,5%, el volumen estimado de suero de queso producido en el año 2019 en Uruguay (pre pandemia) fue de 693 millones de litros.

Históricamente el suero se ha considerado un desecho de poco valor (Smithers, 2008). En el pasado, las industrias lácteas eligieron los métodos más baratos para su disposición, como rociarlo en los campos, verterlo en cuerpos de agua o en el sistema de alcantarillado municipal o venderlo a un bajo costo como alimento para animales (Smithers, 2008). El vertido del suero no solo representa una pérdida potencial de alimento y energía, sino también un importante problema ambiental debido a su alto contenido de materia orgánica y los grandes volúmenes en los que se produce (Guimarães et al., 2010). Actualmente, el suero es considerado una materia prima más valiosa y preciada (Smithers, 2008). Sin embargo, a pesar de que gran parte del suero producido hoy en día es procesado en diferentes productos, todavía existe un porcentaje que es utilizado como se mencionó anteriormente (Božanić et al., 2014). La disponibilidad de lactosa y otros nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos hacen del suero una materia prima potencial para la producción biológica de ácido láctico (Panesar et al., 2007).

Existen numerosos reportes del uso de suero de queso como sustrato para la producción de ácido láctico (González et al., 2007; Luongo et al., 2019; Panesar et al., 2007; Panesar et al., 2010; Soriano-Perez et al., 2012; Tango & Ghaly, 1999) (tabla 2), así como también para la producción de otros productos de interés o fuentes de energía como hidrógeno o metano (Akhlaghi et al., 2017; Castelló et al., 2011; Ferraz et al., 2021; Gomes et al., 2015), lo que refleja un interés mundial de aprovechar y valorizar este residuo con gran capacidad para los procesos fermentativos.

Es importante destacar que, en general, en los trabajos sobre producción de ácido láctico a partir de suero de queso no se utiliza el suero de queso crudo, es decir, en la forma en la que se obtiene como efluente en una quesería, sino que es frecuente el uso de suero de queso en polvo reconstituido o suero de queso desproteínizado y suplementado con nutrientes, tales como extracto de levadura, sulfato de manganeso, sulfato de magnesio, carbonato de calcio, peptona, entre otros (Panesar et al., 2007; Roukas & Kotzekidou, 1998). El proceso de desproteínizado implica calentar el suero a 90°C para precipitar las proteínas y luego removerlas mediante centrifugación (Roukas & Kotzekidou, 1998; Panesar et al., 2007). En otros casos, el suero de queso se hidroliza con enzimas dirigidas tanto hacia la lactosa, para disponibilizar la glucosa y galactosa, como hacia las proteínas, para que actúen como fuente de nitrógeno. Todos estos procesos de desproteínización, suplementación de nutrientes e hidrólisis implican una inversión de tiempo y energía, por lo que podrían complejizar y aumentar el costo del proceso de producción de ácido láctico.

Tabla 2. Estudios de producción de ácido láctico a partir de suero de queso.

Inóculo	Sustrato	Temp. a	pH	Reactor	[AL] b	Ref.
<i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L.</i> <i>bulgaricus</i> , <i>S.</i> <i>thermophilus</i>	Suero de queso hidrolizado	42	5,6	Batch	28,0	Lund et al., 1992
<i>L. casei</i> inmovilizado	Suero desproteínizado y suplementado	37-40	6,5	-	33,0	Panesar et al., 2007
<i>L. casei</i>	Suero desproteínizado y suplementado		6,5	Batch	33,7	Panesar et al., 2010
<i>L. casei</i> y <i>L.</i> <i>lactis</i> inmovilizados	Suero desproteínizado y suplementado	32	6	Batch alimentado	46,0	Roukas & Kotzekid ou, 1998
<i>L. casei</i> y <i>L.</i> <i>lactis</i> inmovilizados	Suero desproteínizado y suplementado	32	6,5	Contínuo	25,0	Roukas & Kotzekid ou, 1996

<i>L. helveticus</i>	Suero de queso esterilizado	45	5,9	Batch	53,0	Soriano-Perez et al., 2012
<i>L. bulgaricus</i>	Suero de queso desproteínizado, hidrolizado y con extracto de levadura	42	-	Batch	24,3	Taleghani et al., 2016
<i>L. helveticus</i>	Suero de queso pasteurizado	42	-	Batch	10,0	Tango & Ghaly, 1999
Digestato anaerobio pre tratado térmicamente	Suero de queso crudo	35	-	Semicontinuo	20,1	Luongo et al., 2019
Lodo anaerobio	Suero de queso diluido	55	5,5	Continuo	5,7	Choi et al., 2016
<i>L. bulgaricus</i>	Suero de queso en polvo hidrolizado	42	6,5 (inicial)	Batch alimentado	113,2	Liu et al., 2018
<i>K. marxianus</i> , <i>L. helveticus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Suero de queso sintético	37	6,6 (inicial)	Batch	19,8	Plessas et al., 2008

<sup>a</sup> Temperatura (°C), <sup>b</sup> concentración de ácido láctico (g/L).

Microorganismos involucrados en la producción biológica de ácido láctico: bacterias ácido lácticas

Un amplio espectro de microorganismos es capaz de producir ácido láctico: bacterias, hongos, microalgas y cianobacterias (Juturu & Wu, 2016). Entre las bacterias se destacan las ácido lácticas, bacterias gram positivas pertenecientes al orden Lactobacillales que producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de los carbohidratos (Juturu & Wu, 2016; Sikora et al., 2013). Estas son las más comúnmente explotadas para la producción de ácido láctico (Krishna et al., 2018).

Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por su alta tolerancia a valores de pH bajos, pudiendo sobrevivir en ambientes con pH 5 o menor. Esta tolerancia representa una ventaja competitiva frente a otras bacterias que no toleran valores de pH ácidos (Hofvendahl & Hahn–Hägerdal, 2000). Las bacterias ácido lácticas también se caracterizan por sus requerimientos nutricionales complejos de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables (Sakai et al., 2006). Por causa de su capacidad limitada de biosíntesis de aminoácidos, la presencia de una fuente de aminoácidos es crucial para su crecimiento (Asunis et al., 2020). Debido a su alto contenido de proteínas y péptidos, el suero de queso es una buena opción como sustrato para la producción de ácido láctico, pudiendo evitar a través de su uso la costosa adición de una fuente de nitrógeno externa (Asunis et al., 2020).

#### *Metabolismo fermentativo de las bacterias ácido lácticas*

Las bacterias ácido lácticas pueden clasificarse como homofermentativas y heterofermentativas en base a los productos finales del metabolismo fermentativo de los carbohidratos (Kandler, 1983).

Las bacterias lácticas homofermentativas producen ácido láctico como único producto de fermentación de la glucosa (Castillo Martinez et al., 2013) (reacción 1).



La glucosa se transforma en ácido pirúvico a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, también conocida como glucólisis) y luego el ácido pirúvico se reduce a ácido láctico a través de la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (figura 3a) (Castillo Martinez et al., 2013; Mayo et al., 2010). La glucosa-6-P isomerasa, la fosfofructoquinasa y la fructosa bisfosfato aldolasa son enzimas clave en la vía EMP (Eiteman & Ramalingam, 2015). El rendimiento teórico máximo de ácido láctico a partir de glucosa exclusivamente a través de la vía EMP es de 2 mol de lactato por mol de glucosa (1 g/g) (Eiteman & Ramalingam, 2015; Wang et al., 2015).

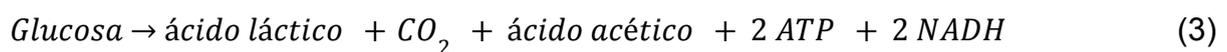
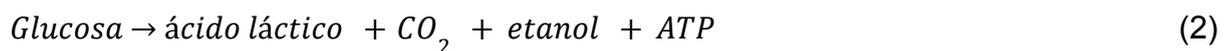
Algunas especies de bacterias lácticas pueden consumir pentosas de forma homofermentativa a través de la vía de las pentosas fosfato (PP) (figura 3c) (Wang et al., 2015). La fructosa-6-P generada por la vía PP finalmente se convierte en

gliceraldehído-3-P (GAP) por la vía EMP (Eiteman & Ramalingam, 2015). Las enzimas clave en la vía de la PP son la transaldolasa y la transcetolasa (Eiteman & Ramalingam, 2015). El rendimiento teórico de ácido láctico a partir de pentosas a través de la ruta PP es de 1,67 mol de lactato por mol de pentosa (1 g/g) (Wang et al., 2015).

Bajo ciertas condiciones el metabolismo homoláctico puede cambiar a un metabolismo heteroláctico. Este tipo de fermentación se caracteriza por la producción de formiato, acetato, etanol y/o CO<sub>2</sub> en adición al ácido láctico (Mayo et al., 2010). El cambio de metabolismo puede estar dirigido por cambios bioquímicos, regulación por cambios alostéricos en enzimas, niveles de metabolitos, transcritos y proteínas y factores ambientales como el oxígeno, temperatura, pH y disponibilidad del sustrato (Mayo et al., 2010).

Ejemplos de bacterias ácido lácticas homofermentativas son algunas especies de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. pentosus* y *L. plantarum*) (Spector, 2009).

Por otro lado, las bacterias lácticas heterofermentativas producen CO<sub>2</sub>, etanol y/o ácido acético además del ácido láctico (reacciones 2 y 3) (Castillo Martinez et al., 2013).



Dentro de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas se encuentran especies de los géneros *Leuconostoc* (ejemplo, *L. mesenteroides*), *Lactobacillus* (como *L. brevis*, *L. lysopersici* y *L. pentoaceticus*), *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Pediococcus* (Spector, 2009).

La glucosa se metaboliza a través de la vía de la fosfocetolasa (PK), en la que la glucosa 6-fosfato se convierte inicialmente en ribulosa 5-fosfato y CO<sub>2</sub> (Mayo et al., 2010). Luego, la xilulosa 5-P resultante de la ribulosa 5-fosfato se escinde en una cantidad equimolar de GAP y acetil-P (Mayo et al., 2010). Mientras que el GAP ingresa a la vía EMP para formar ácido láctico, el acetil-P se reduce a etanol o se convierte en acetato (figura 3b) (Mayo et al., 2010). La proporción de etanol y

acetato depende del potencial redox de las células (Mayo et al., 2010). La enzima clave en la vía PK es la fosfoacetolasa (Eiteman & Ramalingam, 2015). El rendimiento teórico de ácido láctico a partir de glucosa es de 1 mol de lactato por mol de glucosa (0,5 g/g) (Wang et al., 2015).

Las bacterias lácticas también pueden consumir pentosas de forma heterofermentativa por la vía PK (Wang et al., 2015) (figura 3d). El rendimiento teórico de ácido láctico a partir de pentosas a través de la vía PK es de 1 mol de lactato por mol de pentosa (0,6 g/g) (Wang et al., 2015).

Muchas especies microbianas tienen dos o tres de las vías mencionadas y, por lo tanto, el rendimiento de lactato resultante está determinado por la vía que predomina en las condiciones particulares de crecimiento (Eiteman & Ramalingman, 2015). El mayor rendimiento de lactato se produce en las células que metabolizan la glucosa exclusivamente a través de la vía EMP y las que metabolizan las pentosas exclusivamente a través de la vía PP (Eiteman & Ramalingman, 2015).

Como se mencionó anteriormente la enzima LDH es la encargada de la reducción de piruvato a ácido láctico, a través de la oxidación de NADH (Singhvi et al., 2018). La estereoespecificidad del ácido láctico depende de la enzima LDH, la cual puede ser tanto D-LDH como L-LDH, produciéndose ácido D o L-láctico, respectivamente (Mayo et al., 2010). La producción de uno u otro isómero depende del género o especie de bacteria ácido láctica que se trate (tabla 3) (Liu, 2003).

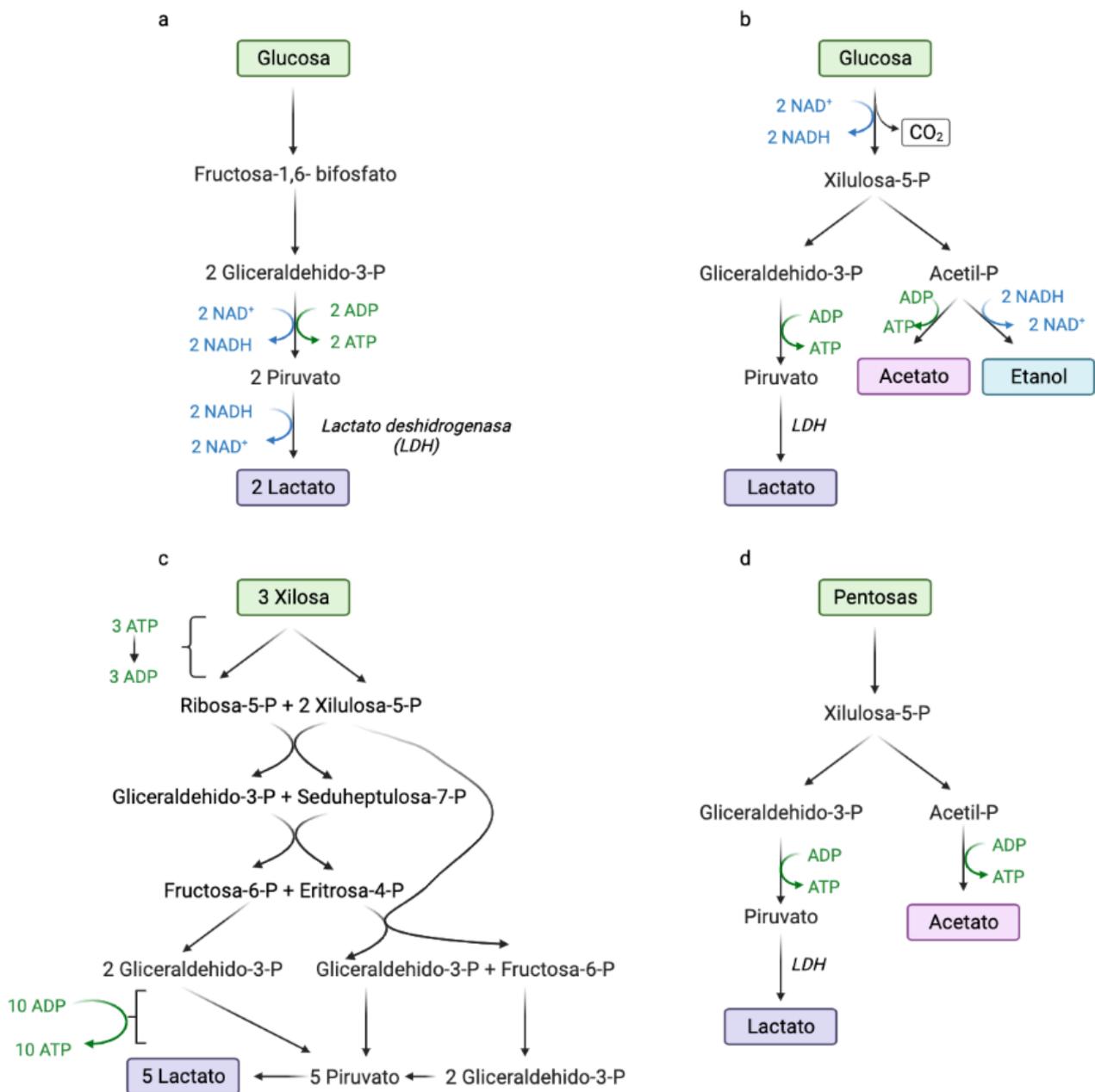


Figura 3. Metabolismo fermentativo de la glucosa y pentosas en bacterias ácido lácticas. a) Metabolismo homofermentativo de la glucosa por la vía Embden-Meyerhoff. b) Metabolismo heterofermentativo de la glucosa mediante la vía fosfoacetolasa. c) Metabolismo homofermentativo de las pentosas por la vía de las pentosas fosfato. d) Metabolismo heterofermentativo de las pentosas por la vía fosfoacetolasa. Tomado de Castillo Martinez et al., 2013 y Gänzle, 2015. Imagen creada en BioRender.com.

Tabla 3. Producción del isómero D o L del ácido láctico o una mezcla de ambos (DL) según el género o la especie de bacteria ácido láctica.

Bacteria ácido láctica	Isómero producido
<i>Aerococcus</i>	L
<i>Carnobacterium</i>	L
<i>Enterococcus</i>	L
<i>Lactococcus</i>	L
<i>Tetragenococcus</i>	L
<i>Streptococcus</i>	L
<i>Vagococcus</i>	L
<i>Leuconostoc</i>	D
<i>Oenococcus</i>	D
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	L
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	L
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	L
<i>Lactobacillus casei</i>	L
<i>Lactobacillus maltaromicus</i>	L
<i>Lactobacillus salivarius</i>	L
<i>Lactobacillus lactis</i>	D o DL
<i>Lactobacillus jensenii</i>	D o DL
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	D o DL
<i>Pediococcus</i>	L, D o DL
<i>Weissella</i>	L, D o DL

#### *Fermentación de la lactosa*

La lactosa es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y una de galactosa, ambos azúcares de 6 carbonos.

La lactosa entra a la célula mediante transportadores de membrana, ya sea una permeasa o un sistema fosfotransferasa (Iskandar et al., 2019). Una vez en el

citoplasma, la lactosa es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, obteniéndose como resultado los monosacáridos que la constituyen, glucosa y galactosa, por separado (Spector, 2009). La lactosa también puede ser hidrolizada en el exterior celular, gracias a la acción de enzimas  $\beta$ -galactosidasas presentes en la superficie celular, como ocurre por ejemplo en *Streptococcus pneumoniae* (Iskandar et al., 2019). En ese caso, la galactosa y la glucosa entran como monosacáridos a la célula también gracias a la acción de transportadores de membrana.

El pH óptimo de actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa depende de la cepa bacteriana que se trate. Por ejemplo, ciertas cepas de *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus acidophilus* presentan un pH óptimo que varía en el rango de pH 6,5-8,0 (Kim & Rajagopal, 2000; Nguyen et al., 2006; Nguyen et al., 2007). En el caso de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de algunas cepas de *Streptococcus*, el pH óptimo es neutro (pH 7) (Greenberg & Mahoney, 1982; Jagota et al., 1981). A pesar de las diferencias, el rango general de pH óptimo de actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa se encuentra entre un pH 6 y pH 8.

La galactosa, una vez en el citoplasma, puede ser metabolizada por la ruta de Leloir o por la ruta de la tagatosa (Iskandar et al., 2019). El producto final de la vía de Leloir es la glucosa-1-fosfato, mientras que los productos finales de la ruta de la tagatosa son GAP y dihidroxiacetona fosfato. Todos estos productos finales pueden entrar posteriormente en la vía de la glucólisis (Iskandar et al., 2019). *Lactococcus lactis* es un ejemplo de microorganismo que fermenta tanto la glucosa como la galactosa de la lactosa (Mayo et al., 2010). Sin embargo, no todas las bacterias ácido lácticas metabolizan la galactosa (Iskandar et al., 2019). En algunos casos, como lo son muchas cepas de *Streptococcus thermophilus*, únicamente la glucosa es fermentada, mientras que la galactosa se excreta al medio extracelular gracias a la permeasa lacS antiporter, que realiza un intercambio lactosa/galactosa (Iskandar et al., 2019; Mayo et al., 2010). En el caso de los microorganismos capaces de fermentar tanto la glucosa como la galactosa de forma homofermentativa, el rendimiento teórico máximo de ácido láctico es 4 mol ácido láctico/mol lactosa (Asunis et al., 2020).

Generalmente es aceptado que la internalización de la galactosa a través de un sistema de transporte determinado orienta el flujo de carbono hacia una vía específica. De esta forma, la internalización de galactosa gracias a un sistema fosfotransferasa, que conduce a la fosforilación de la galactosa, está ligada a la vía de la tagatosa, mientras que la internalización de galactosa a través de una permeasa está ligada a la vía de Leloir (Iskandar et al., 2019).

### *Respiración en bacterias ácido lácticas*

Algunas especies de bacterias ácido lácticas pueden pasar del metabolismo fermentativo a uno respiratorio cuando se les proporciona hemo, y en el caso de algunas bacterias, hemo y menaquinona. El requerimiento externo de hemo y, en algunos casos, menaquinona se debe a que dichas bacterias carecen de las enzimas necesarias para su biosíntesis, lo que significa que el metabolismo respiratorio es fuertemente dependiente del ambiente (Pedersen et al., 2012).

Las bacterias ácido lácticas respiradoras codifican un sólo tipo de citocromo oxidasa, complejo enzimático que funciona a bajas concentraciones de oxígeno, pudiendo contribuir a la eliminación del oxígeno del ambiente bacteriano (Pedersen et al., 2012).

A diferencia de otros microorganismos respiradores que utilizan el ciclo de Krebs para producir NADH, las bacterias ácido lácticas requieren una fuente de carbono y actividad glucolítica para generar NADH. De esta manera, es probable que el metabolismo fermentativo sea necesario previamente o durante la respiración (Pedersen et al., 2012).

Cuando la respiración está activa se observan ganancias significativas de energía y supervivencia, lo que podría explicar por qué las bacterias ácido lácticas utilizan este mecanismo metabólico condicional (Pedersen et al., 2012).

Además de la respiración aerobia, algunas bacterias ácido lácticas también pueden respirar anaeróbicamente, utilizando aceptores finales de electrones distintos al O<sub>2</sub>, como nitrato o fumarato, como es el caso de *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecalis*, respectivamente (Pedersen et al., 2012).

## Otras bacterias productoras de ácido láctico

Además del grupo de las bacterias ácido lácticas existen otras también capaces de producir ácido láctico, como *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* y especies del género *Bacillus*.

Las cepas de *E. coli* tienen requisitos mínimos de nutrientes y pueden metabolizar azúcares de 6 y 5 carbonos (Juturu & Wu, 2016; Okano et al., 2010). Además de ácido láctico, también producen otros metabolitos, como varios ácidos orgánicos y etanol (Okano et al., 2010). A diferencia de las bacterias ácido lácticas, *E. coli* se caracteriza por su baja tolerancia a la acidez (Okano et al., 2010). Las cepas de *E. coli* son fáciles de manipular genéticamente para mejorar la producción de ácido láctico (Abdel-Rahman et al., 2013), estrategia que se ha aplicado ampliamente tanto para producir ácido D-láctico (Liu et al., 2014; Mazumdar et al., 2010; Wang et al., 2012; Zhou et al., 2003) como ácido L-láctico ópticamente puros (Dien et al., 2001, 2002; Zhao et al., 2013).

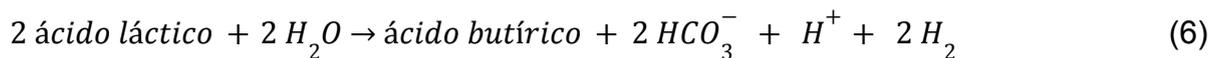
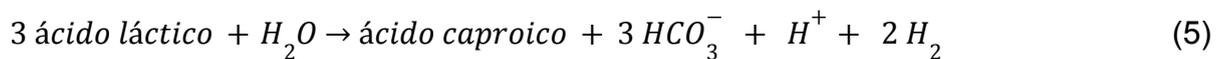
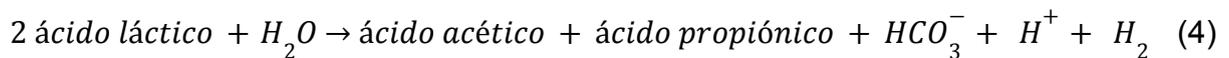
Los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* se caracterizan por su capacidad para crecer en condiciones nutricionales simples, tolerar altas temperaturas (su temperatura óptima de crecimiento es 50°C) y fermentar pentosas y hexosas para producir ácido L-láctico ópticamente puro (Juturu & Wu, 2016; Poudel et al., 2016). Además, fermentan glucosa y xilosa por la vía EMP y la vía de las pentosas fosfato, respectivamente, produciendo ácido láctico de forma homofermentativa (Poudel et al., 2016). En la bibliografía existen múltiples reportes del uso de *Bacillus* para la producción de ácido láctico, tanto en su estado salvaje como modificado genéticamente (Gao et al., 2012; Michelson et al., 2006; Wang et al., 2011).

*Corynebacterium glutamicum* es una bacteria del suelo gram-positiva, generalmente considerada segura y que se usa ampliamente para la producción industrial de aminoácidos (Tsuge et al., 2019). Esta bacteria detiene su crecimiento celular en condiciones de privación de oxígeno, pero consume glucosa para producir ácido L-láctico y ácido succínico (Tsuge et al., 2019). El genoma de *C. glutamicum* está secuenciado y se dispone de herramientas de ingeniería genética, así como de un amplio conocimiento sobre el metabolismo y su regulación de esta bacteria. En base a este conocimiento y utilizando la ingeniería metabólica, se han desarrollado

diversas cepas de *C. glutamicum* mejoradas en cuanto a su producción de ácido láctico (Jia et al., 2011; Okino et al., 2008; Tsuge et al., 2019). Por ejemplo, Jia et al. (2011), con el objetivo de producir ácido D-láctico ópticamente puro, modificaron una cepa de *C. glutamicum* a través del *knockout* del gen de la L-lactato deshidrogenasa y la expresión heteróloga de la D-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus bulgaricus*. La producción de ácido D-láctico de la cepa modificada genéticamente fue 17,9 g/L, con una pureza óptica mayor al 99,9%, lo que representó un aumento del 32,3% de la producción de ácido láctico de la cepa sin modificar.

#### Bacterias que consumen ácido láctico

También existen bacterias capaces de consumir ácido láctico y transformarlo en otros compuestos mediante diversas vías metabólicas (Candry et al., 2020). Entre ellas se encuentran las bacterias propiónicas, pertenecientes a los géneros *Propionibacterium*, *Veillonella* y *Bacteroides* por ejemplo, que oxidan ácido láctico a una mezcla de ácido acético y ácido propiónico (reacción 4) (Candry & Ganigué, 2021). Algunas especies del género *Clostridium* (como *C. propionicum*) y *Peptostreptococcus* también son capaces de producir ácido acético y propiónico a partir del ácido láctico (Spector, 2009). Otro ejemplo es el de la cepa CPB6, la cual pertenece a la familia *Ruminococcaceae* y utiliza el ácido láctico para producir ácido caproico (reacción 5), o el de *Megasphaera elsdenii* que lo transforma en ácidos carboxílicos de entre 2 y 5 carbonos (Candry & Ganigué, 2021). Además, algunas especies de *Clostridium* pueden utilizar ácido láctico para producir butanol o ácido butírico (reacción 6) (Candry et al., 2020; Oshiro et al., 2010).



#### Cultivos puros vs. cultivos mixtos

La mayor parte del ácido láctico es comercialmente producido a través de cultivos puros de microorganismos (Wee et al., 2006). Sin embargo, el uso de cultivos puros requiere un proceso de esterilización, el cual es demandante energéticamente (Choi

et al., 2016). El uso de cultivos mixtos como inóculo para la producción de ácido láctico representa una forma de evitar dicho proceso (el cual puede ser limitante en algunos escenarios) reduciendo los costos de operación y permitiendo la operación de forma continua con mezclas de varios sustratos, incluyendo desechos orgánicos (Choi et al., 2016). Además, las comunidades de microorganismos hacen posible el uso de sustratos complejos, como es el caso de muchos desechos orgánicos, gracias a que presentan una mayor diversidad de vías metabólicas (Sakai et al., 2000). Sakai et al. (2000) evidenciaron esta característica de las comunidades microbianas en su estudio donde llevaron a cabo una fermentación abierta de residuo artificial de cocina con los propios microorganismos del sustrato. Encontraron que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* fueron las bacterias predominantes. Sin embargo, ninguna de estas dos presentaron la capacidad de asimilar las principales fuentes de carbono del sustrato utilizado, almidón y celulosa. Debido a esto los autores resaltaron la importancia de los sistemas de cultivos mixtos, ya que probablemente otros microorganismos de la comunidad hayan contribuido a la hidrólisis de los polisacáridos, permitiendo la subsecuente fermentación de los monómeros de carbohidratos. También, las fermentaciones a través de comunidades de microorganismos son menos susceptibles a la contaminación, permitiendo que el proceso sea en condiciones abiertas (Tashiro et al., 2016).

Parámetros que influyen sobre la producción biológica de ácido láctico

### *pH*

La homeostasis del pH, es decir la habilidad de mantener el pH intracelular dentro de un rango estrecho de valores a pesar de las variaciones en el pH extracelular, es crucial para las bacterias (Booth, 2007). Esto se debe a que la mayoría de las proteínas tienen distintos rangos de pH dentro de los cuales pueden funcionar. Además, la concentración de protones está estrechamente relacionada con la bioenergética celular. La fuerza protón motriz (FPM), gradiente electroquímico establecido a través de la membrana celular bacteriana, juega un papel central en la bioenergética de las células, y el gradiente de pH a través de la membrana celular bacteriana es uno de los dos componentes de la FPM (Krulwich et al., 2011). De esta manera, el pH es un parámetro importante en la fermentación, ya que

determina el grado de hidrólisis del sustrato, la acidogénesis, la actividad de las enzimas, la eficiencia de utilización de energía por las células microbianas, las vías metabólicas y, por ende, los productos metabólicos producidos (Akhlaghi et al., 2017; Tang et al., 2016, 2017).

Específicamente, es el pH intracelular el que finalmente tiene el mayor efecto sobre la actividad celular (Nannen & Hutkins, 1991). Cuando el pH del medio disminuye tomando valores ácidos, la actividad enzimática interna puede tolerar únicamente un pH por encima de un valor crítico, umbral que depende de cada microorganismo. Cuando el pH intracelular alcanza dicho valor crítico de pH se detiene el metabolismo y el crecimiento celular (Kashket, 1987).

Se ha observado que el espectro de productos metabólicos producidos durante una fermentación depende del valor de pH del medio (Elefsiniotis & Oldham, 1994; Horiuchi et al., 2002; Itoh et al., 2012). Por ejemplo, Itoh et al. (2012) observaron esto durante una fermentación continua a través de un cultivo mixto de microorganismos. A pH 3,5 observaron que los principales productos fueron ácido láctico y etanol, mientras que a pH 6,0 los productos predominantes fueron ácido acético y butírico. A lo largo de la operación fluctuaron el pH entre 3,5 y 6,0, y notaron que el fenómeno fue reversible. Es decir, que al aumentar el pH de 3,5 a 6,0, disminuyó la producción de ácido láctico y etanol mientras que aumentó la de ácido acético y butírico. Lo contrario sucedió al pasar de pH 6,0 a pH 3,5. Según los autores, estos cambios en la formación de los productos fueron causados por cambios en la comunidad microbiana en respuesta al cambio de pH. Esta misma hipótesis fue planteada por Horiuchi et al. (2002) quienes también observaron cambios en el perfil de los ácidos orgánicos obtenidos según el pH establecido en una fermentación a través de un cultivo mixto.

#### *Concentración de inóculo y relación alimento/microorganismos*

La concentración de inóculo al inicio de la fermentación es otro factor importante, el cual puede relacionarse con la concentración de sustrato a través de la relación alimento/microorganismos (del inglés food/microorganism, F/M). La relación F/M hace referencia a la cantidad relativa de biomasa (inóculo) y sustrato disponible en el sistema (Akhlaghi et al., 2017). Dependiendo de esta relación, un cultivo puede estar bajo condiciones limitantes, suficientes o de exceso de sustrato (Akhlaghi et

al., 2017). La relación F/M puede influir sobre las reacciones anabólicas y catabólicas de los microorganismos y por lo tanto, afectar el rendimiento de conversión del sustrato en los productos metabólicos correspondientes (Akhlaghi et al., 2017).

En general el efecto de la concentración de inóculo es estudiado en sistemas donde se utilizan cultivos puros de bacterias ácido lácticas para la producción de ácido láctico. Taleghani et al. (2016) estudiaron el crecimiento y la producción de ácido láctico de *Lactobacillus bulgaricus* usando concentraciones de inóculo en un rango de 1-15% y utilizando suero de queso hidrolizado como sustrato. Observaron que la mayor concentración de células y la mayor concentración y rendimiento de ácido láctico se dieron con un 10% de inóculo. Sin embargo, la duración de la fase lag fue menor al utilizar un 5% de inóculo. Panesar et al., (2010) estudiaron la influencia de la concentración de inóculo en un rango de 1-5% sobre la producción de ácido láctico utilizando una cepa de *Lactobacillus casei* y suero de queso como sustrato. La concentración máxima de ácido láctico se obtuvo con un 2-4% de inóculo. Debido a que se ha observado que la concentración de inóculo influye sobre la producción de ácido láctico y a la escasa información de su efecto en fermentaciones llevadas a cabo por cultivos mixtos, es importante generar información al respecto.

#### Régimen del proceso de fermentación

La fermentación puede ser llevada a cabo bajo diferentes modos, como batch, batch alimentado, semicontinuo o continuo, cada uno de los cuales presenta tanto ventajas como desventajas (figura 4). La fermentación en batch es el proceso de fermentación más simple y más comúnmente utilizado, en el que todos los componentes requeridos, como la fuente de carbono y nitrógeno, entre otros, son agregados de forma previa al comienzo de la fermentación (a excepción de los agentes para el control del pH, cuando son utilizados) (Abdel-Rahman et al., 2013; Krishna et al., 2018). Este sistema cerrado presenta algunas ventajas, como la reducción del riesgo de contaminación y la obtención de altas concentraciones de ácido láctico en comparación con otros métodos de fermentación. Sin embargo, este tipo de fermentación sufre de concentraciones bajas de células, debido a niveles limitados de nutrientes y baja productividad principalmente debido a la posible

inhibición por sustrato y/o producto (Abdel-Rahman et al., 2013). La fermentación en batch a menudo se usa para optimizar las condiciones en las primeras etapas del diseño de experimentación (Yang & Sha, 2019).

En una fermentación en modo batch alimentado, los microorganismos se inoculan y cultivan en modo batch durante un cierto período de tiempo y luego el alimento se agrega gradualmente en varias etapas durante el curso del proceso de fermentación, en lugar de ser agregado todo junto al inicio. Debido a la adición de sustrato fresco, normalmente se produce una gran acumulación de biomasa en la fase de crecimiento exponencial. Además, debido a que el sustrato idealmente no se sobrealimenta durante el proceso, la acumulación de subproductos es limitada y por ende también la inhibición por estos subproductos es menor (Yang & Sha, 2019).

La fermentación semicontinua implica ciclos repetidos mediante la inoculación de una parte o la totalidad de las células de un ciclo anterior en el ciclo siguiente. En comparación con el modo batch, este tipo de fermentación tiene varios beneficios, incluido el aumento del rendimiento, el ahorro de tiempo y de procesos vinculados a la limpieza y esterilización del fermentador (de ser necesaria), la alta concentración de células y alta productividad de ácido láctico (Abdel-Rahman et al., 2013).

En una fermentación continua, el medio fresco se agrega continuamente al fermentador, mientras que el medio usado y las células se retiran al mismo tiempo, reemplazando los nutrientes consumidos y eliminando los metabolitos tóxicos. Una fermentación en modo continuo puede alcanzar un estado estacionario y durar días, semanas o incluso meses. Sin embargo, esto puede implicar un desafío para el mantenimiento de la esterilidad, si es que el proceso se da bajo esas condiciones (Yang & Sha, 2019).

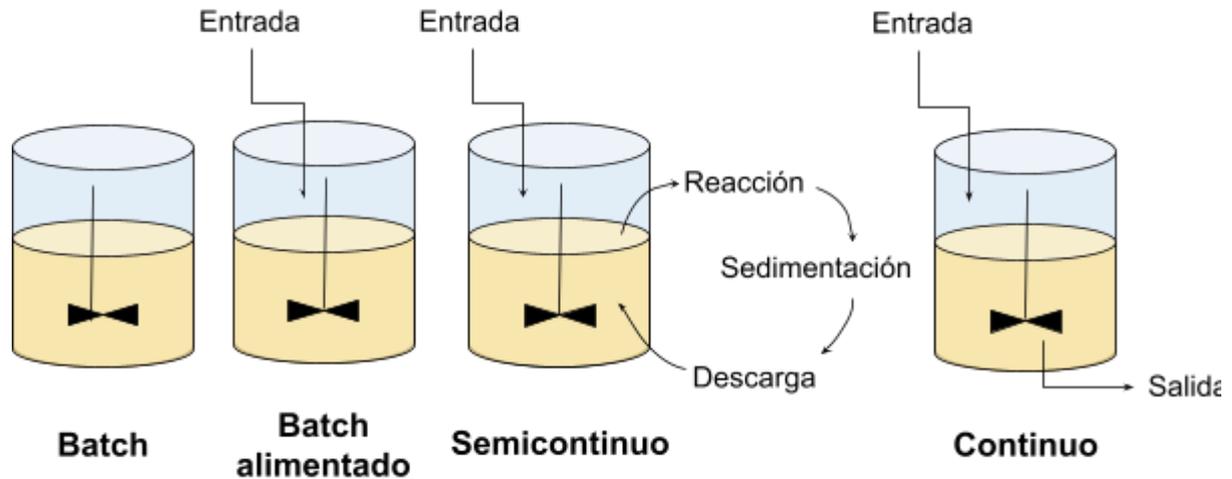


Figura 4. Tipos de fermentación: en modo batch, batch alimentado, semicontinuo o continuo.

### Producción de ácido láctico en el contexto de biorrefinería

Siguiendo el enfoque de biorrefinería se puede aumentar la explotación del potencial de los residuos orgánicos (Dreschke et al., 2015). La producción de ácido láctico se puede pensar en un contexto de biorrefinería, por ejemplo produciendo ácido láctico a partir de residuos orgánicos y luego utilizando el residuo de dicha fermentación como sustrato para la producción de biogás, ya sea hidrógeno o metano (Dreschke et al., 2015). A su vez, el digestato obtenido al final del proceso puede utilizarse como fertilizante orgánico (Dreschke et al., 2015). Un ejemplo de esto es el trabajo de Dreschke et al. (2015), quienes estudiaron la producción de ácido láctico a partir de residuos orgánicos de hogares convencionales, obtenidos de una planta de tratamiento de los mismos. Subsecuentemente se testeó el potencial de producción de biometano del residuo obtenido de la primera fermentación. Sus resultados indicaron que la producción de ácido láctico fue factible y eficiente a partir del residuo mencionado y, además, el potencial de producción de biometano también fue alto, lo que según los autores indica que el proceso de biorrefinería propuesto tiene un gran potencial.

### Antecedentes del trabajo

En varios proyectos anteriores del Laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento de Bioquímica y Genómica del IIBCE junto con el Departamento

BioProA de la Facultad de Ingeniería se estudió la viabilidad de producir hidrógeno como energía limpia utilizando suero de queso y comunidades mixtas. En este proceso, los compuestos orgánicos del suero de queso se convierten en ácidos orgánicos e hidrógeno mediante fermentación oscura. Se estudiaron diferentes condiciones de operación, temperaturas y tipos de reactor (Castelló et al., 2009, 2011, 2018; Gomes et al., 2015; Lovato et al., 2021; Perna et al., 2013). Se demostró que la producción era factible pero el proceso era inestable. Según los resultados obtenidos, una de las causas de la baja estabilidad fue el predominio de bacterias ácido lácticas (Castelló et al., 2020). También se estudió la codigestión de suero de queso e hidrolizado de residuo de yerba mate a través de comunidades mixtas para la producción de hidrógeno y ácidos grasos de cadena corta y media (Ferraz et al., 2021). En dicho trabajo entre los ácidos producidos se encontró ácido láctico. En base al conocimiento generado previamente en el grupo de investigación se planteó la hipótesis de que el proceso de fermentación de suero de queso a través de comunidades microbianas mixtas puede ser redireccionado para producir ácido láctico.

Este trabajo de maestría aborda dos grandes temáticas: la revalorización de suero de queso, un residuo generado en grandes cantidades en nuestro país, y la producción biológica de ácido láctico, un compuesto químico con una creciente demanda en el mercado y que necesita ser producido a través de procesos alternativos a los actuales. Como se mencionó anteriormente, los estudios de producción de ácido láctico a partir de suero de queso utilizan el suero con algún tipo de tratamiento, por ejemplo desproteínizado o hidrolizado. Además, en general estos trabajos utilizan cultivos puros o co-cultivos de bacterias ácido lácticas, con las desventajas ya mencionadas que implica su uso. En aquellos trabajos donde se emplean cultivos mixtos de microorganismos como inóculo, estos provienen de fuentes externas como lodo anaerobio de plantas de tratamiento de aguas residuales, lo que implica incluir otro recurso más al proceso. Además, al utilizar este tipo de inóculo es frecuente aplicarle un pretratamiento térmico para inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados como los metanogénicos. Sin embargo, a diferencia de dichos estudios, en este trabajo se propone el uso de suero de queso crudo obtenido de una quesería artesanal uruguaya como sustrato

para la producción de ácido láctico y el uso de un cultivo mixto de microorganismos provenientes del mismo suero de queso como inóculo.

Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto OPCW titulado “Turning industrial wastes into value-added chemical products”, el cual es actualmente llevado a cabo en el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE. El principal objetivo de este proyecto es estudiar la producción de ácido láctico a partir de aguas residuales y residuos industriales de relevancia en Uruguay.

## Objetivos

El objetivo general de este trabajo es conocer las mejores condiciones para maximizar la producción fermentativa de ácido láctico utilizando suero de queso crudo como sustrato y comunidades microbianas obtenidas del mismo suero como inóculo.

Los objetivos específicos son:

1. Evaluar el efecto del pH inicial y la concentración de inóculo sobre la producción de ácido láctico en batch a partir de suero de queso.
2. Evaluar la producción de ácido láctico a través de un proceso fermentativo semicontinuo y diferentes tiempos de reacción para maximizar la producción de ácido láctico.
3. Conocer la estereoespecificidad del ácido láctico producido.
4. Entender la microbiología del proceso y conocer los microorganismos involucrados.

Esta tesis está estructurada en dos capítulos: en el capítulo I se aborda el objetivo específico 1 y en el capítulo II se aborda el objetivo específico 2. Además, en ambos capítulos se tratan los objetivos específicos 3 y 4.

# Capítulo I: Ensayo de fermentación en batch

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto del pH inicial y la concentración de inóculo sobre la producción de ácido láctico en modo batch a partir de suero de queso, conocer la estereoespecificidad del ácido láctico producido y los microorganismos involucrados para entender la microbiología del proceso.

## Materiales y métodos

### Sustrato: suero de queso

El suero de queso utilizado como sustrato fue proporcionado por la quesería artesanal Rostán (Colonia, Uruguay). Una vez recibido el suero fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para prevenir su fermentación y conservar sus características lo mejor posible hasta el momento de su uso. Se midió su pH, demanda química de oxígeno (DQO), azúcares reductores totales y ácido láctico (tabla 4). En los experimentos de fermentación el suero fue utilizado crudo sin ningún agregado ni tratamiento.

### Inóculo: suero de queso fermentado

Como inóculo se utilizó biomasa obtenida mediante auto fermentación del suero de queso. La auto fermentación se realizó mediante la incubación de suero de queso crudo a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 16 días, ajustando su pH inicial a un valor de 6,5 (Ferraz et al., 2014). Al final de la fermentación se midió su pH, concentración de azúcares reductores totales, concentración de ácido láctico y sólidos suspendidos volátiles (SSV) (tabla 4).

Tabla 4. Caracterización del sustrato e inóculo utilizados en el ensayo de producción fermentativa de ácido láctico en batch.

	Sustrato	Inóculo
DQO (g/L)	81,25	-
pH	5,5	3,0
Concentración de azúcares reductores totales (g/L)	60,70	1,39

Concentración de ácido láctico (g/L)	0,90	6,20
Sólidos suspendidos volátiles (g/L)	-	1,66

## Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Central Compuesto (CCD) (Box & Wilson, 1992) como diseño experimental, a través del cual se determinaron las condiciones experimentales de los ensayos de fermentación en batch para la producción de ácido láctico a partir de suero de queso. El pH inicial y la concentración de inóculo fueron las variables independientes (o factores) del diseño. Se evaluaron 5 niveles por cada factor:  $\pm\alpha$  (puntos axiales),  $\pm 1$  (puntos factoriales) y 0 (punto central) (figura 5). El punto central se estudió por triplicado. El rango de valores ( $\pm 1$ ) de cada factor fue determinado en base a valores prácticos y reportes de producción fermentativa de ácido láctico, siendo 5,5-7,0 para el pH inicial y 5-25% para la concentración de inóculo. El CCD se generó utilizando R (versión 4.2.0) y R Studio (versión 1.1.383) (R Core Team (2022)) con la función `ccd` del paquete `rsm` (Lenth, 2010). Como resultado se obtuvieron 11 condiciones experimentales diferentes a estudiar, cada una de las cuales combina un valor de cada variable independiente (pH inicial y concentración de inóculo). En la tabla 5 se muestran los valores codificados y naturales de los puntos de cada nivel de las variables independientes estudiadas.

El número de experimentos se determinó por la ecuación 1 y los puntos axiales codificados por la ecuación 2:

$$n = 2^k + 2k + m \quad (1)$$

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k} \quad (2)$$

Donde  $n$  es el número de experimentos,  $k$  el número de variables,  $m$  el número de réplicas del punto central y  $\alpha$  el valor codificado del punto axial.

La ecuación 3 se utilizó para decodificar el valor de  $\alpha$  con el fin de acceder a los valores experimentales (naturales) de los puntos axiales.

$$\alpha = \frac{z_i - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}} \quad (3)$$

Donde  $\alpha$  es el valor codificado del punto axial determinado por la ecuación 2,  $Z_i$  el valor experimental del nivel,  $\bar{z}$  el promedio entre el valor menor (-1) y mayor (+1) del nivel, el cual es exactamente el valor del nivel 0 y  $\Delta z$  la diferencia entre el valor mayor (+1) y el menor (-1).

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando el software Protimiza Experimental Design.

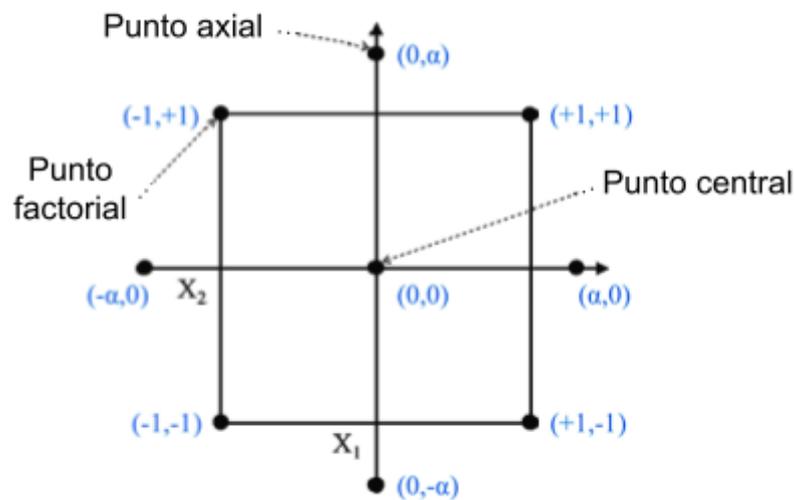


Figura 5. Diseño central compuesto de dos variables o factores ( $X_1$  y  $X_2$ ). Se observan los puntos axiales, factoriales y el punto central del diseño.

Tabla 5. Matriz del diseño experimental de dos variables para la producción de ácido láctico a partir de suero de queso. Las réplicas del punto central están en negrita.

Condición	Valores codificados		Valores naturales	
	$X_1$	$X_2$	pH inicial	Inóculo (% v/v)
1	-1	-1	5,5	5,0
2	-1	1	5,5	25,0
3	1	-1	7,0	5,0
4	1	1	7,0	25,0

5	- $\alpha$	0	5,19	15,0
6	$\alpha$	0	7,31	15,0
7	0	- $\alpha$	6,25	0,86
8	0	$\alpha$	6,25	29,14
<b>9</b>	0	0	6,25	15,0
<b>10</b>	0	0	6,25	15,0
<b>11</b>	0	0	6,25	15,0

### Ensayos de fermentación

Los ensayos de fermentación del suero de queso fueron llevados a cabo en modo batch en frascos Schott (DURAN®) de 500 mL, con un volumen de trabajo de 100 mL. Según la concentración de inóculo (expresada en %v/v) correspondiente a cada condición, cada reactor se armó con un determinado volumen de sustrato e inóculo, detallado en la tabla 6. Luego de agregar el suero de queso y el inóculo, los frascos fueron gaseados con N<sub>2</sub> y sellados con un tapón de goma para generar y mantener condiciones anaerobias. La fermentación se realizó durante 120 horas en un baño de agua a una temperatura constante de 30°C con agitación de 150 rpm.

Tabla 6. Volúmen de sustrato e inóculo utilizados para armar los reactores, en base a la concentración de inóculo correspondiente para cada condición.

Condición	Inóculo (% v/v)	Sustrato (mL)	Inóculo (mL)
1	5,0	95,0	5,0
2	25,0	75,0	25,0
3	5,0	95,0	5,0
4	25,0	75,0	25,0
5	15,0	85,0	15,0
6	15,0	85,0	15,0
7	0,86	99,14	0,86
8	29,14	70,86	29,14
<b>9</b>	15,0	85,0	15,0

<b>10</b>	15,0	85,0	15,0
<b>11</b>	15,0	85,0	15,0

Las 11 condiciones mostradas en la tabla 5 fueron llevadas a cabo en paralelo y reproducidas en dos sets de ensayos, cuya única diferencia fue el uso de buffer. En consecuencia, las 11 condiciones se estudiaron tanto sin uso de buffer como con uso de buffer. Este se añadió mediante el ajuste del pH inicial de cada condición con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), con el fin de evaluar el efecto del buffer en el proceso.

Se tomaron muestras del líquido de fermentación a las 24, 48, 72 y 120 horas de ensayo para la determinación de azúcares reductores totales, concentración de ácido láctico (total e isómeros), ácidos grasos volátiles, etanol y pH y para el análisis de la comunidad microbiana por secuenciación masiva del gen del ARNr 16S.

### Cálculos y métodos analíticos

La concentración de azúcares reductores totales se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y la concentración de ácido láctico total también mediante un método espectrofotométrico (Taylor, 1996). Los isómeros de ácido láctico se determinaron mediante el servicio de HPLC ofrecido en la Plataforma de Química Analítica del IIBCE (HPLC Waters con detector arreglo de diodos, columna Shodex ORpak CRX-853, 8.0mmID x 50mmL).

El pH se midió utilizando un pHmetro (OAKTON pH 11 series). Los métodos para determinar la DQO y los sólidos suspendidos volátiles se tomaron de "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (American Public Health Association et al., 1995). Los ácidos grasos volátiles (AGV) y etanol se midieron mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) (Adorno et al., 2014).

La relación alimento/microorganismos, expresada en gDQO/gSSV, se calculó según la ecuación 4:

$$F/M = \frac{V_s \cdot DQO_i}{V_l \cdot SSV_l} \quad (4)$$

Donde  $V_s$  es el volumen del sustrato (l),  $DQO_i$  la demanda química de oxígeno inicial del sustrato (g/L),  $V_i$  el volumen del inóculo (l) y  $SSV_i$  los sólidos suspendidos volátiles del inóculo (g/L).

## Análisis de la comunidad microbiana

Se seleccionaron tres muestras para analizar la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen del ARNr 16S: el inóculo y la muestra con mayor concentración de ácido láctico, tanto del ensayo con buffer como del ensayo sin buffer.

Las muestras fueron centrifugadas para separar la biomasa (5 minutos, 10000g), a partir de la cual se extrajo el ADN genómico utilizando el kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe kit (Zymo Research, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó la región V4 del gen del ARNr 16S por PCR con los primers universales 520F (5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3') y 802R (5'-TACNNGGGTATCTAATCC-3') (Claesson et al., 2009). Se utilizaron 12,5  $\mu$ L de Ranger Mix (Meridian Bioscience), 0,5  $\mu$ L de cada primer, 10  $\mu$ L de agua y 1,5  $\mu$ L de ADN para un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L. El ciclo de PCR consistió de una primera etapa a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C (30 segundos), 55°C (30 segundos), 72°C (90 segundos), y por último 10 minutos a 72°C, para lo que se utilizó el termociclador GenePro (Bioer). Los adaptadores y barcodes para la secuenciación en Ion Torrent se incluyeron en los oligómeros de los primers siguiendo la estrategia descrita por Claesson et al., (2009). Se verificó el tamaño y calidad de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa 1% utilizando GoodView™ (SBS Genetech) como agente intercalante. Los productos de PCR de tamaño esperado se purificaron a partir de la extracción de banda del gel utilizando un kit comercial (ZR Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de las librerías de amplicones del gen del ARNr 16S se llevó a cabo en el Ion Torrent S5 disponible en la plataforma genómica del IIBCE. El análisis de los datos crudos se realizó utilizando el software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME2 2022.2) (Bolyen et al., 2019). Se importaron a QIIME2 un total de 1.117.547 reads. El plugin "divisive amplicon denoising algorithm" (DADA2) (Callahan et al., 2016) se utilizó para filtrar secuencias de baja calidad, remover secuencias quiméricas y singletons y finalmente de-replicar las

secuencias obtenidas, resultando en variantes únicas de secuencia de amplicones (Amplicon Sequence Variants, ASVs) para los análisis consiguientes. Las ASVs obtenidas se clasificaron taxonómicamente utilizando la base de datos SILVA 138.1 (Quast et al., 2013). La tabla de ASVs con su clasificación taxonómica fue importada en R (versión 4.2.0) con Rstudio (versión 1.1.383). Para generar los heatmaps y barplots se utilizaron los paquetes phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), ampvis (Andersen et al., 2018) y ggplot2 (Wickham, 2016).

## Resultados y discusión

En este capítulo el objetivo planteado fue determinar el efecto del pH inicial y la concentración de inóculo sobre la producción de ácido láctico en batch a partir de suero de queso con comunidades mixtas. Se utilizó como diseño experimental un diseño central compuesto y se probaron 11 condiciones diferentes de pH inicial y concentración de inóculo, tanto en presencia como ausencia de buffer ( $\text{NaHCO}_3$ ). Para comprender mejor el proceso se estudiaron las comunidades microbianas mediante análisis de secuenciación masiva del gen del ARNr 16S.

### Producción de ácido láctico

Los resultados obtenidos mostraron que a lo largo de la operación de todos los reactores se produjo ácido láctico, alcanzando una concentración máxima a las 48 horas en ambos ensayos (figura 6).

A través del test de Tukey se evaluaron las diferencias de concentración de ácido láctico obtenidas en cada una de las tomas de muestra durante la operación del ensayo: a las 24, 48, 72 y 120 horas (figura 7). En el caso del ensayo sin buffer se observó que a las 48 horas los valores de concentración de ácido láctico fueron significativamente diferentes al resto (tabla A1). En cambio, en el ensayo con buffer no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de medición de ácido láctico (tabla A1). Sin embargo, a las 48 horas de este ensayo no sólo se encontró el valor máximo de concentración de ácido láctico, sino que también se encontró la media y la mediana máximas en comparación con el resto de los momentos de toma y análisis de muestra. De esta manera, se consideró las 48 horas de operación de los reactores, tanto en ausencia como presencia de buffer,

como el momento de maximización de la producción de ácido láctico, con el que se continuó trabajando y ahondando a lo largo del estudio.

En el ensayo sin buffer, la concentración máxima se obtuvo en la condición 4 (pH inicial 7,0 y 25% de inóculo) y fue de 13 g/L (tabla 7). Un 62,9% correspondió al isómero L del ácido láctico, mientras que el 37,1% fue ácido D-láctico. El rendimiento de ácido láctico fue 1,1 mol ácido láctico/mol lactosa disponible (tabla 7). En el caso del ensayo con buffer, la concentración máxima de ácido láctico alcanzada fue de 20,1 g/L, correspondiente a la condición 3 (pH inicial 7,0 y 5% de inóculo) (tabla 7), siendo el 86,4% ácido L-láctico y el 13,6% ácido D-láctico. El rendimiento de ácido láctico fue 1,3 mol ácido láctico/mol lactosa disponible (tabla 7).

En el ensayo con buffer se observó tanto un aumento de la concentración máxima como del rendimiento de ácido láctico, lo que podría significar que el uso de buffer fue beneficioso para el proceso. En ambos casos el isómero L del ácido láctico fue el predominante, resultado concordante con otros estudios de producción de ácido láctico mediante comunidades microbianas, donde se observó la misma dominancia de dicho isómero (Zhang et al., 2008). Sin embargo, en el ensayo con buffer la proporción del isómero L fue mayor que en el ensayo sin buffer, lo que también indicaría que el uso de buffer fue beneficioso para la producción de ácido láctico con mayor pureza óptica en este trabajo.

Además de la producción de ácido láctico, también se observó su consumo (figura 6). El consumo de ácido láctico podría deberse al aumento de la abundancia relativa de microorganismos capaces de metabolizar este ácido, hipótesis discutida más adelante en la sección de "Análisis de la comunidad microbiana".

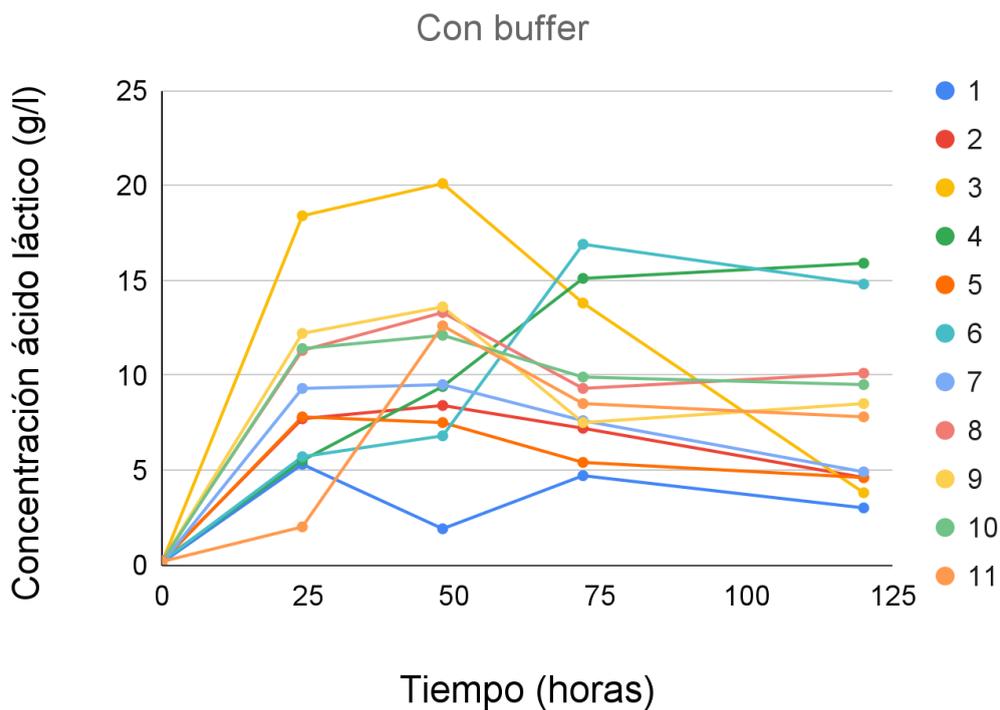
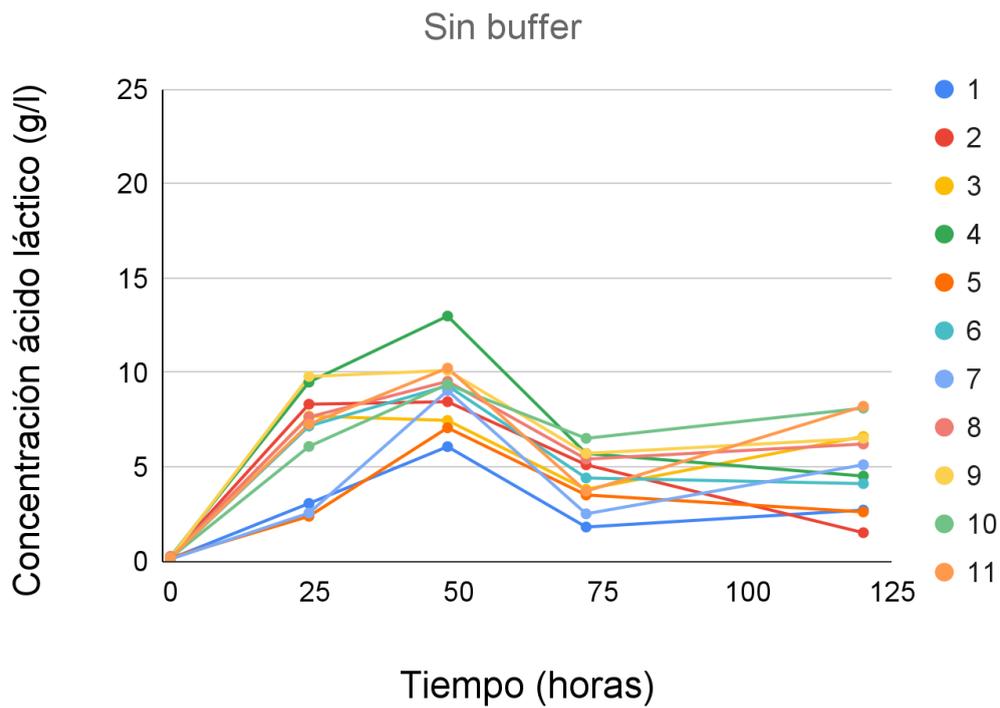


Figura 6. Concentración de ácido láctico a lo largo del tiempo de las 11 condiciones estudiadas en el ensayo de producción de ácido láctico en batch con y sin buffer. Condiciones: 1) pH 5.5, inóculo 5%; 2) pH 5.5, inóculo 25%; 3) pH 7, inóculo 5%; 4)

pH 7, inóculo 25%; 5) pH 5,19, inóculo 15%; 6) pH 7,31, inóculo 15%; 7) pH 6,25, inóculo 0.86%; 8) pH 6,25, inóculo 29,14; 9) pH 6,25, inóculo 15%; 10) pH 6,25, inóculo 15%; 11) pH 6,25, inóculo 15%.

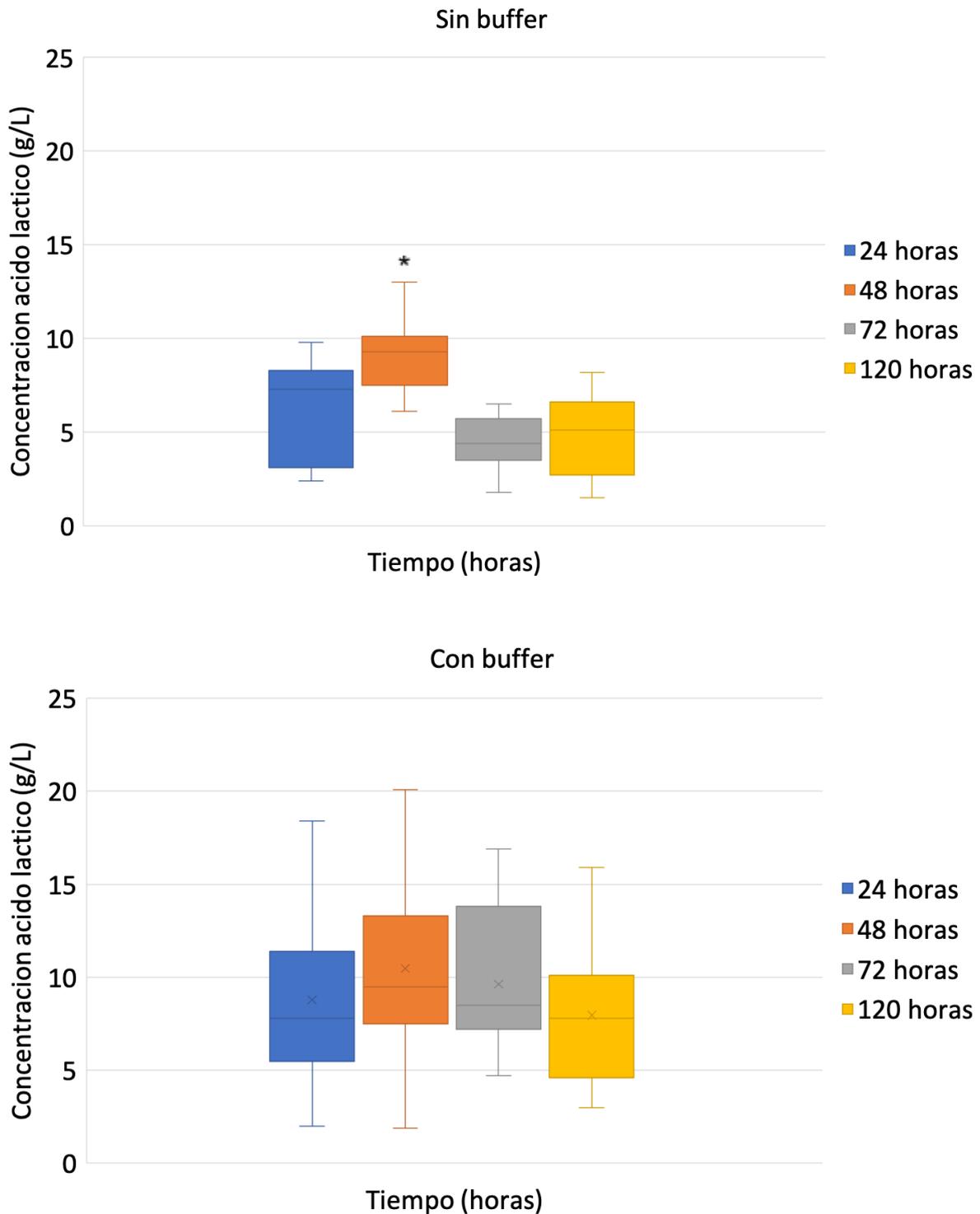


Figura 7. Concentración de ácido láctico obtenido en los diferentes tiempos de muestreo a lo largo del ensayo de producción de ácido láctico a partir de suero de

queso en batch, con y sin uso de buffer. El asterisco indica el tiempo donde se observaron diferencias significativas. La línea dentro de la caja indica la mediana y la cruz la media.

Tabla 7. Concentración y rendimiento de ácido láctico obtenido para cada una de las 11 condiciones estudiadas, a las 48 horas del ensayo en batch con y sin buffer.

Condición	pH inicial	Inóculo (% v/v)	Sin buffer		Con buffer	
			[AL] <sup>a</sup>	Rend. <sup>b</sup>	[AL] <sup>a</sup>	Rend. <sup>b</sup>
1	5,5	5,0	6,1	0,4	1,9	0,1
2	5,5	25,0	8,4	0,7	8,4	0,7
3	7,0	5,0	7,5	0,5	20,1	1,3
4	7,0	25,0	13,0	1,1	9,4	0,8
5	5,19	15,0	7,1	0,5	7,5	0,5
6	7,31	15,0	9,3	0,7	6,8	0,5
7	6,25	0,86	9,0	0,6	9,5	0,6
8	6,25	29,14	9,5	0,8	13,3	1,1
<b>9</b>	6,25	15,0	10,1	0,7	13,6	1,0
<b>10</b>	6,25	15,0	9,4	0,7	12,1	0,9
<b>11</b>	6,25	15,0	10,2	0,7	12,6	0,9

<sup>a</sup> Concentración de ácido láctico en g/L. <sup>b</sup> Rendimiento de ácido láctico en mol ácido láctico/mol lactosa disponible.

Como era de esperarse, debido a la producción y acumulación de ácidos durante la fermentación, el pH de los reactores descendió a lo largo de la operación (figura 8). Sin embargo, se observaron diferencias entre los ensayos con y sin buffer. Independientemente del pH inicial, al no usarse buffer el pH descendió en todos los reactores a un valor de pH 4 a las 24 horas de operación, para luego mantenerse y finalmente descender a un pH final de aproximadamente 3,5 en todos los reactores. En cambio, al aplicarse buffer, el pH de los reactores nunca fue menor a 4, alcanzando al final de la operación valores entre pH 4 y pH 5. Estos resultados sugieren que el uso de buffer evitó que se alcancen valores de pH tan bajos como

pH 3 durante la operación. Coincidentemente, en ambas condiciones de mayor producción de ácido láctico, el pH inicial fue el mismo (pH 7). No obstante, para la condición 4 del ensayo sin buffer el pH a las 48 horas fue 4,1, mientras que en la condición 3 del ensayo con buffer el pH a las 48 horas fue 5,5 (figura 9). Es interesante observar que a pesar de que en ambos casos el pH inicial fue el mismo y de que a las 48 horas de la condición 3 del ensayo con buffer la concentración de ácido láctico y acético fueron mayores (resultado mostrado más adelante) que a las 48 horas de la condición 3 del ensayo sin buffer, el pH aún así fue mayor, lo que refuerza la idea de que el bicarbonato de sodio agregado cumplió su función de buffer, evitando que el pH descienda de forma más pronunciada.

Otros autores también han observado que un valor de pH 5 fue beneficioso para la producción de ácido láctico. Por ejemplo, Wu et al. (2015) reportaron que un aumento del pH de 4 a 5 mejoró la reacción de hidrólisis durante la fermentación de desechos de frutas y verduras para la producción de ácido láctico. Tang et al. (2017) estudiaron el efecto del pH ácido (4, 5, 6 y sin control) en la producción fermentativa de ácido láctico a partir de desechos de alimentos y tres inóculos diferentes (de comunidades mixtas) mediante ensayos en batch. Los resultados mostraron que, independientemente del inóculo utilizado, la mayor concentración y rendimiento de ácido láctico se obtuvo a pH 5. A dicho valor de pH observaron un aumento de la hidrólisis, de la tasa de degradación del sustrato y la actividad enzimática microbiana. Por otro lado, Bonk et al., (2017) estudiaron la producción de ácido láctico mediante cultivos mixtos a partir de desechos de alimentos. Encontraron que el experimento en batch con control de pH (mediante bicarbonato de sodio) resultó en rendimientos mucho mayores de los productos, en comparación con el experimento en batch sin control de pH. En base a sus hallazgos plantearon que la inhibición por producto por ácidos protonados y etanol así como el bajo pH son los factores limitantes para obtener mayores concentraciones de producto. De esta manera, se podría pensar que en este trabajo se obtuvo una mayor producción de ácido láctico a partir de suero de queso utilizando buffer en el proceso debido a una mejora en la utilización del sustrato y en la actividad enzimática y a una menor inhibición por ácidos protonados, en comparación con el proceso llevado a cabo sin buffer.

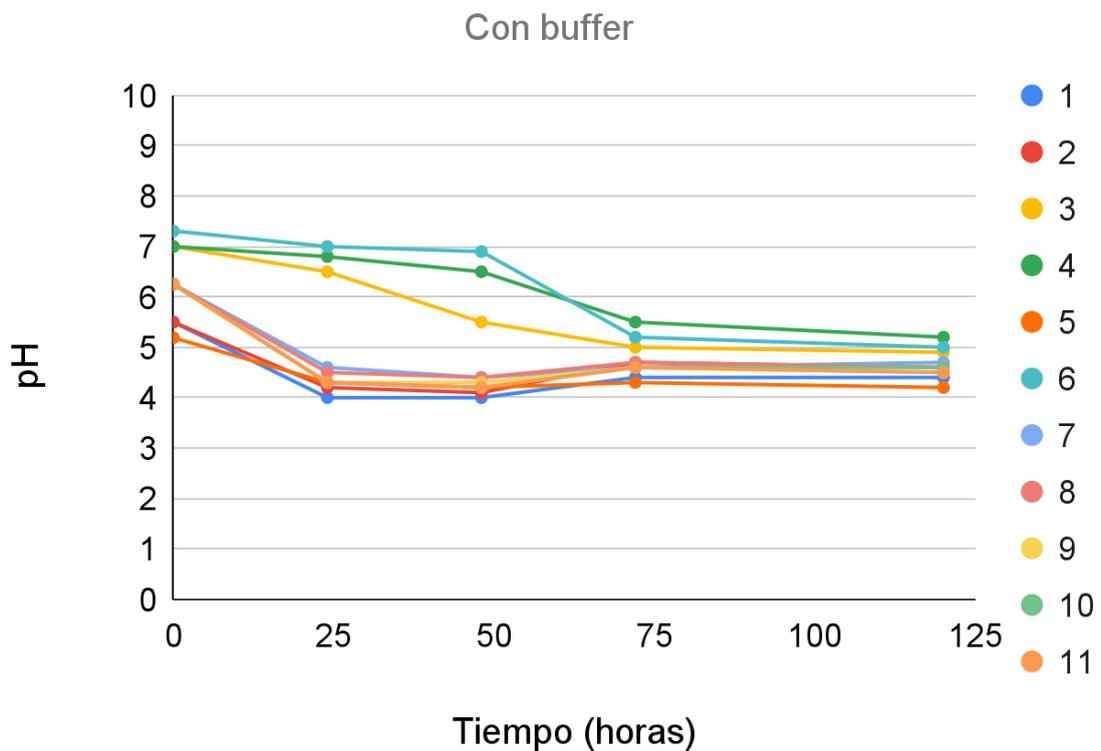
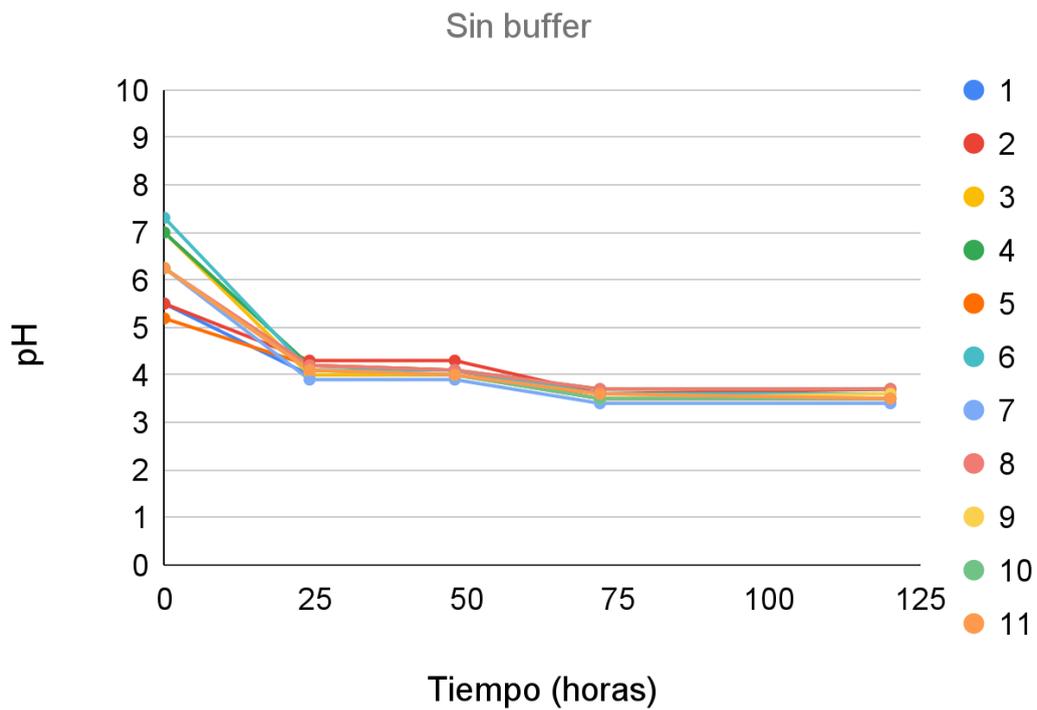


Figura 8. Evolución del pH a lo largo de las 120 horas de operación en los 11 reactores. Condiciones: 1) pH 5.5, inóculo 5%; 2) pH 5.5, inóculo 25%; 3) pH 7, inóculo 5%; 4) pH 7, inóculo 25%; 5) pH 5,19, inóculo 15%; 6) pH 7,31, inóculo 15%;

7) pH 6,25, inóculo 0.86%; 8) pH 6,25, inóculo 29,14; 9) pH 6,25, inóculo 15%; 10) pH 6,25, inóculo 15%; 11) pH 6,25, inóculo 15%.

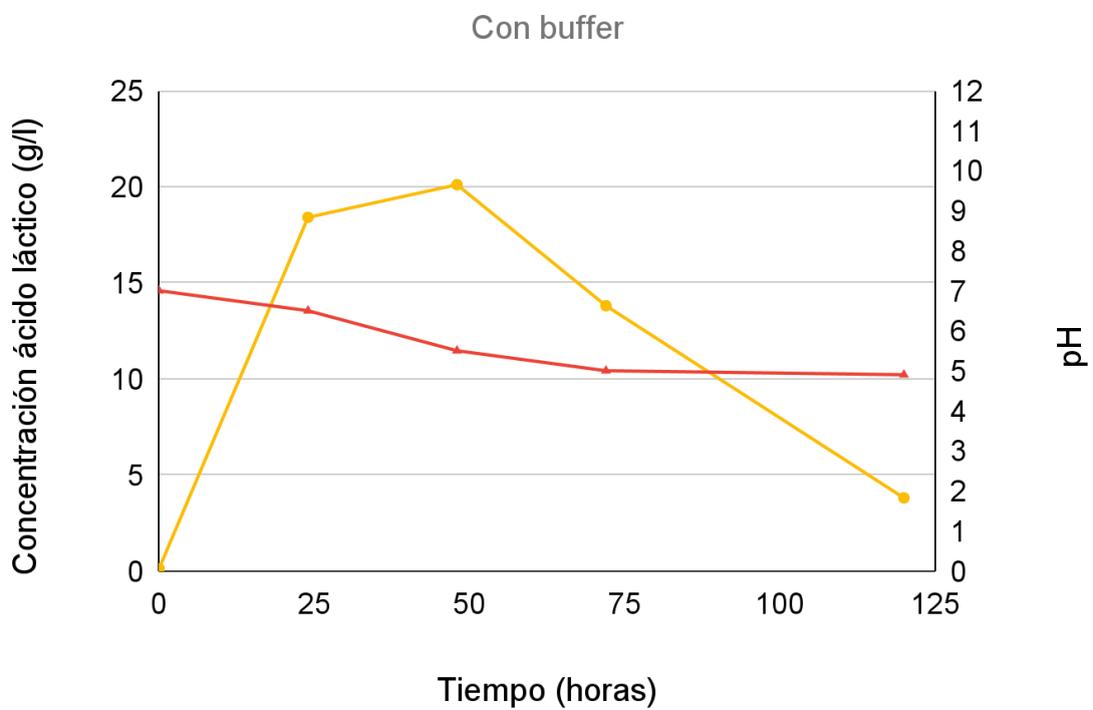
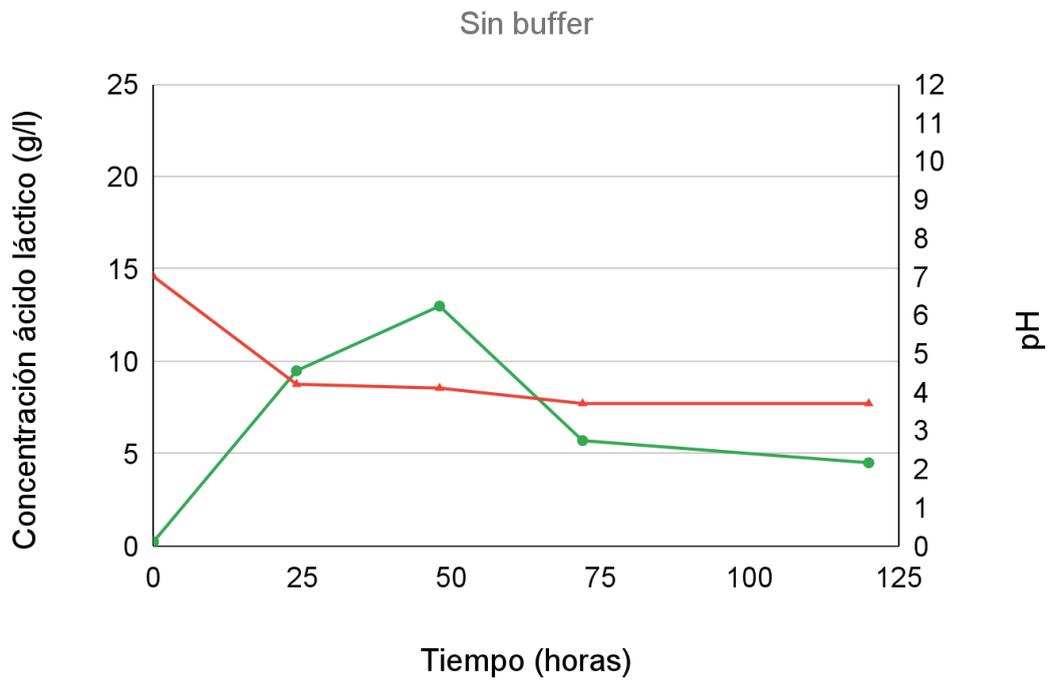


Figura 9. Concentración de ácido láctico y pH a lo largo del tiempo de la condición en la que se produjo la mayor concentración de ácido láctico.

En base a las diferentes proporciones utilizadas de sustrato e inóculo, los experimentos llevados a cabo presentaron diferentes relaciones F/M. Se evaluaron relaciones F/M de 0.1, 0.3, 0.9 y 5.6 gDQO/gSSV (tabla 8). La mayor concentración de ácido láctico en el ensayo sin buffer se obtuvo con una relación F/M de 0,1 gCOD/gSSV, mientras que la mayor concentración de ácido láctico en el ensayo con buffer se obtuvo con una relación F/M de 0,9 gCOD/gSSV (tabla 8).

En la figura 10 se muestra la relación entre la relación F/M y la concentración de ácido láctico a las 48 horas de fermentación en los dos ensayos en batch. Los resultados mostraron que no hubo una clara relación entre ambas variables, por lo que se puede concluir que el planeamiento y monitoreo de ensayos de producción de ácido láctico en base a la relación F/M no sería adecuado. De todos modos, sería interesante realizar más ensayos que permitan ahondar en la relación entre la relación F/M y la producción de ácido láctico para confirmar esta conclusión.

Tabla 8. Relación F/M de las 11 condiciones probadas en los ensayos de producción de ácido láctico en batch. También se muestra la concentración de ácido láctico obtenida en cada condición a las 48 horas de operación (momento en el que se obtuvo la concentración máxima de ácido láctico) con y sin buffer.

Condición	pH inicial	Inóculo (% v/v)	F/M (gCOD/gSSV)	Concentración de ácido láctico (g/L)	
				Sin buffer	Con buffer
1	5,5	5,0	0,9	6,1	1,9
2	5,5	25,0	0,1	8,4	8,4
3	7,0	5,0	0,9	7,5	20,1
4	7,0	25,0	0,1	13,0	9,4
5	5,19	15,0	0,3	7,1	7,5
6	7,31	15,0	0,3	9,3	6,8
7	6,25	0,86	5,6	9,0	9,5

8	6,25	29,14	0,1	9,5	13,3
9	6,25	15,0	0,3	10,1	13,6
10	6,25	15,0	0,3	9,4	12,1
11	6,25	15,0	0,3	10,2	12,6

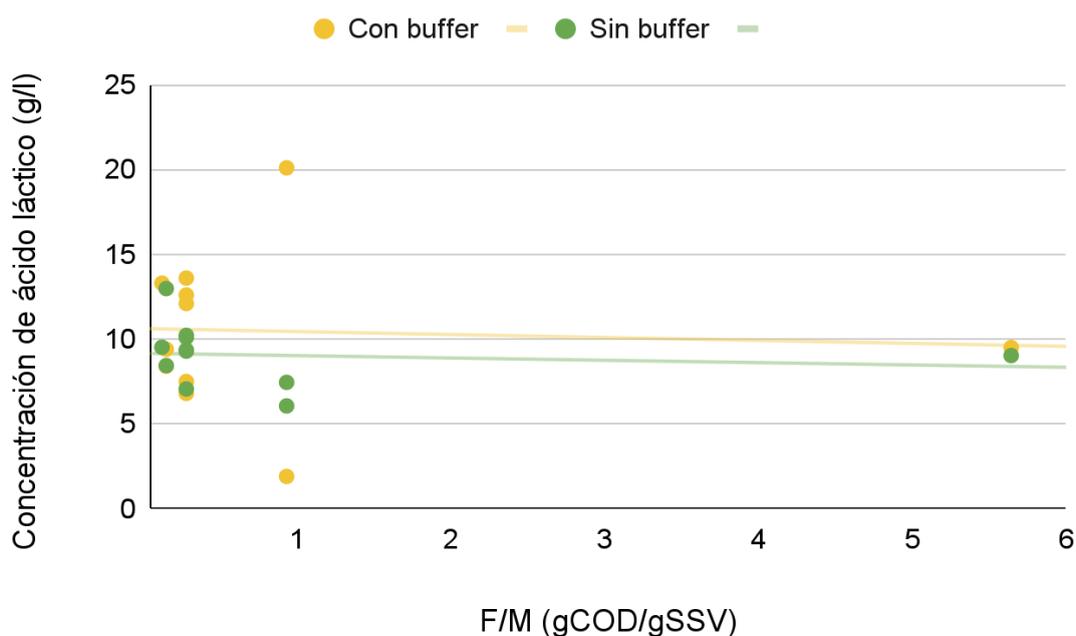


Figura 10. Concentración de ácido láctico según la relación F/M. Se muestran los resultados de concentración de ácido láctico de ambos ensayos, con y sin buffer, a las 48 horas de operación.

Las concentraciones máximas de ácido láctico obtenidas en este trabajo son comparables con otras encontradas por otros investigadores (tabla 9). En la bibliografía se reporta un amplio rango de concentración máxima de ácido láctico obtenida mediante procesos fermentativos en batch, en los cuales se usan residuos como sustrato y comunidades de microorganismos como inóculo (tabla 9). Por ejemplo, Liang et al., (2014) estudiaron la producción de ácido láctico mediante la fermentación de cáscara de papa sin control de pH (pH inicial 4,8) y utilizando un 2% de inóculo, obteniendo así una concentración máxima de ácido láctico de 14,7 g/L, valor similar al obtenido en el presente trabajo cuando no se utilizó buffer. Li et al., (2015) también obtuvieron una concentración de ácido láctico como la alcanzada en este trabajo en el ensayo sin buffer (13,1 g/L). Sin embargo, dichos autores

aplicaron condiciones diferentes de operación, ya que estudiaron la producción de ácido láctico a partir de residuos de alimentos y lodo activado sin la adición externa de inóculo, con pH 11 y 21°C. En otros estudios se reportaron concentraciones mayores de ácido láctico que las obtenidas en este trabajo. Por ejemplo, Tang et al., (2016, 2017) reportaron concentraciones máximas de ácido láctico de 30,4 g/L y 28,4 g/L a través de la fermentación de desechos de alimentos, con los propios microorganismos del sustrato o residuos de alimentos (15%) como inóculo, respectivamente. En dichos trabajos el pH sí fue controlado durante la operación y mantenido en valores de pH 6 y pH 5, respectivamente. También en base a desechos de alimentos pero utilizando compost (10%) como inóculo, Tashiro et al., (2016) obtuvieron una concentración máxima de ácido láctico de 39,2 g/L aplicando una estrategia de control de pH novedosa en la cual durante las primeras 24 horas de operación se ajustó el pH a 7 cada 6 horas, y luego se mantuvo un control constante a pH 7 hasta el final de la operación. Una concentración de ácido láctico todavía mayor fue reportada por Yousuf et al., (2018), quienes obtuvieron una concentración máxima de ácido láctico de 52 g/L, con un pH inicial de 4,4 y sin control del mismo durante la fermentación de desechos de alimentos sin la adición externa de inóculo.

Ferraz et al. (2021) estudiaron la producción de hidrógeno y ácidos orgánicos de cadena corta y media a través de la co-fermentación de suero de queso y residuo de yerba mate (YMW) en batch, utilizando compost como inóculo y sin control de pH durante la fermentación. Obtuvieron una producción máxima de ácido láctico de 12,6 g/L, similar a la obtenida en este trabajo sin uso de buffer. Aparte del trabajo de Ferraz et al. (2021), en general los estudios que reportan específicamente la producción de ácido láctico en batch a partir de suero de queso utilizan como inóculo cultivos puros o co-cultivos (mezcla de dos o más cepas) de microorganismos productores de ácido láctico. En estos también se reporta un amplio rango de valores de concentración máxima de ácido láctico (tabla 9). En el caso de *Lactobacillus helveticus* se han reportado concentraciones de ácido láctico tanto de 10 g/L como de 53 g/L, bajo condiciones de pH de 4,4 (sin control posterior) y pH 5,9, respectivamente (Soriano-Perez et al., 2012; Tango & Ghaly, 1999). Por otro lado, Plessas et al., (2008) estudiaron la producción de ácido láctico a través de un co-cultivo de *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

y *Lactobacillus helveticus*, obteniendo una concentración máxima de 19,8 g/L aplicando un pH inicial de 6,6 sin control posterior.

Tabla 9. Comparación de los valores obtenidos en este trabajo con otros estudios de producción de ácido láctico en batch. Se indica el inóculo (tipo y concentración), sustrato, pH, temperatura, rendimiento máximo y concentración ([AL]) máxima de ácido láctico.

Inóculo (tipo y concentración)	Sustrato	pH	Temp. (°C)	Rendimiento	[AL] (g/L)	Referencia
Lodo activado (2%)	Cáscara de papa	-	35	0,22 g/g-ST <sup>a</sup>	14,7	Liang et al., 2014
Microorganismos nativos del sustrato	Residuos de alimentos y lodo activado	11	21	0,52 g/gTCOD <sup>b</sup>	13,1	Li et al., 2015
Microorganismos nativos del sustrato	Residuos de alimentos	6	25	-	30,4	Tang et al., 2016
Compost (10%)	Residuos de alimentos	~7	50	1,38 g/g-ST <sup>a</sup>	39,2	Tashiro et al., 2016
Residuos de alimentos (15%)	Residuos de alimentos	5	37	0,46 g/g-ST <sup>a</sup>	28,4	Tang et al., 2017
Microorganismos nativos del sustrato	Residuos de alimentos sintético	-	37	0,18 g/g-ST <sup>a</sup>	52,0	Yousuf et al., 2018
<i>Lactobacillus helveticus</i> (10%)	Suero de queso pasteurizado	-	42	-	10,0	Tango & Ghaly, 1999
<i>K. marxianus</i> , <i>L. helveticus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (0,25%)	Suero de queso sintético	-	37	0,47 g lactato/g lactosa utilizada	19,8	Plessas et al., 2008

<i>Lactobacillus helveticus</i>	Suero de queso esterilizado	5,9	45	-	53,0	Soriano-Perez et al., 2012
Compost	Suero de queso y yerba mate	-	37	-	12,6	Ferraz et al. 2021
Suero de queso auto fermentado (25%)	Suero de queso	4,1	30	1,1 mol ác. láctico/mol lactosa disponible	13,0	Este trabajo
Suero de queso auto fermentado (5%)	Suero de queso	5,5	30	1,3 mol ác. láctico/mol lactosa disponible	20,1	Este trabajo

<sup>a</sup> ST = sólidos totales. <sup>b</sup> TCO<sub>D</sub> = demanda química de oxígeno total inicial del sustrato.

En términos de producción de ácido láctico en batch, en este trabajo se observó una concentración y rendimiento máximo de ácido láctico a partir de suero de queso a las 48 horas de fermentación, aplicando una condición de pH inicial 7 y 5% de inóculo. Sin embargo, tomando en cuenta los resultados reportados en la bibliografía, también se observó que no hay una única condición de pH y concentración de inóculo para maximizar la producción de ácido láctico que sea aplicable en todos los casos. En los momentos de mayor producción de ácido láctico, ambos parámetros son reportados en la bibliografía en amplios rangos: 4,4-11,0 para pH inicial y 2-15% para la concentración de inóculo. Por lo tanto, se puede concluir que cada proceso fermentativo de producción de ácido láctico en batch debería ser optimizado individualmente a través de un cuidadoso balance de las diferentes condiciones operacionales, teniendo en cuenta también otros factores, como el tipo de sustrato utilizado.

### Producción de ácidos grasos volátiles y etanol

Las muestras correspondientes a los momentos de máxima concentración de ácido láctico de ambos ensayos (48 horas de la condición 4 sin buffer y 48 horas de la

condición 3 con buffer) se analizaron para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles y etanol.

En ambas muestras se detectaron ácidos grasos volátiles y etanol (tabla 10). En la muestra correspondiente al ensayo sin buffer la concentración de ácido acético fue de 0,83 g/L y la de etanol 4,01 g/L. En la muestra correspondiente al ensayo con buffer la concentración de ácido acético fue de 2,04 g/L y la de etanol 1,6 g/L. En ambos casos los ácidos isobutírico, butírico, caproico y heptanoico se encontraron en una concentración menor a 0,16 g/L.

La predominancia de ácido láctico, ácido acético y etanol se reportó anteriormente en otros trabajos de producción de ácido láctico (Wu et al., 2015). La presencia de estos productos metabólicos indica que en ambas muestras ocurrió la producción de ácido láctico a través de la vía heterofermentativa.

Tabla 10. Ácido láctico, ácidos grasos volátiles y etanol de las muestras en las que se obtuvo la mayor concentración de ácido láctico del ensayo en batch, con y sin buffer. Todos los compuestos se muestran en g/L.

Muestra	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol	Ácido isobutírico	Ácido butírico	Ácido caproico	Ácido heptanoico
Sin buffer	13,0	0,82	4,01	< 0,11	< 0,11	< 0,15	< 0,16
Con buffer	20,1	2,04	1,6	< 0,11	< 0,11	< 0,15	< 0,16

### Efecto de las condiciones operacionales sobre la producción de ácido láctico

Para determinar la relación entre la respuesta (producción de ácido láctico) y las variables del proceso de producción fermentativa de ácido láctico a partir de suero de queso (pH inicial y concentración de inóculo) se ajustaron los datos obtenidos a diversos modelos matemáticos (tabla A2), eligiéndose finalmente el que incluye los términos lineales de pH inicial y concentración de inóculo, el término cuadrático de pH inicial y la interacción entre ambas variables (ec. 5). La elección fue en base a la significancia estadística del modelo (p-valor), su R<sup>2</sup> y falta de ajuste (tabla A3).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_1^2 + b_3X_2 + b_{12}X_1X_2 \quad (5)$$

Donde Y es la producción de ácido láctico;  $X_1$  y  $X_2$  las variables pH inicial y concentración de inóculo, respectivamente;  $b_0$  una constante,  $b_1$  el coeficiente lineal de la variable  $X_1$ ;  $b_2$  el coeficiente cuadrático de la variable  $X_1$ ;  $b_3$  el coeficiente lineal de la variable  $X_2$  y  $b_{12}$  el coeficiente de la interacción entre las dos variables ( $X_1X_2$ ).

En el caso del ensayo sin buffer, a raíz del ajuste de los datos a dicho modelo se obtuvo la siguiente ecuación, la cual describe el proceso de producción fermentativa de ácido láctico a partir de suero de queso sin buffer (ec. 6):

$$[\text{ac. láctico}] = 9,60 + 1,14*(\text{pH}) - 0,77*(\text{pH})^2 + 1,08*(\text{Inóculo}) + 0,79*(\text{pH})*(\text{Inóculo}) \quad (6)$$

Donde [ac. láctico] es la concentración de ácido láctico en g/L, pH el pH inicial e inóculo la concentración de inóculo (%).

Al nivel de significancia utilizado (10%) el modelo fue estadísticamente significativo (p-valor = 0,04932). Además, el modelo presentó un  $R^2 = 75,26\%$ , por lo que se puede decir que explicó gran parte de la variabilidad de la variable de respuesta (producción de ácido láctico). También el modelo presentó una falta de ajuste no significativa (p-valor = 0,10015). Tanto el pH inicial como la concentración de inóculo tuvieron un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico en los niveles estudiados en este trabajo (p-valor = 0,0352 y p-valor = 0,0427, respectivamente), indicando que deben ser fijados en su valor mínimo al evaluarse individualmente (Ferraz et al., 2020). En cambio, la interacción entre ambos factores resultó ser no significativa (p-valor = 0,2325). Esto indica que ambas variables pueden ser fijadas a cualquier valor entre el menor nivel (-1) y el mayor (+1) cuando se evalúan de forma conjunta (Ferraz et al., 2020).

En el caso del ensayo con buffer, la ecuación obtenida tras el ajuste de los datos al modelo fue la siguiente (ec. 7):

$$[\text{ac. láctico}] = 12,28 + 2,28*(\text{pH}) - 2,49*(\text{pH})^2 + 0,15*(\text{Inóculo}) - 4,30*(\text{pH})*(\text{Inóculo}) \quad (7)$$

Al nivel de significancia establecido (10%), el modelo fue estadísticamente significativo (p-valor = 0,08381) y además presentó un  $R^2 = 69,99\%$ , por lo que también se puede decir que explica buena parte de la variabilidad de la variable de respuesta. Sin embargo, la falta de ajuste del modelo también fue significativa.

Aunque esto pueda indicar que el modelo no se ajusta perfectamente a los datos, el modelo todavía proporciona información útil. Ambos factores  $X_1$  y  $X_2$ , de forma individual, no tuvieron un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico ( $p$ -valor  $> 0,1$ ) (tabla 11), indicando que pueden ser fijados a cualquier valor entre el menor nivel (-1) y el mayor (+1) cuando se estudien por separado (Ferraz et al., 2020). Sin embargo, la interacción entre las dos variables sí tuvo un efecto significativo ( $p$ -valor = 0,0410), lo que significa que estas deben ajustarse a su nivel más alto para obtener una respuesta mayor cuando se evalúan en conjunto (Ferraz et al., 2020).

La figura 11 muestra las superficies de respuesta que representan de forma gráfica los modelos estudiados. Se observó que en el caso del ensayo sin buffer la región donde la producción de ácido láctico se maximiza está comprendida por los valores más altos de pH inicial y concentración de inóculo, mientras que en el caso con buffer la zona de la superficie donde se maximiza la producción de ácido láctico corresponde a los valores más bajos de concentración de inóculo y los más altos de pH inicial. Sin embargo, en ambos casos la superficie no alcanza un máximo definitivo. Para ello habría que realizar más experimentos, en base a un nuevo diseño central compuesto, explorando la zona cercana al máximo mostrado en estas superficies, y así obtener una región óptima máxima de producción de ácido láctico. De esta forma, los resultados obtenidos sientan las bases hacia la optimización de la producción de ácido láctico a partir de suero de queso.

Al igual que en este trabajo, se ha reportado anteriormente que el pH tiene un efecto significativo sobre la producción fermentativa de ácido láctico. RedCorn & Engelberth (2016) estudiaron la optimización de la producción de ácido láctico en batch a través de la co-fermentación de desechos de alimentos y lodo primario utilizando los microorganismos propios del sustrato. Encontraron que el pH tuvo un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico, identificando como condición óptima de pH para su caso particular de estudio un valor de pH = 5,5. La concentración máxima de ácido láctico producido fue 58,4 g/L y el rendimiento máximo un 96,7% del rendimiento teórico. de Lima et al. (2010) también estudiaron la optimización de la producción de ácido láctico, pero mediante una cepa pura de *Lactobacillus* sp. LMI8, para lo que realizaron dos diseños centrales compuestos: uno de ellos para elegir la mejor composición del medio de cultivo y otro para

optimizar el pH y la temperatura. Encontraron que la temperatura y el pH tuvieron un efecto significativo y demostraron que la mejor producción de ácido láctico (52,37 g/L) se obtuvo con 59,64 g/L de lactosa (obtenida de suero de queso), 14,55 g/L de licor de maíz y 5,65 g/L de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , a 39,6°C y pH 5,9. En estudios previos también se reportó el efecto significativo de la interacción entre factores sobre los procesos fermentativos y por ende su importancia a la hora de maximizar la producción durante dichos procesos (RedCorn y Engelberth, 2016; Ferraz et al., 2020; Ferraz et al., 2021).

Tabla 11. Valor de significancia de los modelos utilizados y de los coeficientes de las ecuaciones resultantes. Se consideró un nivel de significancia de 10%.  $b_0$  es una constante,  $b_1$  y  $b_2$  el coeficiente lineal de las variables  $X_1$  y  $X_2$  (pH inicial y concentración de inóculo, respectivamente),  $b_3$  el coeficiente cuadrático de la variable  $X_1$  y  $b_{12}$  el coeficiente de la interacción entre las dos variables ( $X_1X_2$ ).

Sin buffer	p-valor
Modelo	0,04932
Lack of fit	0,10015
$b_0$	0,0000
$b_1$	0,0352
$b_2$	0,1591
$b_3$	0,0427
$b_{12}$	0,2325
Con buffer	p-valor
Modelo	0,08381
Lack of fit	0,03505
$b_0$	0,0001
$b_1$	0,1002
$b_2$	0,9045
$b_3$	0,1114
$b_{12}$	0,0410

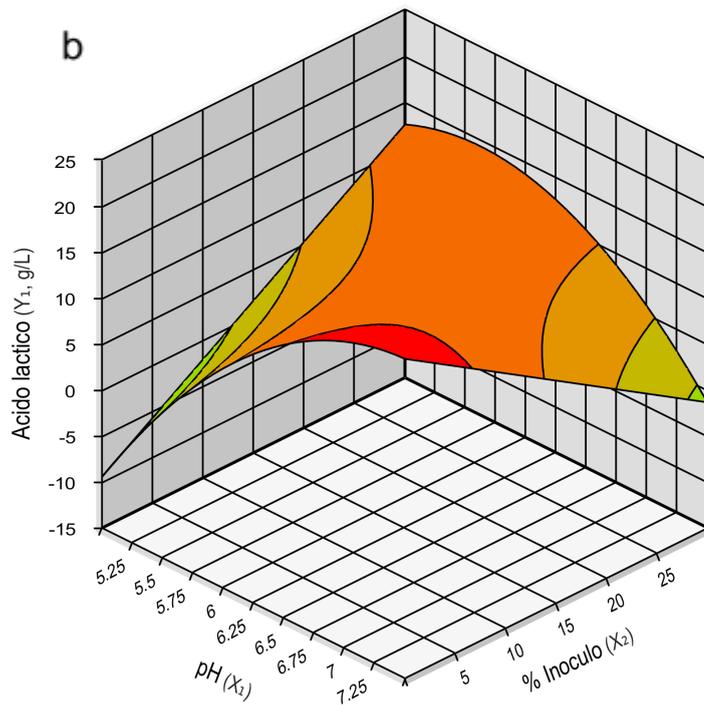
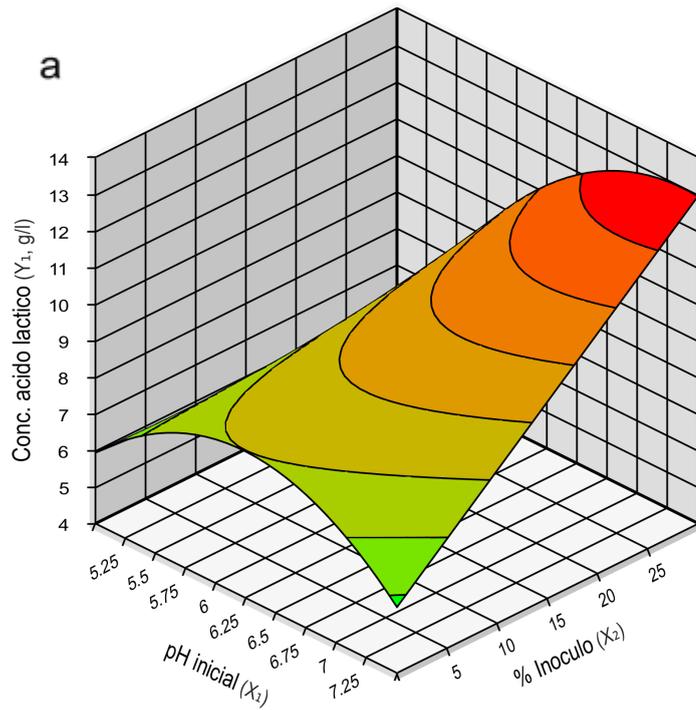


Figura 11. Superficie de respuesta para el efecto interactivo entre el pH inicial y la concentración de inóculo en la producción de ácido láctico a partir de suero de queso a) sin uso de buffer y b) con buffer.

## Análisis de la comunidad microbiana

Se analizó la estructura de la comunidad microbiana por secuenciación masiva del gen del ARNr 16S para comprender el desempeño de los reactores. Se analizaron tres muestras: el inóculo y la muestra correspondiente al momento de mayor producción de ácido láctico, tanto en ausencia como en presencia de buffer. En el caso del ensayo sin buffer dicha muestra fue obtenida a las 48 horas de la condición 4 (pH inicial 7 y 25% de inóculo) y, en el caso del ensayo con buffer, la muestra analizada fue la correspondiente a las 48 horas de la condición 3 (pH inicial 7 y 5% de inóculo).

Se obtuvieron más de 1 millón de secuencias parciales del gen del ARNr 16S (entre 292,674 y 531,232 por muestra). Los *reads* se agruparon en ASVs y se clasificaron taxonómicamente como se describió en la sección de materiales y métodos. Luego del filtrado de los taxones de no interés (como arqueas y eucariotas), las muestras se normalizaron en base a la muestra con menor número de reads para continuar con los análisis.

Los resultados muestran que los phylum Firmicutes y Proteobacteria fueron los de mayor abundancia relativa (figura 12a), los cuales son generalmente encontrados en procesos de fermentación (Choi et al., 2016). Sin embargo, se observó la predominancia del phylum Firmicutes en las tres muestras analizadas, presentando una abundancia relativa del 53,2%, 99,6% y 69,8% en el inóculo, en el ensayo sin buffer y en el ensayo con buffer, respectivamente. El phylum Proteobacteria presentó una abundancia relativa de 28,7%, 0,07% y 29,8% en el inóculo, en el ensayo sin buffer y en el ensayo con buffer, respectivamente. El inóculo fue la muestra con mayor número de phylum asignados. A pesar de que los phylum Firmicutes y Proteobacteria fueron los más abundantes en dicha muestra, también se encontraron otros de menor abundancia relativa, como Actinobacteriota (3,7%), Chloroflexi (2,7%), Synergistota (3,6%) y Thermotogota (3%).

En cuanto a la asignación taxonómica a nivel de género, se observó que las comunidades microbianas fueron diferentes en las tres muestras analizadas (figura 12b). Nuevamente el inóculo fue la muestra con mayor diversidad. En dicha muestra, el género con mayor abundancia relativa fue *Clostridium* sensu stricto 1

(27,5%), seguido de otros de menor abundancia relativa, entre los que se encontraron los géneros productores de ácido láctico *Lactobacillus* (12,8%), *Bacillus* (4,3%) y *Sporolactobacillus* (2,3%). En cambio, las muestras de los ensayos presentaron menor diversidad de microorganismos a nivel de género.

Específicamente, en la muestra del ensayo sin buffer predominaron los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*, con una abundancia relativa de 90,3% y 9,2%, respectivamente. Ambos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas. Todos los miembros de *Streptococcus* fermentan carbohidratos, produciendo predominantemente ácido láctico; aunque también se pueden producir cantidades menores de ácido acético, ácido fórmico, etanol y CO<sub>2</sub> (Boone et al., 2001), lo que podría explicar la detección de ácido acético y etanol en esta muestra. Narita et al., (2004) investigaron la producción de ácido láctico a partir de almidón de maíz utilizando una cepa pura de *Streptococcus bovis* 148 a 37°C y pH 6, obteniendo una producción de 14,7 g/L de ácido láctico, valor similar a la concentración máxima obtenida en este trabajo en esta muestra. De esta manera, la predominancia del género *Streptococcus* también podría explicar la concentración máxima de ácido láctico de 13 g/L obtenida. Por otra parte, los miembros del género *Lactococcus* son bacterias lácticas homofermentativas (Boone et al., 2001). Serna Cock & Rodríguez de Stouvenel (2006) utilizando una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, obtuvieron una concentración de ácido láctico de 35 g/L a través de una fermentación en batch en base a glucosa a 32°C y pH 6. Las autoras concluyeron que la cepa muestra un gran potencial para la producción de ácido láctico a partir de glucosa, incluso sin el control de pH durante la fermentación, donde obtuvieron una concentración de ácido láctico de 13,7 g/L. De esta manera, *Lactococcus* también puede explicar la concentración máxima de ácido láctico obtenida en el ensayo sin buffer.

En la muestra del ensayo con buffer predominó el género *Lactococcus* (67,9%) y una ASV asignada a la familia Enterobacteriaceae (27,8%). Además, esta muestra presentó una abundancia relativa de 1,4% correspondiente al género *Streptococcus*. La familia Enterobacteriaceae está compuesta por bacterias gram negativas pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, entre otros. Las fermentaciones ácido mixtas se asocian típicamente con esta familia. Estas bacterias suelen producir una colección de ácido acético, ácido

fórmico, ácido láctico y, en algunos casos, ácido succínico como productos finales fermentativos del catabolismo de la glucosa. En la mayoría de los casos, el ácido acético y el ácido fórmico son los principales productos finales producidos (Spector, 2009). De esta manera, tanto la ASV perteneciente a la familia Enterobacteriaceae como *Streptococcus* pueden explicar la detección de ácido acético y etanol en esta muestra.

Para conocer en mayor profundidad la clasificación taxonómica de la ASV asignada solamente a nivel de familia Enterobacteriaceae, se utilizó la herramienta BLAST-search de su secuencia nucleotídica. Como resultado se obtuvo un porcentaje de similitud del 100% con secuencias asignadas tanto a cepas del género *Klebsiella* como *Enterobacter*. Existen reportes del uso de cepas de *Enterobacter* para la producción de ácido láctico, sobre todo a través de su manipulación genética. Por ejemplo, Thapa et al., (2017) buscaron mejorar la producción de ácido láctico a través de la manipulación genética de la cepa *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. Bajo las condiciones de fermentación optimizadas (37 °C y pH 6 durante 84 horas), la cepa modificada produjo 40,05 g/L de ácido láctico con manitol como fuente de carbono, el doble de lo producido por la cepa salvaje (20,7 g/L). Esta producción de ácido láctico por parte de la cepa salvaje es similar a la concentración máxima obtenida en este trabajo en el ensayo con buffer (20,1 g/L), por lo que podría estar vinculada a la alta abundancia relativa de esta ASV. *Klebsiella* es un género de bacterias con capacidad de producir ácido láctico entre sus productos metabólicos (Rossi et al., 2013). Los reportes que existen sobre la producción de ácido láctico a través de esta bacteria, al igual que en el caso de *Enterobacter*, son a través de su modificación genética para obtener una mejor producción de ácido láctico. Como un ejemplo, Feng et al., (2017) estudiaron el efecto de la delección de uno o múltiples genes responsables de la producción de otros metabolitos con el fin de aumentar la producción de ácido D-láctico de *K. pneumoniae*. El triple mutante presentó la mayor capacidad de producir ácido D-láctico, obteniéndose una concentración de ácido D-láctico de 125,1 g/L con un rendimiento de 0,91 g/g de glucosa en 36 horas.

Tanto *Streptococcus* como *Lactococcus* son géneros que producen ácido L-láctico (Toit et al., 2014). Como fue mencionado, el isómero L fue el producido en mayor proporción en ambos momentos de producción máxima de ácido láctico (con y sin

buffer). La predominancia de *Streptococcus* y *Lactococcus* en ambas muestras pueden explicar la mayor proporción de este isómero. El 37,1% restante, correspondiente al isómero D, es probable que se haya producido en momentos anteriores a las 48 horas, donde pudieron haber predominado bacterias productoras del isómero D o de una mezcla de los isómeros DL, por ejemplo *Lactobacillus*, género con una alta abundancia relativa en el inóculo (12,8%) y con representantes capaces de producir ácido L, D o DL-láctico (Panesar et al., 2007).

Los microorganismos encontrados en mayor proporción en el inóculo presentaron una abundancia relativa baja durante el momento de mayor producción de ácido láctico en ambos ensayos (<0,3%). Al mismo tiempo, los microorganismos predominantes en ambos ensayos, pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus* y a la familia Enterobacteriaceae, presentaron una abundancia relativa baja en el inóculo ( $\leq 0,1\%$ ). Es decir que, en el momento de la operación correspondiente a las 48 horas de las condiciones 4 (sin buffer) y 3 (con buffer), los microorganismos predominantes en el inóculo disminuyeron drásticamente su presencia y se seleccionaron determinadas bacterias presentes en baja proporción. Esta selección muestra que las condiciones aplicadas fueron favorables para seleccionar bacterias ácido lácticas.

La selección y aumento de la abundancia relativa de bacterias lácticas del inóculo también se ha observado en otros trabajos. Liang et al. (2015) estudiaron la comunidad microbiana de tres reactores operados a base de residuo de cáscara de papa y tres inóculos diferentes. Los resultados de secuenciación mostraron que la fermentación de cáscara de papa resultó en la simplificación de las comunidades microbianas de los inóculos. Los géneros más abundantes en los inóculos utilizados fueron *Mycobacterium* (18,2%), *Tetrasphaera* (8,5%) y *Rhizobacter* (3,5%). Sin embargo, tras la fermentación *Lactobacillus* fue el género dominante en los tres reactores estudiados, representando >96% del total de secuencias bacterianas. Solo se encontraron niveles bajos (<0,1%) de los géneros dominantes de los inóculos en las muestras de biomasa fermentada. Liang et al. (2016) reportaron resultados similares. Los autores estudiaron cuatro reactores alimentados con diferentes residuos agrícolas e inoculados con la misma muestra de un sistema de lodos activados de una planta municipal de aguas residuales. Los resultados mostraron que la diversidad de la comunidad microbiana disminuyó durante la

fermentación y se desarrolló una comunidad de bacterias lácticas dominada por especies del género *Lactobacillus*. Lo mismo fue observado en el trabajo de Tang et al. (2017) donde *Lactobacillus* se enriqueció durante la fermentación alcanzando abundancias relativas de 83,4-98,5%, a pesar de que el inóculo se caracterizó por una abundante diversidad microbiológica. De esta manera, estos resultados coinciden con los de este trabajo, donde la comunidad microbiana del inóculo fue mucho más diversa, mientras que durante la operación uno o dos géneros de bacterias lácticas fueron predominantes en la comunidad microbiana. La reducción de la diversidad microbiana del inóculo y la selección de bacterias productoras de ácido láctico puede verse como un aspecto favorable para el proceso, ya que de esta manera se reducen las vías metabólicas competidoras y la producción de metabolitos no deseados. De esta manera, se podría decir que la comunidad se comportó de forma similar a un cultivo puro o co-cultivo, pero conservando la robustez característica de un cultivo mixto.

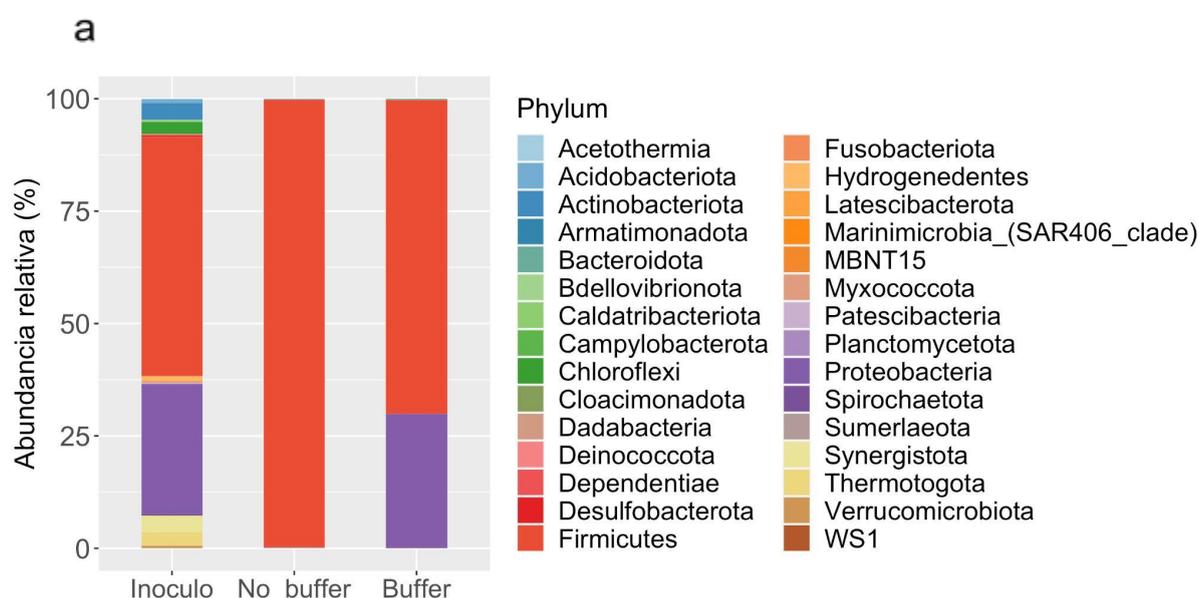
La selección de bacterias ácido lácticas que se observó en este trabajo durante la operación de los reactores probablemente se deba a los bajos valores de pH alcanzados. Como se mencionó anteriormente, las bacterias ácido lácticas toleran mayor concentración de ácidos que otras bacterias fermentativas, lo que sugiere que puedan volverse dominantes en un cultivo mixto al mantener el pH en valores ácidos (Itoh et al., 2012). Tomando esta característica como ventaja, otros investigadores han aplicado valores de pH ácidos como estrategia para producir ácido láctico de forma selectiva (Choi et al., 2016; Itoh et al., 2012). Choi et al. (2016), por ejemplo, estudiaron cómo la selección a través de un bajo pH (pH 3) afectó el desempeño de la fermentación continua de suero de queso utilizando cultivos mixtos. Compararon el desempeño de 2 reactores CSTR termófilos (55°C), inoculados con lodo anaerobio (10% v/v) y operados en modo batch por 5 días sin control de pH y luego en modo continuo con control de pH hasta el final de la operación. La diferencia entre ambos reactores fue que uno de ellos (R1) se operó a pH 3 durante los primeros 49 días de operación continua y luego a pH 5,5 hasta el final. En cambio, el otro reactor (R2) se operó a pH 5,5 durante toda la operación continua. Durante la fase de pH 3 del R1 la producción de ácido láctico y ácidos orgánicos fue muy baja, lo que, según los autores, sugiere que la actividad acidogénica estuvo suprimida por el bajo valor de pH. El posterior ajuste de pH a un

valor de 5,5 indujo una mejora inmediata y significativa de la producción de ácido láctico, lo que indicó que la actividad microbiana que antes estaba suprimida fue reestimulada por el cambio de pH. La concentración y rendimiento máximos de ácido láctico obtenidos en R1 fueron 5,7 g/L y 0,62 gCOD ácido láctico/gCOD sustrato, respectivamente. En el reactor R2 la concentración máxima de ácido láctico fue 5,5 g/L y el rendimiento máximo 0,58 gCOD ácido láctico/gCOD sustrato. La selectividad y la productividad de ácido láctico también fueron mayores en el reactor R1. El mejor desempeño de R1 comparado con R2 indicaría que la fase inicial a pH 3 probablemente tuvo un efecto beneficioso sobre la fermentación, relacionado al efecto de selección que tiene este parámetro sobre la comunidad microbiana. En base a los resultados, los autores postularon que el pH tuvo una influencia no sólo sobre la estructura de la comunidad microbiana, sino también sobre la actividad microbiana al nivel de expresión de los genes. De esta manera, la limitación que puede presentar el uso de un cultivo mixto (la coexistencia de bacterias con diferentes vías metabólicas y que compiten por el sustrato) puede ser eludida aplicando una presión de selección sobre los microorganismos que cumplen la función deseada (Choi et al., 2016), como fue demostrado en este trabajo.

También existe la posibilidad de que la predominancia de los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus* se deba, además de a la selección por las condiciones aplicadas, al aporte de microorganismos por parte del sustrato, ya que ambos microorganismos son utilizados por la quesería Rostán como inóculo para la producción de los quesos Danbo y Colonia (comunicación personal).

Como se mencionó anteriormente, además de la producción de ácido láctico durante la operación de los reactores, también se observó su consumo (figura 6), fenómeno que también se ha reportado en otros trabajos (Kim et al., 2003; Tang et al., 2017; B. Zhang et al., 2008). Es probable que en los momentos de consumo de ácido láctico durante la operación haya aumentado la abundancia relativa de uno o más géneros presentes en el inóculo con capacidad de fermentar el ácido láctico. Como se observa en la figura 12b, *Clostridium* fue un género abundante en el inóculo, el cual presenta algunas especies capaces de consumir ácido láctico (Oshiro et al., 2010). Además, otros géneros menos abundantes, pero con capacidad de consumir ácido láctico también estuvieron presentes en el inóculo. Se encontraron ASVs con abundancia relativa  $\leq 0,2\%$  asignadas a los géneros

*Anaerovibrio*, *Propionispira*, *Selenomonas* y *Pelosinus*, los cuales tienen algunos representantes capaces de utilizar el ácido láctico en su metabolismo (Boone et al., 2001; Moe et al., 2012; Schink, 2015).



**b**

Firmicutes; Streptococcus-	0.05	90.18	1.43
Firmicutes; Lactococcus-	0.01	9.25	67.99
Proteobacteria; f__Enterobacteriaceae_ASV213-	0	0	27.76
Firmicutes; Clostridium_sensu_stricto_1-	27.35	0	0
Firmicutes; Lactobacillus-	13.06	0.01	0
Proteobacteria; Pseudomonas-	9.35	0.01	0.26
Proteobacteria; Acetobacter-	8.78	0	0
Firmicutes; Bacillus-	4.28	0	0
Actinobacteriota; Streptomyces-	3.55	0	0
Thermotogota; Defluviitoga-	3.04	0	0
Firmicutes; Sporolactobacillus-	2.35	0	0
Synergistota; uncultured-	2.1	0	0
Chloroflexi; uncultured-	1.55	0	0
Proteobacteria; f__Yersiniaceae_ASV111-	1.32	0	0
Firmicutes; Thermoanaerobacterium-	1.27	0	0
Proteobacteria; f__Yersiniaceae_ASV233-	0.97	0	0
Remaining taxa (251)-	20.96	0.54	2.55
	Inoculo	No_buffer	Buffer

Figura 12. Composición de las comunidades microbianas según el análisis de secuenciación masiva del gen del ARNr 16S. Se analizó el inóculo y las muestras con mayor producción de ácido láctico de los ensayos en batch sin buffer y con buffer. La muestra del ensayo sin buffer fue tomada a las 48 horas de la condición 4 (pH inicial 7 y 25% de inóculo) y la del ensayo con buffer a las 48 horas de la condición 3 (pH inicial 7 y 5% de inóculo). a) Abundancia relativa de las ASVs agrupadas a nivel de phylum. b) Los números representan la abundancia relativa (>1% en al menos una muestra) de las ASVs clasificadas a nivel de phylum y al mayor nivel taxonómico alcanzado de acuerdo a la metodología. Se utilizó un código de colores, donde el naranja representa los valores más altos de abundancia relativa y el celeste los más bajos.

## Conclusiones

Los resultados mostraron que la estrategia utilizada fue efectiva para seleccionar el proceso de fermentación láctica a partir de suero de queso crudo. Al utilizar buffer mejoraron varios aspectos del proceso: la concentración de ácido láctico, el rendimiento y la proporción del isómero L del ácido láctico. En dicho caso, bajo condiciones de pH inicial 7 y 5% de inóculo, la concentración máxima de ácido láctico fue de 20,1 g/L y el rendimiento máximo fue de 1,3 mol lactato/mol lactosa, valores comparables con los reportados en otros trabajos. La proporción de ácido L-láctico fue del 86,4%. Aparte de ácido láctico se detectó ácido acético y etanol, productos metabólicos que indican la ocurrencia de la vía heterofermentativa de ácido láctico. Se obtuvo una concentración y rendimiento de ácido láctico máximos a las 48 horas de la fermentación de suero de queso en batch, tanto en presencia como ausencia de buffer por lo cual se sugiere este tiempo de retención como el óptimo en estas condiciones.

El pH inicial, la concentración de inóculo y su interacción fueron factores con efecto significativo sobre el proceso, por lo que es importante tener en cuenta estos parámetros a la hora de producir ácido láctico a partir de suero de queso.

A través de las superficies de respuesta se observó que en la región estudiada, comprendida por el rango de valores elegidos de pH inicial y concentración de inóculo, no se alcanzó la región óptima de producción de ácido láctico. Sin embargo,

los resultados proporcionan una dirección hacia la optimización del proceso, ya que indican la región cercana al óptimo, que puede explorarse en futuras investigaciones.

Los resultados concuerdan con lo observado a nivel de la comunidad microbiana, ya que en las condiciones de máxima producción de ácido láctico se observó una gran selección de bacterias ácido lácticas, específicamente del género *Streptococcus* y *Lactococcus*. La predominancia de estas bacterias indica que las condiciones aplicadas fueron favorables para el desarrollo de bacterias productoras de ácido láctico.

## Capítulo II: Ensayo de fermentación semicontinua

En este capítulo, el objetivo específico fue evaluar la producción de ácido láctico a partir de suero de queso crudo a través de un proceso fermentativo semicontinuo y además evaluar diferentes tiempos de reacción para maximizar la producción de ácido láctico. También se buscó conocer los microorganismos involucrados en el proceso.

### Materiales y métodos

#### Sustrato: suero de queso

El sustrato utilizado fue, al igual que en los ensayos en batch, suero de queso crudo proporcionado por la quesería artesanal uruguaya Rostán. Se midió su pH, DQO, azúcares reductores totales, ácido láctico y SSV (tabla 12).

#### Inóculo: suero de queso fermentado

Como inóculo también se utilizó biomasa obtenida mediante la auto-fermentación del suero de queso crudo. La auto-fermentación se realizó mediante la incubación de suero de queso crudo a 30°C durante 5 días, ajustando su pH inicial a un valor de 6,5 (Ferraz et al., 2014). Al final de la fermentación se midió el pH, la concentración de ácido láctico y los SSV (tabla 12).

Tabla 12. Caracterización del sustrato e inóculo utilizados en el ensayo de producción de ácido láctico semi continua.

	Sustrato	Inóculo
DQO (g/L)	94,46	-
pH	6,5	3,6
Concentración de azúcares reductores totales (g/L)	50,74	-
Concentración de ácido láctico (g/L)	5,40	10,02
Sólidos suspendidos volátiles (g/L)	1,98	1,99

## Ensayos de fermentación

Como condición operacional se eligió aquella en la que se produjo la concentración máxima de ácido láctico en los ensayos en batch, es decir, la condición 3 con buffer, correspondiente a un valor de pH inicial de 7,0 y 5% de inóculo. El resto de las condiciones fueron las mismas que las utilizadas en los ensayos en batch, es decir, temperatura de 30°C; atmósfera anaerobia, generada mediante el desplazamiento del aire por el gaseado de los reactores con N<sub>2</sub> y mantenida a través del sellado de los mismos con tapones de goma; y agitación a 150 rpm. Se utilizaron frascos Schott de 500 mL y el volumen de trabajo fue de 100 mL. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El estudio se llevó a cabo en el equipo AMPTS® II (BPC Instruments) (figura A1). Este cuenta con una unidad de incubación, un baño de agua donde se colocan hasta 15 reactores a la temperatura de incubación deseada; una unidad de fijación de CO<sub>2</sub>, en la que el biogás producido atraviesa una solución alcalina (NaOH 3 M) donde reaccionan el CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S dejando pasar solamente el CH<sub>4</sub> y el H<sub>2</sub> hacia la última unidad, que es la unidad de monitoreo o medición del biogás, la cual registra el volumen de gas producido de acuerdo a un principio de desplazamiento de líquido y flotación del gas que atraviesa las celdas. Además, el equipo cuenta con un sistema de agitación.

La operación semicontinua de los reactores se llevó a cabo mediante ciclos secuenciales, cada uno de los cuales constó de las siguientes 4 etapas (figura 13):

- Reacción: etapa durante la que ocurre el proceso de fermentación, bajo las condiciones operacionales mencionadas.
- Sedimentación: tiempo en el que se detiene la agitación del sistema para que la biomasa sedimente al fondo del reactor (aproximadamente 10 minutos).
- Descarga: se retiran 95 mL de suero fermentado.
- Alimentación: se adicionan 95 mL de sustrato nuevo con su valor de pH ajustado a pH 7 mediante NaHCO<sub>3</sub>.

Tanto la descarga como la alimentación se realizaron sin destapar los reactores, para evitar la exposición al O<sub>2</sub> durante la manipulación. La entrada y salida de

líquido se realizó a través de un tubo de goma previamente colocado que conecta el exterior con el interior del reactor, posibilitando la toma de muestra sin necesidad de abrir los reactores. Dicho caño fue cerrado luego de ser utilizado, para evitar la entrada de aire al reactor durante la operación. De todas maneras, una vez finalizada la alimentación, los reactores se volvieron a gasear con  $N_2$  para desplazar el  $O_2$  que accidentalmente pudo haber entrado.

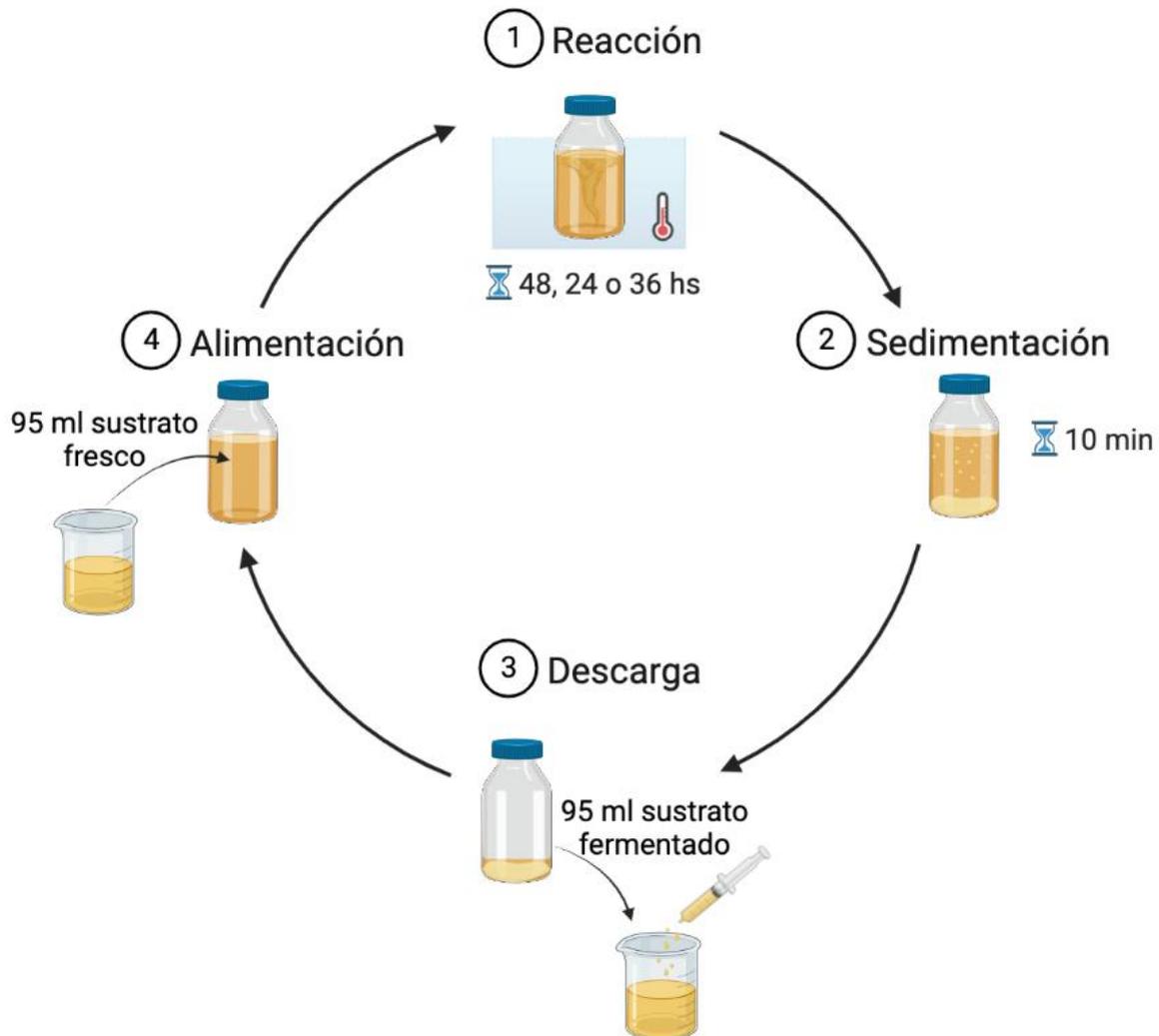


Figura 13. Etapas de cada ciclo de la fermentación semicontinua. Imagen creada con BioRender.

Se probaron diferentes duraciones de la etapa de reacción. Al comienzo de la operación se optó por una duración de 48 horas, correspondiente al periodo de tiempo en el que se produjo la concentración máxima de ácido láctico en el ensayo en batch. Luego, se redujo el tiempo de reacción a 24 horas, para analizar la

producción de ácido láctico semicontinua con intervalos menores de tiempo entre alimentación y alimentación. Debido a la reacción observada en el sistema, se retomó el tiempo de reacción de 48 horas. Finalmente, se probó un tiempo intermedio de 36 horas. El tiempo total de operación de los reactores fue de 48 días. De esta manera la operación estuvo dividida en 4 fases, cada una de ellas caracterizada por una determinada duración de la etapa de reacción.

Para el armado de cada reactor se utilizaron 95 mL de suero de queso crudo como sustrato y 5 mL de inóculo. El pH de la mezcla se ajustó a 7 con  $\text{NaHCO}_3$ . Una vez armados y gaseados con  $\text{N}_2$ , los tres reactores (réplicas) se colocaron en el baño de agua del equipo AMPTS II, el cual se ajustó a la temperatura deseada ( $30^\circ\text{C}$ ). Los reactores se conectaron a la trampa de  $\text{CO}_2$  y esta a la unidad de detección de gas. Se puso en marcha el sistema de agitación que incluye el equipo, dando así inicio a la operación, específicamente a la etapa de reacción.

A partir de la mezcla de fermentación descargada en la etapa 3 de cada ciclo, se tomaron muestras para analizar la concentración de los azúcares reductores totales, ácido láctico total y sus isómeros D y L, ácidos grasos volátiles y etanol. También se tomaron muestras de biogás a partir de las trampas de  $\text{CO}_2$  para determinar su composición. Además, se seleccionaron muestras de la biomasa de los reactores para el análisis de su comunidad microbiana por secuenciación masiva del gen del ARNr 16S.

## Cálculos y métodos analíticos

La concentración de azúcares reductores totales, el pH, la DQO, los sólidos suspendidos volátiles y los ácidos grasos volátiles y etanol se determinaron de la misma forma descrita en el capítulo I.

El ácido láctico total y sus isómeros (ácido D y L-láctico) se determinaron mediante el servicio de HPLC ofrecido en la Plataforma de Química Analítica del IIBCE. El equipo y la columna para la cuantificación de los isómeros fueron los mismos que los detallados en el capítulo anterior. Para el análisis del ácido láctico total se utilizó el mismo HPLC Waters con detector de arreglo de diodos pero con una columna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%). La composición del biogás se

analizó mediante un cromatógrafo de gases (SRI 310C Gas Chromatograph) equipado con una columna 6 Hayesep-D column (SRI Instruments, CA, USA) y un detector TCD.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Past4.

## Análisis de la comunidad microbiana

La comunidad microbiana se estudió mediante el análisis de secuenciación masiva del gen del ARNr 16S. La metodología para realizar este análisis fue la misma que la descrita en la sección “Análisis de la comunidad microbiana” del capítulo I.

Las muestras seleccionadas para dicho análisis fueron el inóculo y las muestras de las réplicas biológicas 2 y 3 correspondientes a los días 16, 26, 29, 34, 40 y 46 de operación. Además, a raíz de los resultados obtenidos del análisis de la comunidad microbiana en el capítulo I, se decidió analizar el sustrato para evaluar su contribución a la comunidad microbiológica.

## Resultados y discusión

### Producción de ácido láctico

A través del sistema fermentativo de alimentación semicontinua a partir de suero de queso crudo se produjo ácido láctico a lo largo de la operación en los tres reactores estudiados

Se determinó la concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico y se analizó la diferencia en los valores obtenidos entre las tres réplicas biológicas a través del test de Tukey. No se observaron diferencias significativas entre las réplicas (tabla A4), lo que puede considerarse como positivo, ya que indica que el proceso fue reproducible. De esta manera, se prosiguió con los análisis en base al promedio de los valores obtenidos en las réplicas.

En la figura 14 se muestra el promedio de la concentración de ácido láctico junto con su correspondiente desvío estándar a lo largo de la operación. Se observó que durante la fase 1, donde la etapa de reacción tuvo una duración de 48 horas, se produjo una concentración máxima de ácido láctico de  $29,2 \pm 2,2$  g/L. Al cambiar la

etapa de reacción a 24 horas en la fase 2, la concentración de ácido láctico disminuyó, alcanzando valores mínimos de  $0,08 \pm 0,1$  g/L. Durante esta fase se registraron las concentraciones de ácido láctico más bajas de toda la operación. De todas formas, hacia el final de esta etapa se observó una tendencia al aumento de la concentración de ácido láctico. La disminución en la producción de ácido láctico y su posterior aumento durante la fase 2 podría deberse a la selección de distintas vías metabólicas debido a la menor duración del tiempo de reacción. Al pasar a la fase 3, donde de nuevo la duración de la etapa de reacción fue 48 horas, se observó un aumento en la concentración de ácido láctico, alcanzando valores como los registrados en la fase 1. El valor máximo de concentración de ácido láctico en esta fase fue  $27,6 \pm 1,6$  g/L. El hecho de que la producción de ácido láctico disminuyera durante la fase 2, pero lograra retomar la producción de la fase 1 al volver a aplicar ciclos de 48 horas, demostró que el sistema también tuvo la capacidad de recuperarse. Por último, durante la fase 4, donde la etapa de reacción tuvo una duración intermedia de 36 horas, se registró la mayor concentración de ácido láctico de toda la operación, de  $32,7 \pm 11,7$  g/L (tabla 13). Sin embargo, luego de dicho momento de producción máxima se observó una disminución de la concentración de ácido láctico. Además de la concentración máxima de ácido láctico, en la fase 4 también se obtuvo el rendimiento y la productividad máxima de ácido láctico, siendo  $2,5 \pm 0,9$  mol ácido láctico/mol lactosa disponible y  $0,91$  g ácido láctico/L/h, respectivamente (tabla 13).

Excepto por la fase 2, el rendimiento máximo de ácido láctico en el resto de las fases fue mayor a 2 mol ácido láctico/mol lactosa disponible (tabla 13), lo que indica que, al menos en dichas fases, no sólo se habría consumido glucosa, sino también la galactosa de la lactosa, ya que el rendimiento teórico máximo a partir de la glucosa es 2 mol/mol mientras que a partir de la lactosa es 4 mol/mol. Esto representa que en el sistema hubo un buen aprovechamiento de la fuente de carbono disponible, es decir la lactosa del suero de queso, lo que se tradujo en valores de rendimiento de ácido láctico altos.

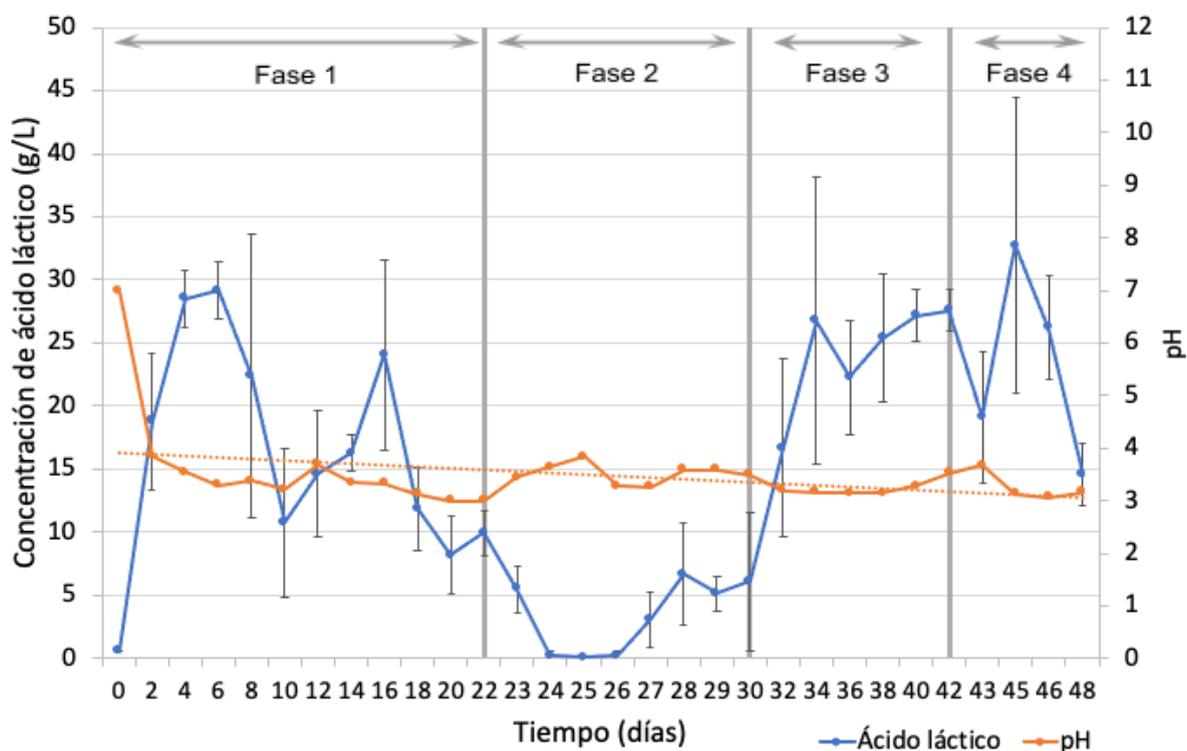


Figura 14. Concentración de ácido láctico durante los 48 días de operación del ensayo de producción en modo semicontinuo. Se muestra el promedio de la concentración de ácido láctico de las tres réplicas biológicas y su desvío estándar. También se muestra el promedio del valor de pH y su línea de tendencia. Se indican las 4 fases de la operación, correspondientes a diferentes duraciones de la etapa de reacción: 48, 24, 48 y 36 horas, respectivamente.

Tabla 13. Concentración, rendimiento y productividad promedio y máxima de ácido láctico en cada una de las fases del experimento de producción de ácido láctico a partir de suero de queso en modo semicontinuo. Además se indica la duración de la etapa de reacción y el número de ciclos de cada fase.

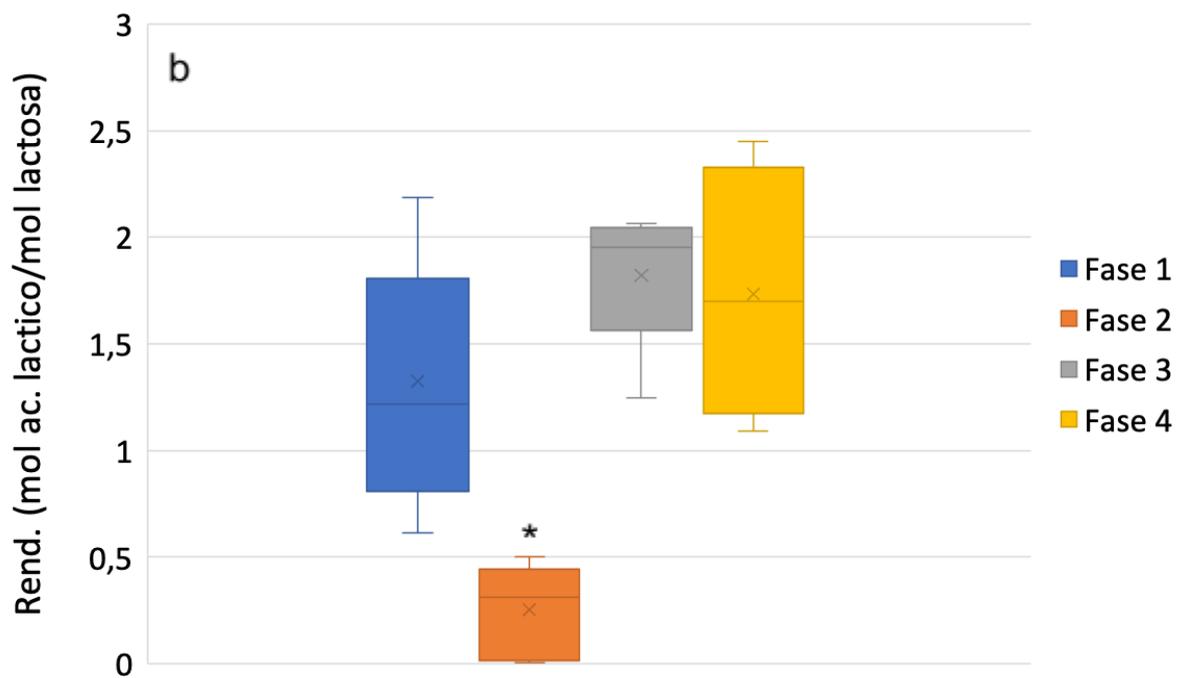
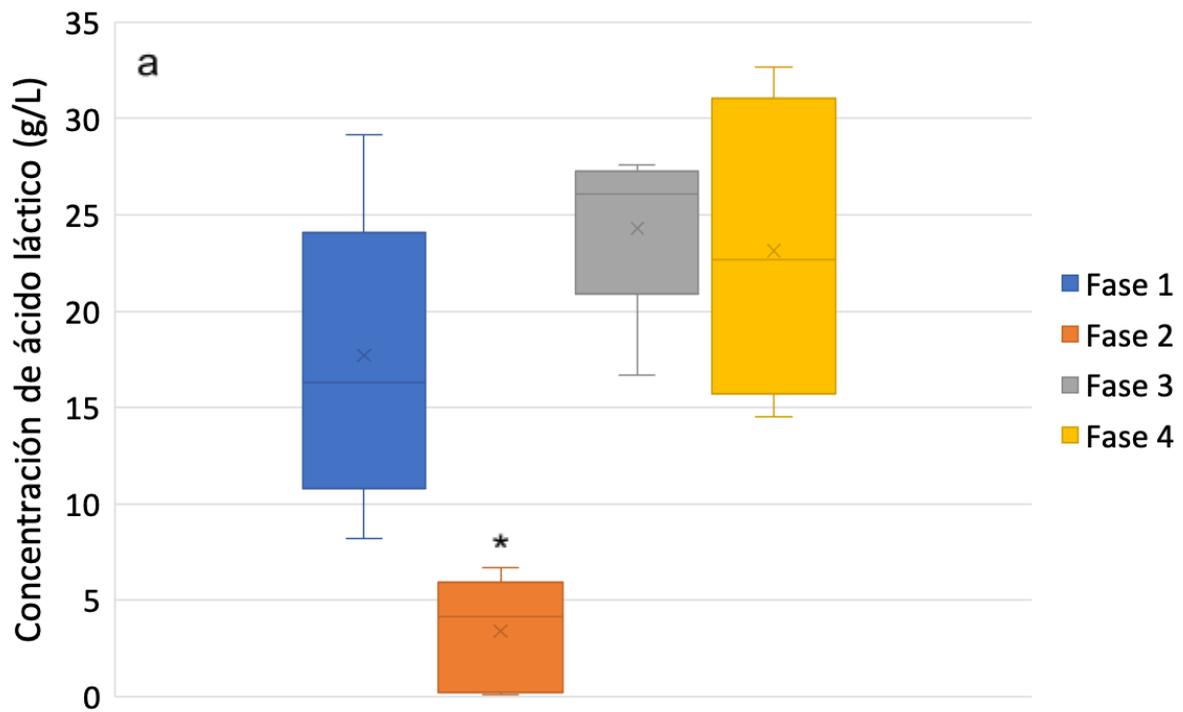
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Reacción (horas)	48	24	48	36
Ciclos	11	8	6	4
[AL] (g/L) promedio	17,7 ± 6,1	3,4 ± 1,1	24,3 ± 3,1	23,1 ± 6,1
[AL] (g/L) máxima	29,2 ± 2,2	6,7 ± 4,0	27,6 ± 1,6	32,7 ± 11,7
Rendimiento <sup>a</sup> promedio	1,3 ± 0,6	0,3 ± 0,2	1,8 ± 0,6	1,7 ± 0,6

Rendimiento <sup>a</sup> máximo	2,2 ± 0,2	0,5 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,9
Productividad promedio (g/L/h)	0,37 ± 0,2	0,14 ± 0,1	0,51 ± 0,09	0,64 ± 0,1
Productividad máxima (g/L/h)	0,61 ± 0,04	0,28 ± 0,17	0,58 ± 0,03	0,91 ± 0,33

---

[AL] concentración de ácido láctico, <sup>a</sup> mol ácido láctico/mol lactosa disponible.

Las diferencias entre fases en cuanto a concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico se evaluaron a través del test de Tukey. Se observó que no se encontraron diferencias entre los valores de concentración y rendimiento de ácido láctico obtenidos en las fases 1, 3 y 4 (figura 15, tabla A5). La fase 2 en cambio, presentó diferencias significativas con el resto de las fases, por lo que se puede decir que en este experimento al aplicar un tiempo de reacción entre 36 y 48 horas se obtuvo una producción y un rendimiento de ácido láctico mayor que al utilizar un tiempo de reacción de 24 horas. En el caso de la productividad, las fases 1 y 3 no presentaron diferencias significativas entre sí, mientras que la fase 2 presentó diferencias significativas con el resto de las fases y también la fase 4 presentó diferencias significativas con las fases 1 y 3 (figura 15, tabla A5). Esto quiere decir que, para el caso de la productividad de ácido láctico en este experimento, la mayor productividad ocurrió al aplicar una etapa de reacción de 36 horas, mientras que la menor productividad se dio con etapas de reacción de 24 horas. Estos resultados indican que en este experimento de producción de ácido láctico a partir de suero de queso y un modo de fermentación semicontinuo, un tiempo de reacción entre 36 y 48 horas fue más beneficioso para la producción de ácido láctico.



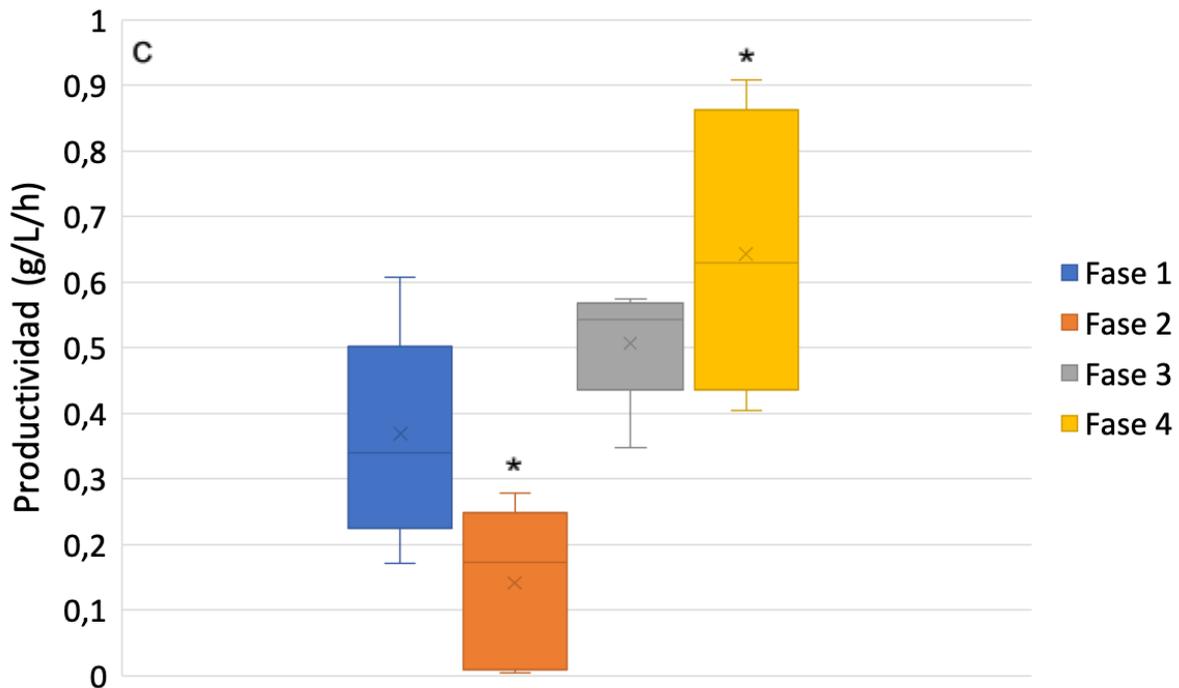


Figura 15. a) Concentración, b) rendimiento y c) productividad de ácido láctico obtenida en cada una de las fases de la producción de ácido láctico en forma semicontinua. El asterisco indica las fases que presentaron diferencias significativas con respecto al resto de las fases. La línea dentro de la caja indica la mediana y la cruz la media. Fase 1: 48 horas de reacción. Fase 2: 24 horas de reacción. Fase 3: 48 horas de reacción. Fase 4: 36 horas de reacción.

Para identificar el tiempo de reacción necesario para obtener los valores máximos teóricos de concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico (en el marco del ensayo llevado a cabo, considerando las condiciones aplicadas), se ajustó una función polinomial a los datos experimentales (figura 16), obteniendo las siguientes ecuaciones (ec. 8, ec. 9 y ec. 10, respectivamente):

$$\text{Concentración} = -0,077 (\text{tiempo})^2 + 6,183 (\text{tiempo}) - 101,4 \quad (8)$$

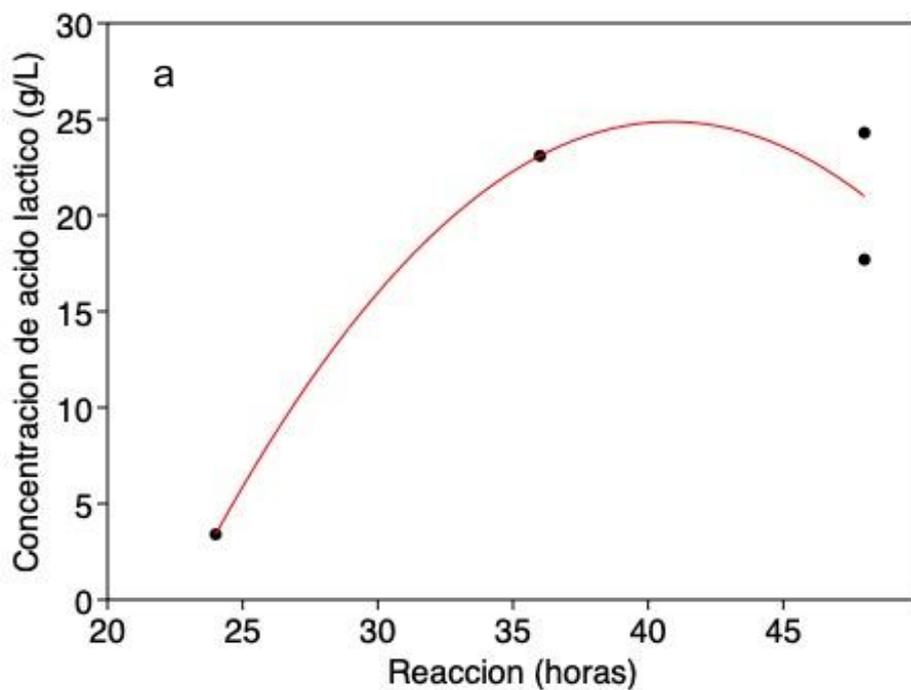
$$\text{Rendimiento} = -0,005 (\text{tiempo})^2 + 0,440 (\text{tiempo}) - 7,15 \quad (9)$$

$$\text{Productividad} = -0,002 (\text{tiempo})^2 + 0,177 (\text{tiempo}) - 2,85 \quad (10)$$

Para el ajuste de los datos a la función polinomial, se utilizó el promedio por fase de la concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico, mostrado en la tabla

13. En los tres casos se obtuvo un buen ajuste del modelo ( $R^2=92\%$ ,  $R^2=91\%$  y  $R^2=96\%$ , respectivamente).

Según las ecuaciones obtenidas, se alcanzan valores máximos de concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico cuando la duración de la etapa de reacción es de 40,2, 44 y 44,3 horas, respectivamente. Estos valores óptimos estimados de concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico fueron 22,7 g/L, 2,5 mol ácido láctico/mol lactosa y 1,1 g/L/h, respectivamente, los cuales son cercanos a los que fueron obtenidos experimentalmente. De todas formas, para afirmar estos resultados sería necesario corroborar los valores estimados por el modelo de forma experimental.



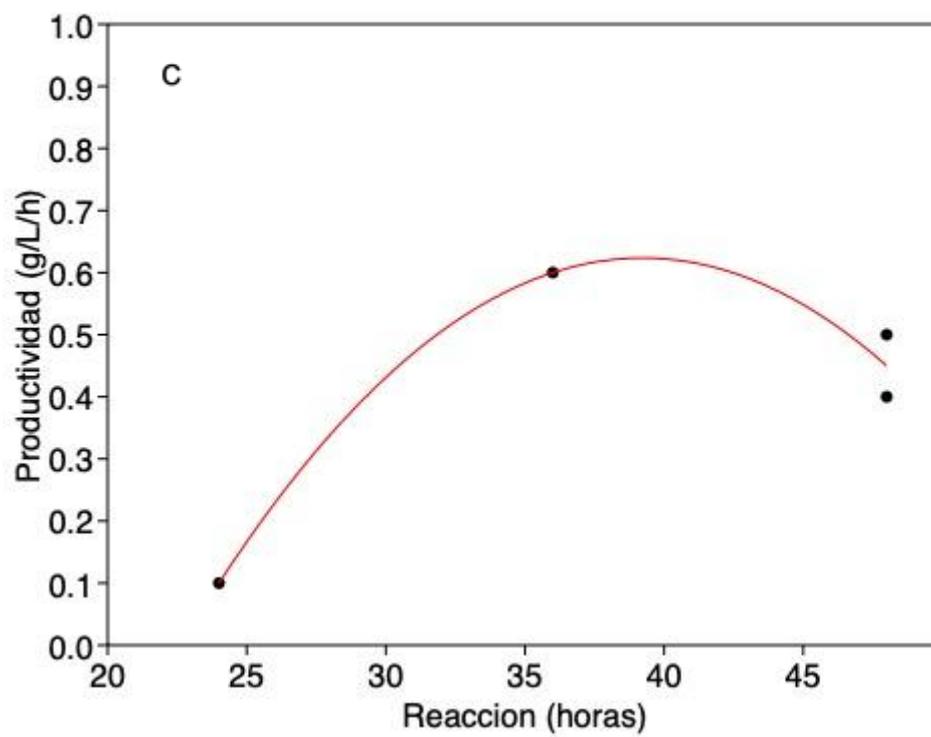
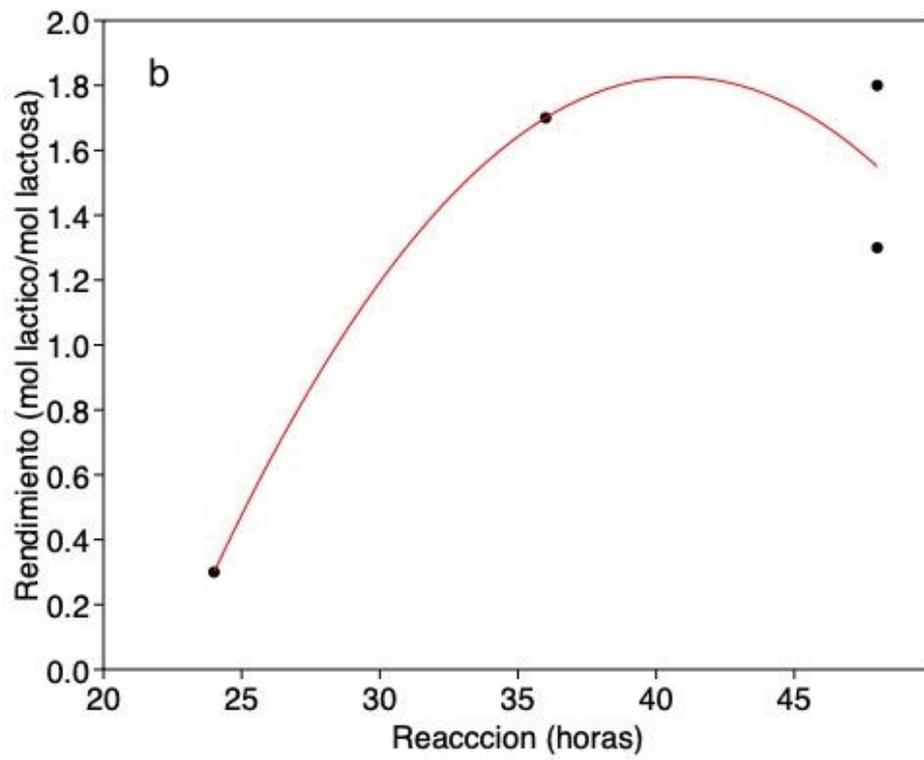


Figura 16. Correlación entre a) concentración, b) rendimiento y c) productividad de ácido láctico y el tiempo de duración de la etapa de reacción en el ensayo de producción semicontinua de ácido láctico.

En cuanto al comportamiento del pH, en cada alimentación el sustrato se agregó al reactor con un pH de 7 ajustado con buffer ( $\text{NaHCO}_3$ ). A pesar de ello el pH se mantuvo a lo largo de la operación en valores promedio entre 3,0 y 3,8 (figura 14). Esto indicó que la rápida producción de ácidos disminuyó el pH a valores ácidos luego de cada alimentación, causando que el pH adopte un valor de alrededor de pH 3,0 de forma casi constante a lo largo de toda la operación.

En cuanto a la comparación de los resultados obtenidos en este ensayo con los reportes en la bibliografía, se observó que son comparables con otros trabajos que también optaron por un modo semicontinuo de fermentación para producir ácido láctico (tabla 14).

Luongo et al., (2019), de forma similar a este trabajo, fermentaron durante 136 días suero de queso a través de una comunidad mixta proveniente de digestato anaerobio (pre tratado térmicamente para inhibir los microorganismos metanogénicos) obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales. La fermentación fue llevada a cabo a  $35^\circ\text{C}$  y sin corrección de pH, por lo que este parámetro alcanzó un valor aproximado de pH 3,8 a lo largo de toda la operación. Como resultado obtuvieron una concentración máxima de ácido láctico de 20,1 g/L y una productividad de ácido láctico máxima de 0,44 g/L/h. En ambos trabajos quedó demostrado que es posible producir ácido láctico a partir de suero de queso en condiciones ácidas de pH, contrario a lo que generalmente es reportado en cuanto al pH óptimo para la producción de ácido láctico, que suele ser un pH entre 5,5 y 5,9 (Luongo et al., 2019). Cabe destacar que en este trabajo la concentración y la productividad máxima de ácido láctico fueron aún mayores, siendo  $32,7 \pm 11,7$  g/L y  $0,91 \pm 0,33$  g/L/h, respectivamente.

Otros estudios que utilizaron un residuo diferente al suero de queso como sustrato para la producción semicontinua de ácido láctico, también obtuvieron concentraciones de ácido láctico menores. Por ejemplo, Bonk et al. (2017), utilizando residuo artificial de alimentos como sustrato, sin control de pH y a  $35^\circ\text{C}$  obtuvieron una concentración máxima de ácido láctico de 18,6 g/L. Al no controlar el

pH, este parámetro alcanzó un valor de 2,96. Los autores observaron que dicha concentración de ácido láctico fue menor que la reportada en otros trabajos de producción de ácido láctico con control de pH y plantearon que esto se debió a la mayor inhibición por producto a bajo pH. Otro ejemplo es el de Wu et al 2015, quienes fermentando residuos de frutas y verduras a pH 4 y 35°C obtuvieron una concentración de ácido láctico de 20 g/L. Por otro lado, también se han reportado concentraciones mayores de ácido láctico, como lo observado en el trabajo de Tang et al. (2016), que a través de la producción semicontinua de ácido láctico a partir de residuos de alimentos sin la adición de inóculo, a 37°C y ajustando el pH a 6 de forma intermitente cada 12 horas obtuvieron una concentración máxima de ácido láctico de 37,6 g/L. Lo mismo ocurrió en el trabajo de Akao et al. (2007), quienes aplicando un valor constante de pH 6, condiciones termófilas (55°C) y utilizando basura artificial como sustrato y cultivo fermentado de otro reactor acidogénico termófilo como inóculo obtuvieron una concentración media de ácido láctico de 39,6 g/L.

Tabla 14. Comparación de los valores obtenidos con otros estudios de producción de ácido láctico semicontinua. Se indica el inóculo, sustrato, pH, temperatura, rendimiento máximo y concentración máxima ([AL]) de ácido láctico reportada en cada trabajo.

<b>Inóculo</b>	<b>Sustrato</b>	<b>pH</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>[AL] (g/L)</b>	<b>Referencia</b>
Lodo anaerobio	Residuo artificial de alimentos	2,96	35	-	18,6	Bonk et al., 2017
Microorganismos nativos del sustrato	Residuos de alimentos	6 (ajuste cada 12 horas)	37	0,43 g/g-ST <sup>a</sup>	37,6	Tang et al., 2016
Cultivo fermentado de reactor acidogénico	Basura artificial	6	55	0,73 ± 0,13 g/g carbohidratos iniciales	39,6 ± 4,6	Akao et al., 2007
Lodo anaerobio	Desecho artificial de	4	35	-	20	Wu et al., 2015

fruta y  
verdura

---

Digestato anaerobio	Suero de queso	No controlado	35	0,37 g ácido láctico/g DQO	20,1	Luongo et al., 2019
Suero de queso auto fermentado	Suero de queso	7 (ajustado)	30	2,5 ± 0,9 mol ac. láctico/mol lactosa	32,7 ± 11,7	Este trabajo

---

<sup>a</sup> ST = sólidos totales.

En comparación con los ensayos realizados en batch en este trabajo, a través del modo de fermentación semicontinua se obtuvo una mayor concentración y rendimiento de ácido láctico. Esto podría deberse a que el modo de operación semicontinuo, al implicar la descarga del líquido de fermentación con alta concentración de productos metabólicos a intervalos regulares de tiempo, haya disminuido el efecto de la inhibición de la fermentación por producto (Singhvi et al., 2018).

Por falta de tiempo no fue posible analizar los isómeros D y L producidos en estos experimentos lo que se realizará en el futuro.

### Producción de ácidos grasos volátiles y etanol

Las muestras seleccionadas para la determinación de ácidos grasos volátiles y etanol fueron las correspondientes a los días 16, 26, 29, 34, 40 y 46 de operación de las réplicas 2 y 3. En dichas muestras, además de ácido láctico también se detectaron ácidos grasos volátiles y etanol pero en concentración mucho menor (tabla 15). De estos productos metabólicos el ácido acético y el etanol fueron los principales. La producción de ácido acético y etanol además de ácido láctico también se observó en otros sistemas de producción semicontinua de ácido láctico (Luongo et al., 2019). Estos resultados indican que durante el proceso ocurrió la vía heterofermentativa de producción de ácido láctico.

Además de ácido acético se detectaron otros ácidos grasos volátiles, específicamente ácido caproico, ácido heptanoico y ácido isocaproico (tabla 15). Sin embargo, estos se detectaron en concentraciones muy bajas, menores a 0,16 g/L.

En comparación con los ácidos grasos volátiles y el etanol producido, el ácido láctico fue el producto mayoritario, lo que indica que el proceso tuvo una buena selectividad del producto buscado. La alta selectividad del ácido láctico es una característica importante y ventajosa de la fermentación, ya que facilita la separación y purificación de dicho ácido del líquido de fermentación al final del proceso (Komesu et al., 2017).

Tabla 15. Ácido láctico, ácidos grasos volátiles y etanol. Todos los compuestos se muestran en g/L.

Día	Fase	Reactor	Ácido láctico	Ácido acético	Etanol	Ácido caproico	Ácido heptanoico	Ácido isocaproico
16	1	2	35,6	0,68	1,27	< 0,15	< 0,16	< 0,15
		3	51,1	0,35	0,70	< 0,15	< 0,16	nd
26	2	2	6,01	0,44	1,52	< 0,15	< 0,16	nd
		3	2,99	0,34	4,48	< 0,15	< 0,16	nd
29	2	2	9,20	0,94	2,45	< 0,15	< 0,16	nd
		3	1,20	0,46	3,84	< 0,15	< 0,16	nd
34	3	2	29,7	1,60	2,89	< 0,15	< 0,16	nd
		3	44,6	1,00	2,97	< 0,15	< 0,16	< 0,15
40	3	2	34,8	1,09	0,76	< 0,15	< 0,16	nd
		3	31,9	1,74	0,32	< 0,15	< 0,16	nd
46	4	2	28,2	1,79	0,37	< 0,15	< 0,16	nd
		3	63,7	1,64	0,61	< 0,15	< 0,16	nd

nd: no detectado

### Producción de biogás

Al culminar cada etapa de reacción se tomó una muestra de gas y se analizó su composición por cromatografía de gases. En general, el proceso no se caracterizó por la producción de hidrógeno o metano. Únicamente en la primera toma de muestra, correspondiente al día 2 de operación, se detectó producción de metano. La ausencia de este gas durante el resto de la operación probablemente se debió al pH ácido, ya que la inhibición de la metanogénesis es uno de los principales efectos del pH bajo en las fermentaciones (Wang et al., 2014). Una alta actividad metanogénica requiere un pH mínimo de 6,5 (Wang et al., 2014). También, en los días de operación 4, 12 y 25, en algunos reactores, se detectó producción de hidrógeno. Por problemas técnicos no se pudo determinar el volumen producido. La

producción de este gas se reportó anteriormente en sistemas fermentativos operados a pH ácido (Ferraz et al., 2021; Mota et al., 2018).

### Análisis de la comunidad microbiana

A partir de todas las muestras analizadas se obtuvieron 8.120.506 secuencias parciales del gen del ARNr 16S. Al igual que como ya fue descrito, los reads se agruparon en ASVs y se clasificaron taxonómicamente. Luego del filtrado de los taxones de no interés, las muestras se normalizaron en base a la muestra con menor número de reads (4302 reads) para continuar con los análisis.

Como resultado se observó que predominó el phylum Firmicutes, con una abundancia relativa mayor al 86,4% en todas las muestras (figura 17a). El phylum Proteobacteria también estuvo presente, siendo el inóculo la muestra con mayor abundancia relativa de este phylum (7,7%).

A nivel de género, en el sustrato predominaron los géneros *Streptococcus* (65,5%) y *Lactococcus* (29,1%) (figura 17b), resultado que coincide con la información provista por la quesería Rostán, ya que utilizan estos microorganismos como inóculo para hacer algunos tipos de queso, como el Colonia o Danbo. En el inóculo, el género con mayor abundancia relativa fue *Lactobacillus* (41,6%), seguido de *Lactococcus* (38,1%) (figura 17b). También estuvieron presentes otras bacterias ácido lácticas, pero en menor abundancia relativa, como *Streptococcus* (2,9%), *Leuconostoc* (0,3%) y *Lentilactobacillus* (0,1%), además de otras bacterias no pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas como *Pseudomonas* (6,5%). A diferencia del inóculo generado para los ensayos en batch, el cual fue auto fermentado durante 16 días, el inóculo usado en el ensayo de producción semicontinua se produjo tras la auto fermentación de suero de queso por un tiempo menor, específicamente 5 días. Los resultados de análisis de secuenciación masiva mostraron que el segundo inóculo estuvo principalmente compuesto por bacterias ácido lácticas, mientras que el inóculo de los ensayos en batch estuvo dominado por microorganismos del género *Clostridium*, los cuales no producen ácido láctico e incluso pueden consumirlo. De esta manera, se podría concluir que un menor tiempo de auto fermentación fue más beneficioso para obtener un inóculo enriquecido en bacterias

ácido lácticas, lo cual es positivo ya que un menor periodo de tiempo tiene ventajas económicas y técnicas a la hora de pensar en la aplicabilidad del proceso.

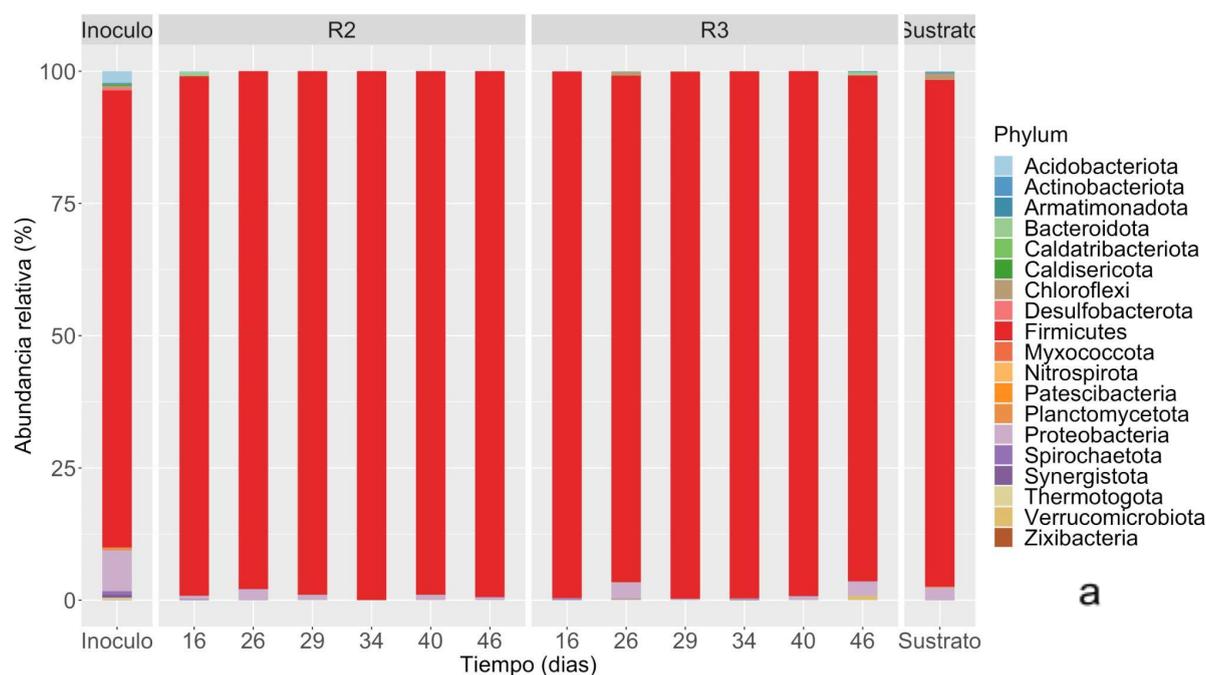
Al igual que lo encontrado en el ensayo en batch, el inóculo fue la muestra más diversa en cuanto a los géneros encontrados, observándose también que a lo largo de la operación ocurrió una gran selección sobre la comunidad microbiana. En este caso se seleccionó el género de bacteria ácido láctica *Lactobacillus*, alcanzando abundancias relativas mayores al 90% en las muestras (figura 17b). Otros estudios de producción de ácido láctico con comunidades mixtas también han observado la dominancia del género *Lactobacillus*, con abundancias relativas también mayores al 90% (Bonk et al., 2017; Tang et al., 2016; Wu et al., 2015). Por ejemplo, Tang et al. (2016) observaron que antes de la fermentación la comunidad microbiana fue más diversa, mientras que *Lactobacillus* fue la bacteria dominante en la mezcla de fermentación, representando el 99,29% de la abundancia relativa. Como ya se mencionó, Tang et al. (2016) estudiaron la producción semicontinua de ácido láctico a partir de residuos de alimentos sin la adición de inóculo, a 37°C y ajustando el pH a 6 de forma intermitente cada 12 horas, obteniendo una concentración máxima de ácido láctico de 37,6 g/L, muy similar a la obtenida en este trabajo. Los autores plantearon que la acumulación selectiva de *Lactobacillus* se benefició del ajuste intermitente del pH, ya que luego del ajuste a pH 6, se produjo ácido láctico y el pH disminuyó a valores menores a 4 en 4-5 horas, lo que inhibió el crecimiento de otras bacterias. Por lo tanto, en el presente trabajo la selección de *Lactobacillus* y la producción de ácido láctico también se podrían haber beneficiado del ajuste intermitente de pH 7, debido a la posterior acidificación del medio por la producción de ácido láctico y la subsecuente inhibición de otros microorganismos diferentes a *Lactobacillus*. De esta manera, a pesar de haber utilizado una comunidad microbiana mixta como inóculo y haber llevado a cabo el proceso en condiciones no estériles, la comunidad microbiana de los reactores se comportó de forma similar a un cultivo puro.

En un estudio donde se utilizó un cultivo puro de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para la fermentación de suero de queso desproteínizado, se obtuvo una concentración máxima de ácido láctico de 30,7 g/L (Shene & Bravo, 2007), valor muy similar al encontrado en este trabajo a través de la fermentación semicontinua de suero de queso crudo. Además, los autores observaron que una fracción

significativa de la galactosa fue metabolizada y que el proceso fue heterofermentativo ya que también detectaron ácido acético y etanol, resultados que también concuerdan con los obtenidos en este trabajo. De esta manera, la predominancia del género *Lactobacillus*, puede explicar los valores de concentración y rendimiento de ácido láctico y los productos metabólicos producidos además del ácido láctico, es decir ácido acético y etanol. Esto se debe a que varias especies del género *Lactobacillus*, como *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. helveticus*, tienen la capacidad metabólica de fermentar la galactosa (Shene & Bravo, 2007; Turner & Martley, 1983; Zhang et al., 2020), lo que puede explicar los rendimientos mayores a 2 mol/mol obtenidos en este trabajo. Además, el género está compuesto por especies que realizan heterofermentación, produciendo ácido acético y etanol además de ácido láctico, por ejemplo *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Shene & Bravo, 2007).

En los días 26 y 29 de los reactores 2 y 3, respectivamente, se observó una comunidad microbiana diferente, no dominada únicamente por *Lactobacillus*, sino también por *Lactococcus* y *Streptococcus* en proporciones semejantes a las encontradas en el sustrato. Este período fue en el cual se produjo la menor cantidad de ácido láctico, lo que indica que este cambio en la comunidad no fue beneficioso para el proceso. Los géneros de microorganismos que predominaron durante el período de menor producción coinciden con los géneros dominantes en la muestra del suero de queso crudo, esto indicaría que durante este período el menor tiempo de reacción favoreció a los microorganismos introducidos con el sustrato. Una posible explicación es que los microorganismos del género *Lactobacillus* necesitan un mayor tiempo para poder desarrollarse.

Al volver a la operación inicial, la comunidad nuevamente vuelve a estar dominada por *Lactobacillus*. Esto indica que la selección sobre dicho género fue predominante en los reactores y que la comunidad microbiana se enriquece en este microorganismo a pesar de las perturbaciones o los cambios que puedan ocurrir. Esta observación indica que la comunidad microbiana fue robusta, y coincide con la reproducibilidad y la capacidad de recuperación que mostró el sistema. Esta característica de la comunidad microbiana es aún más interesante al recordar que proviene de un inóculo mixto y de un proceso que operó a base de un residuo y que se desarrolló en condiciones no estériles.



**b**

	Inoculo	R2						R3						Sustrato
		16	26	29	34	40	46	16	26	29	34	40	46	
Lactobacillus	41.6	98.2	32.4	97.9	99.9	98.4	99.2	99.2	93	34.5	97.8	98.2	93.8	0.9
Streptococcus	2.9	0	48.5	0.4	0	0	0.2	0.1	0.7	38.4	0.7	0	1.7	65.5
Lactococcus	38.1	0	16.5	0.2	0	0.1	0	0	0.7	21.3	0.8	0.4	0	29.1
Pseudomonas	6.5	0	0.3	1	0	0.9	0.6	0	0.1	0.3	0.1	0.8	0	0.6
Lentilactobacillus	0.1	0	0.1	0.4	0.1	0.2	0	0	0.9	2.5	0.2	0.1	0	0
uncultured	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	1.3
Aminicenantales	2.2	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enterococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.1	0	0	0
Leuconostoc	0.3	0.1	0	0	0	0.1	0	0	0.3	0.3	0	0.4	0	0.2
Remaining taxa (119)	7.6	1.5	2.2	0	0	0.1	0	0.5	3.8	0.7	0.4	0	4.5	2.5

Figura 17. Composición de las comunidades microbianas según el análisis de secuenciación masiva del gen del ARNr 16S. Se analizó el inóculo, el sustrato y las muestras de los reactores 2 y 3 correspondientes a los días de operación 16, 26, 29, 34, 40 y 46. a) Abundancia relativa de las ASVs agrupadas a nivel de phylum. b) Los números representan la abundancia relativa (>1% en al menos una muestra) de las ASVs clasificadas a nivel de phylum y al mayor nivel taxonómico posible. Se utilizó un código de colores, donde el naranja representa los valores más altos de abundancia relativa y el celeste los más bajos.

## Conclusiones

Se demostró que fue posible producir ácido láctico en alta concentración a partir de suero de queso a través de una comunidad mixta de microorganismos en condiciones mesófilas de temperatura y sin la necesidad de mantener condiciones estériles. Además, el suero de queso fue utilizado crudo, directamente como fue enviado por la quesería, sin suplementación nutricional, hidrólisis o desproteización lo que significa una gran ventaja para la aplicación de este proceso. El inóculo fue generado a partir del mismo suero de queso a través de un sencillo proceso de auto fermentación, el cual tuvo como resultado el enriquecimiento en bacterias ácido lácticas, demostrando que no es necesario su pretratamiento térmico para inhibir microorganismos no deseados.

El modo de fermentación semicontinuo no había sido probado anteriormente en el grupo de investigación de LEM, quedando demostrado en este trabajo que fue una estrategia efectiva para la producción fermentativa de ácido láctico a partir de suero de queso, la cual también se puede extender a otros procesos fermentativos.

No sólo se obtuvo una buena concentración, sino también un buen rendimiento y productividad de ácido láctico. Además, el proceso de producción demostró ser reproducible y presentar la capacidad de recuperación tras cambios en la duración de la etapa de reacción, observándose que la producción de ácido láctico se maximizó al aplicar ciclos de 36 a 48 horas de duración.

Además de ácido láctico, se detectó la producción de ácido acético y etanol, lo que indica que la vía heterofermentativa estuvo presente en el sistema, aunque en una baja proporción.

A pesar de que se utilizó un inóculo con una comunidad mixta de microorganismos se seleccionó un solo género de bacteria ácido láctica en gran proporción durante el proceso, lo que demuestra que no es necesario trabajar con cultivos puros. El género seleccionado fue *Lactobacillus*, una bacteria ácido láctica presente en numerosos sistemas de producción de ácido láctico. Esta bacteria es capaz de producir ácido láctico en la concentración obtenida en este trabajo, tanto a través de la vía homofermentativa como heterofermentativa, por lo que puede explicar los resultados obtenidos.

## Conclusiones generales y perspectivas

Este trabajo de maestría se destaca por haber demostrado la factibilidad de producir ácido láctico, un compuesto químico con una amplia variedad de aplicaciones y una creciente demanda, a partir de suero de queso, un residuo industrial generado en grandes cantidades y con un enorme potencial para los procesos biotecnológicos que no siempre es aprovechado.

A través de los ensayos realizados en este trabajo fue posible conseguir valores altos de producción de ácido láctico, comparables con los de la bibliografía. Es importante resaltar también que el suero de queso se utilizó crudo y que el inóculo fue generado a partir del mismo suero, contrario a lo que sucede en la mayoría de los estudios sobre el tema. Además, a pesar de haberse utilizado una comunidad de microorganismos mixta como inóculo y de llevar a cabo la operación en condiciones no estériles, se dio una gran selección de microorganismos especializados en la producción de ácido láctico. Asimismo, el proceso fue reproducible y tuvo la capacidad de recuperarse frente a perturbaciones.

Se demostró que las condiciones de operación pH inicial y concentración de inóculo tuvieron un efecto significativo sobre la producción de ácido láctico en batch. También se encontró que en el modo semicontinuo de fermentación, el tiempo de reacción afectó la producción de ácido láctico. Por lo tanto, puede decirse que son parámetros importantes a la hora de diseñar el proceso de producción de ácido láctico a partir de suero de queso. Incluso, se puede concluir que el manejo de estas condiciones es una herramienta útil para controlar el proceso y dirigirlo hacia la maximización de la producción de ácido láctico.

Quedó demostrado el gran potencial que tiene el proceso para producir ácido láctico y, por ende, la importancia de profundizar en su estudio para lograr aplicarlo en una escala mayor y en un contexto industrial.

Así, los resultados obtenidos en este trabajo aportan al desarrollo de un proceso de producción de ácido láctico alternativo, operado a base de un residuo industrial y en condiciones que representan ventajas tanto técnicas como económicas, respondiendo a las necesidades actuales de producción. Esta tecnología además

tiene el potencial de aplicarse a nivel local, ya que el suero de queso es un residuo generado en grandes cantidades en nuestro país.

Además de todos los conocimientos generados, este trabajo también abre puertas a futuras investigaciones, las cuales tienen el potencial de ahondar aún más en el entendimiento y la consolidación del proceso fermentativo de producción de ácido láctico a partir de suero de queso.

Por ejemplo, sería interesante realizar más ensayos en batch en base a un nuevo diseño central compuesto para lograr identificar las condiciones óptimas de pH inicial y concentración de inóculo para la producción de ácido láctico a partir de suero de queso, ya que como se mencionó en el texto, se alcanzó un máximo de producción dentro del rango de las condiciones estudiadas pero se observó que la producción puede ser aún mayor fuera de dicho rango. Una vez encontradas las condiciones teóricas óptimas, se debería validar experimentalmente el modelo obtenido, para comprobar que la respuesta predicha concuerda con la obtenida experimentalmente. Al proceder de esta manera se puede hablar de que el proceso fue optimizado.

También se podría estudiar el efecto del pH sobre las bacterias a nivel intracelular, ya que son numerosos los trabajos que reportan el efecto del pH sobre la producción de ácido láctico, pero escasea la información sobre las bases moleculares de dicho efecto. De esta manera, se podrían realizar experimentos para dilucidar qué ocurre a nivel de la síntesis de proteínas o de la actividad enzimática cuando el pH decrece durante la fermentación ácido láctica.

Si bien la temperatura a la que fueron llevados a cabo los experimentos fue mesófila (30°C), lo que representa una ventaja frente a procesos termófilos debido a la menor inversión energética, se debería estudiar el proceso a temperatura ambiente (20-25°C). Esto reduciría aún más el consumo de energía del proceso, por lo que de observarse que la producción de ácido láctico es igual de factible, la operación a temperatura ambiente puede ser una buena opción para economizar el proceso.

De las diferencias observadas entre los inóculos generados por auto fermentación en este trabajo, se desprende la posibilidad de poner a punto el tiempo de fermentación para generar un inóculo adecuado en el menor tiempo posible, lo que

implica ventajas técnicas y económicas. La estrategia que se utilizó para generar el inóculo, basada en el uso del mismo suero de queso, fue sencilla y mostró ser efectiva para el enriquecimiento de bacterias ácido lácticas, en especial en el caso del ensayo de producción semicontinua. Sin embargo, el uso de los microorganismos propios del sustrato sin la adición externa de un inóculo también representa una forma de hacer el proceso menos complejo y más económico. Además, el suero de queso tiene la ventaja de presentar una comunidad microbiana naturalmente compuesta por bacterias ácido lácticas, por lo que, aprovechando esta característica, se podría evaluar la producción de ácido láctico a partir de suero de queso sin utilizar ninguna inoculación.

En cuanto al ensayo de producción semicontinua de ácido láctico, sería importante analizar en más detalle cada ciclo dentro del proceso, para lo que es necesario tomar muestras a lo largo de cada ciclo y no sólo al final de cada uno. Esto aportaría información, por ejemplo, sobre cuán rápido disminuye el pH o si hay consumo de ácido láctico a lo largo de cada ciclo.

También es importante hacer un estudio de la factibilidad tecno-económica del proceso, y así dar un paso más en dirección hacia su aplicación en escala real.

Una vez finalizada la fermentación es necesario separar y purificar el ácido láctico producido. Existen varias estrategias de separación y purificación, cada una de las cuáles presenta tanto ventajas como desventajas. Este trabajo se centró en la parte de producción de ácido láctico, pero sería importante continuar el estudio incluyendo el análisis sobre cuál es la mejor opción de separación y purificación del ácido láctico, ya que es una etapa esencial y determinante del proceso. Además, se podría incluir una etapa más, que es la del aprovechamiento del líquido de fermentación para un proceso biotecnológico subsecuente, como por ejemplo la producción de metano.

Una opción muy novedosa y con un gran potencial sería la de aplicar la estrategia de electro-fermentación a la producción de ácido láctico. La electro-fermentación es una tecnología reciente que puede ser usada para superar algunas de las limitaciones de las fermentaciones convencionales. Ésta consiste en controlar electroquímicamente el metabolismo microbiano fermentativo con electrodos, los cuáles pueden actuar tanto de fuente como sumidero de electrones. Este control

electroquímico no sólo tiene efectos sobre el metabolismo microbiano y la regulación celular, sino también en las interacciones interespecíficas y en la selección de poblaciones de bacterias en cultivos mixtos. Se espera que el desarrollo de esta tecnología potencie y permita controlar mejor las fermentaciones microbianas, por ejemplo al aumentar la especificidad de las rutas metabólicas y superar limitaciones termodinámicas (Moscoviz et al., 2016). De esta manera, a través de la electro-fermentación se podrían obtener rendimientos de ácido láctico mayores y disminuir la producción de otros productos metabólicos como ácido acético y etanol y, por ende, aumentar la selectividad del proceso. La electro-fermentación está cobrando cada vez más interés y popularidad, pero aún no se ha investigado sobre la producción de ácido láctico, por lo que existe un gran campo de investigación aún por explorar en este sentido.

## Bibliografía

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877–902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), e04974. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Akao, S., Tsuno, H., & Cheon, J. (2007). Semi-continuous l-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure. *Water Research*, 41(8), 1774–1780. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.013>
- Akhlaghi, M., Boni, M. R., De Gioannis, G., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., & Spiga, D. (2017). A parametric response surface study of fermentative hydrogen production from cheese whey. *Bioresource Technology*, 244, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.158>
- Alves de Oliveira, R., Komesu, A., Vaz Rossell, C. E., & Maciel Filho, R. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 219–239. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>
- Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P. N. L., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., & Spiga, D. (2020). The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of Environmental Management*, 276, 111240. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111240>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bonk, F., Bastidas-Oyanedel, J.-R., Yousef, A. F., & Schmidt, J. E. (2017). Exploring the selective lactic acid production from food waste in uncontrolled pH mixed culture fermentations using different reactor configurations. *Bioresource Technology*, 238, 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.057>

- Boone, D. R., Castenholz, R. W., & Garrity, G. M. (Eds.). (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed). Springer.
- Booth, I. R. (2007). The Regulation of Intracellular pH in Bacteria. In D. J. Chadwick & G. Cardew (Eds.), *Novartis Foundation Symposia* (pp. 19–37). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470515631.ch3>
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1992). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. In S. Kotz & N. L. Johnson (Eds.), *Breakthroughs in Statistics* (pp. 270–310). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_23)
- Božanić, R., Barukčić, I., Lisak Jakopović, K., & Tratnik, L. (2014). Possibilities of Whey Utilisation. *Austin Journal of Nutrition and Food Science*, 2.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Candry, P., Radić, L., Favere, J., Carvajal-Arroyo, J. M., Rabaey, K., & Ganigué, R. (2020). Mildly acidic pH selects for chain elongation to caproic acid over alternative pathways during lactic acid fermentation. *Water Research*, 186, 116396. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116396>
- Castelló, E., Braga, L., Fuentes, L., & Etchebehere, C. (2018). Possible causes for the instability in the H<sub>2</sub> production from cheese whey in a CSTR. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(5), 2654–2665. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.12.104>
- Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5674–5682. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>
- Castelló, E., Perna, V., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2011). Microbial community composition and reactor performance during hydrogen production in a UASB reactor fed with raw cheese whey inoculated with compost. *Water Science and Technology*, 64(11), 2265–2273. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.706>
- Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez González, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70–83.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>

- Cheah, S. A., Chai, C. Y., Tan, I. S., Foo, H. C. Y., & Lam, M. K. (2022). Review - New prospect of algae for sustainable production of lactic acid: Opportunities and challenges. *Progress in Energy and Environment*, 21, 19–28. <https://doi.org/10.37934/progee.21.1.1928>
- Chen, H., Chen, B., Su, Z., Wang, K., Wang, B., Wang, Y., Si, Z., Wu, Y., Cai, D., & Qin, P. (2020). Efficient lactic acid production from cassava bagasse by mixed culture of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* using stepwise pH controlled simultaneous saccharification and co-fermentation. *Industrial Crops and Products*, 146, 112175. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112175>
- Choi, G., Kim, J., & Lee, C. (2016). Effect of low pH start-up on continuous mixed-culture lactic acid fermentation of dairy effluent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 10179–10191. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7871-3>
- Choubisa, B., Patel, H., Patel, M., & Dholakiya, B. (2012). *Microbial Production of Lactic Acid by Using Crude Glycerol from Biodiesel*. 5.
- Claesson, M. J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Ross, R. P., & O'Toole, P. W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669>
- de Lima, C. J. B., Coelho, L. F., & Contiero, J. (2010). The Use of Response Surface Methodology in Optimization of Lactic Acid Production: Focus on Medium Supplementation, Temperature and pH Control. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 175–181.
- Dien, B. S., Nichols, N. N., & Bothast, R. J. (2001). Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 259–264. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000195>
- Dien, B. S., Nichols, N. N., & Bothast, R. J. (2002). Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 221–227. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000299>

- Djalma Nunes Ferraz Júnior, A., Wenzel, J., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2014). Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, *39*(30), 16852–16862. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.017>
- Dreschke, G., Probst, M., Walter, A., Pümpel, T., Walde, J., & Insam, H. (2015). Lactic acid and methane: Improved exploitation of biowaste potential. *Bioresource Technology*, *176*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.136>
- Eiteman, M. A., & Ramalingam, S. (2015). Microbial production of lactic acid. *Biotechnology Letters*, *37*(5), 955–972. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1769-5>
- Elefsiniotis, P., & Oldham, W. K. (1994). Influence of pH on the acid-phase anaerobic digestion of primary sludge. *Journal of Chemical Technology AND Biotechnology*, *60*(1), 89–96. <https://doi.org/10.1002/jctb.280600114>
- Feng, X., Jiang, L., Han, X., Liu, X., Zhao, Z., Liu, H., Xian, M., & Zhao, G. (2017). Production of d-lactate from glucose using *Klebsiella pneumoniae* mutants. *Microbial Cell Factories*, *16*, 209. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0822-6>
- Ferraz, A. D. N., Fuentes, L., de la Sovera, V., Bovio-Winkler, P., Eng, F., García, M., & Etchebehere, C. (2021). Potentialities of biotechnological recovery of hydrogen and short- and medium-chain organic acids from the co-fermentation of cheese whey and Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) waste. *Industrial Crops and Products*, *171*, 113897. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113897>
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, *2*, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Gao, T., Wong, Y., Ng, C., & Ho, K. (2012). L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, *121*, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.108>
- Gomes, B. C., Rosa, P. R. F., Etchebehere, C., Silva, E. L., & AmâncioVaresche, M. B. (2015). Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(28), 8650–8660. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.035>
- González, M. I., Álvarez, S., Riera, F., & Álvarez, R. (2007). Economic evaluation of an

- integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.021>
- Greenberg, N. A., & Mahoney, R. R. (1982). Production and Characterization of  $\beta$ -Galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Food Science*, 47(6), 1824–1835. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12891.x>
- Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources<sup>1</sup>. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 87–107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6)
- Holten, C. H. (1971). Lactic acid. Properties and chemistry of lactic acid and derivatives. *Lactic Acid. Properties and Chemistry of Lactic Acid and Derivatives*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19720402403>
- Horiuchi, J.-I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T., & Kobayashi, M. (2002). Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*, 82(3), 209–213. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00195-X)
- Iskandar, C. F., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., & Revol-Junelles, A.-M. (2019). Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.020>
- Itoh, Y., Tada, K., Kanno, T., & Horiuchi, J.-I. (2012). Selective production of lactic acid in continuous anaerobic acidogenesis by extremely low pH operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(5), 537–539. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.020>
- Jagota, S. k., Rao, M. v. R., & Dutta, S. m. (1981). Beta-Galactosidase of *Streptococcus cremoris* H. *Journal of Food Science*, 46(1), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb14554.x>
- Jem, K. J., van der Pol, J. F., & de Vos, S. (2009). Microbial Lactic Acid, Its Polymer Poly(lactic acid), and Their Industrial Applications. In G. G.-Q. Chen (Ed.), *Plastics from Bacteria* (Vol. 14, pp. 323–346). Springer Berlin Heidelberg.

[https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_13)

- Jia, X., Liu, P., Li, S., Li, S., & Wen, J. (2011). D-lactic acid production by a genetically engineered strain *Corynebacterium glutamicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2117–2124. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0675-9>
- Júnior, A. D. N. F., Etchelet, M. I., Braga, A. F. M., Clavijo, L., Loaces, I., Noya, F., & Etchebehere, C. (2020). Alkaline pretreatment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) waste for unlocking low-cost cellulosic biofuel. *Fuel*, 266, 117068. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117068>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2016). Microbial production of lactic acid: The latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 967–977. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1066305>
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209–224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 46(3), 233–244. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02463.x>
- Kim, J.-W., & Rajagopal, S. N. (2000). Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiologica*, 45(1), 29–34. <https://doi.org/10.1007/BF02817446>
- Kim, M., Gomec, C. Y., Ahn, Y., & Speece, R. E. (2003). Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. *Environmental Technology*, 24(9), 1183–1190. <https://doi.org/10.1080/09593330309385659>
- Klotz, S., Kaufmann, N., Kuenz, A., & Prüße, U. (2016). Biotechnological production of enantiomerically pure d-lactic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), 9423–9437. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7843-7>
- Komesu, A., Maciel, M. R. W., & Filho, R. M. (2017). Separation and Purification Technologies for Lactic Acid – A Brief Review. *BioResources*, 12(3), Article 3.
- Krishna, B. S., Nikhilesh, G. S. S., & Tarun, B. (2018). *Industrial production of lactic acid and its applications*. 14.
- Krulwich, T. A., Sachs, G., & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing

- and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 330–343. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2549>
- Lenth, R. V. (2010). Response-Surface Methods in R, Using rsm. *Journal of Statistical Software*, 32, 1–17. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i07>
- Li, X., Chen, Y., Zhao, S., Chen, H., Zheng, X., Luo, J., & Liu, Y. (2015). Efficient production of optically pure L-lactic acid from food waste at ambient temperature by regulating key enzyme activity. *Water Research*, 70, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.049>
- Liang, S., Gliniewicz, K., Gerritsen, A. T., & McDonald, A. G. (2016). Analysis of microbial community variation during the mixed culture fermentation of agricultural peel wastes to produce lactic acid. *Bioresource Technology*, 208, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.054>
- Liang, S., Gliniewicz, K., Mendes-Soares, H., Settles, M. L., Forney, L. J., Coats, E. R., & McDonald, A. G. (2015). Comparative analysis of microbial community of novel lactic acid fermentation inoculated with different undefined mixed cultures. *Bioresource Technology*, 179, 268–274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.032>
- Liang, S., McDonald, A. G., & Coats, E. R. (2014). Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. *Waste Management*, 34(11), 2022–2027. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.009>
- Liu, P., Zheng, Z., Xu, Q., Qian, Z., Liu, J., & Ouyang, J. (2018). Valorization of dairy waste for enhanced D-lactic acid production at low cost. *Process Biochemistry*, 71, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.014>
- Liu, S. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83(2), 115–131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00366-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00366-5)
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In H. Zhang & Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (pp. 103–203). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_2)
- Lovato, G., Augusto, I. M. G., Ferraz Júnior, A. D. N., Albanez, R., Ratusznei, S. M., Etchebehere, C., Zaiat, M., & Rodrigues, J. A. D. (2021). Reactor start-up strategy as key for high and stable hydrogen production from cheese whey thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(54), 27364–27379.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.06.010>

- Lund, B., Norddahl, B., & Ahring, B. (1992). Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. *Biotechnology Letters*, *14*(9), 851–856. <https://doi.org/10.1007/BF01029152>
- Luongo, V., Policastro, G., Ghimire, A., Pirozzi, F., & Fabbricino, M. (2019). Repeated-Batch Fermentation of Cheese Whey for Semi-Continuous Lactic Acid Production Using Mixed Cultures at Uncontrolled pH. *Sustainability*, *11*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/su11123330>
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernandez, M., Kowalczyk, M., Alvarez-Martín, P., & Bardowski, J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (pp. 3–33). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780813820866.ch1>
- Mazumdar, S., Clomburg, J. M., & Gonzalez, R. (2010). Escherichia coli Strains Engineered for Homofermentative Production of D-Lactic Acid from Glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(13), 4327–4336. <https://doi.org/10.1128/AEM.00664-10>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, *8*(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I., & Nurk, A. (2006). l(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(4), 861–867. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.015>
- Moe, W. M., Stebbing, R. E., Rao, J. U., Bowman, K. S., Nobre, M. F., da Costa, M. S., & Rainey, F. A. (2012). *Pelosinus defluvii* sp. Nov., isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater, emended description of the genus *Pelosinus* and transfer of *Sporotalea propionica* to *Pelosinus propionicus* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *62*(Pt\_6), 1369–1376. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033753-0>
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trabaly, E., & Bernet, N. (2016). Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems. *Trends in Biotechnology*, *34*(11), 856–865. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>

- Mota, V. T., Ferraz Júnior, A. D. N., Trably, E., & Zaiat, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Research*, *128*, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Mancilha, I. M., & Roberto, I. C. (2008). Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, *40*(3), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.013>
- Nannen, N. L., & Hutkins, R. W. (1991). Intracellular pH Effects in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, *74*(3), 741–746. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78219-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78219-2)
- Nguyen, T., Splechna, B., Steinböck, M., Kneifel, W., Lettner, H. P., Kulbe, K. D., & Haltrich, D. (2006). Purification and Characterization of Two Novel  $\beta$ -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(14), 4989–4998. <https://doi.org/10.1021/jf053126u>
- Nguyen, T.-H., Splechna, B., Krasteva, S., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Divne, C., & Haltrich, D. (2007). Characterization and molecular cloning of a heterodimeric  $\beta$ -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiology Letters*, *269*(1), 136–144. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00614.x>
- Oh, H., Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Ho Han, S., Jung, S., & Ryu, H.-W. (2005). Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*, *96*(13), 1492–1498. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.11.020>
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(3), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2280-5>
- Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M., & Yukawa, H. (2008). Production of d-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *78*(3), 449–454. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1336-7>
- Oshiro, M., Hanada, K., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2010). Efficient conversion of lactic acid to butanol with pH-stat continuous lactic acid and glucose feeding method by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(3), 1177–1185. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2673-5>

- Ouyang, J., Ma, R., Zheng, Z., Cai, C., Zhang, M., & Jiang, T. (2013). Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. Strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresource Technology*, *135*, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.096>
- Overbeck, T., Steele, J. L., & Broadbent, J. R. (2016). Fermentation of de-oiled algal biomass by *Lactobacillus casei* for production of lactic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *39*(12), 1817–1823. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1656-z>
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, *105*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., & Kosseva, M. (2010). Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*(1), 219–226. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100027>
- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.-A., & Gruss, A. (2012). Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 37–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255>
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D. M., Borzacconi, L., Varesche, M. B., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(1), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022>
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Marchant, R., & Banat, I. M. (2008). Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology*, *99*(13), 5951–5955. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.039>
- Pohanka, M. (2020). D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. *BioMed Research International*, *2020*, 3419034. <https://doi.org/10.1155/2020/3419034>
- Poudel, P., Tashiro, Y., & Sakai, K. (2016). New application of *Bacillus* strains for optically pure L -lactic acid production: General overview and future prospects. *Bioscience*,

*Biotechnology, and Biochemistry*, 80(4), 642–654.  
<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1095069>

- Probst, M., Walde, J., Pümpel, T., Wagner, A. O., & Insam, H. (2015). A closed loop for municipal organic solid waste by lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 175, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.034>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rawoof, S. A. A., Kumar, P. S., Vo, D.-V. N., Devaraj, K., Mani, Y., Devaraj, T., & Subramanian, S. (2021). Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 539–556. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01083-w>
- RedCorn, R., & Engelberth, A. S. (2016). Identifying conditions to optimize lactic acid production from food waste co-digested with primary sludge. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.014>
- Rossi, D. M., de Souza, E. A., & Ayub, M. A. Z. (2013). Biodiesel Residual Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae*: Pool of Metabolites Under Anaerobiosis and Oxygen Limitation as a Function of Feeding Rates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(6), 1952–1964. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0114-5>
- Roukas, T., & Kotzekidou, P. (1996). Continuous production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells in a packed-bed reactor. *Food Biotechnology*, 10(3), 231–242. <https://doi.org/10.1080/08905439609549916>
- Roukas, T., & Kotzekidou, P. (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(3), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00167-1)
- Sakai, K., Fujii, N., & Chukeatirote, E. (2006). Racemization of L-lactic acid in pH-swing open fermentation of kitchen refuse by selective proliferation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(3), 227–232. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.227>

- Sakai, K., Murata, Y., Yamazumi, H., Tau, Y., Mori, M., Moriguchi, M., & Shirai, Y. (2000). Selective Proliferation of Lactic Acid Bacteria and Accumulation of Lactic Acid during Open Fermentation of Kitchen Refuse with Intermittent pH Adjustment. *Food Science and Technology Research*, 6(2), 140–145. <https://doi.org/10.3136/fstr.6.140>
- Schink, B. (2015). *Propionispira*. In W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, & S. Dedysh (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (1st ed., pp. 1–4). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00701>
- Serna Cock, L., & Rodríguez de Stouvenel, A. (2006). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 0–0.
- Shene, C., & Bravo, S. (2007). Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* for exopolysaccharide production in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1578–1584. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.003>
- Sikora, A., Baszczyk, M., Jurkowski, M., & Zielenkiewicz, U. (2013). Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? In *Lactic Acid Bacteria—R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50364>
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: Synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1612–1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
- Singhvi, M., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: Challenges and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5911–5924. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9092-4>
- Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold.’ *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>
- Soriano-Perez, S., Flores-Velez, L., Alonso-Davila, P., Cervantes-Cruz, G., & Arriaga, S. (2012). Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Annals of Microbiology*, 62(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0264-z>

- Spector, M. P. (2009). Metabolism, Central (Intermediary). In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 242–264). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00078-X>
- Taleghani, H. G., Najafpour, G. D., & Ghoreyshi, A. A. (2016). A study on the effect of parameters on lactic acid production from whey. *Polish Journal of Chemical Technology*, *18*(1), 58–63. <https://doi.org/10.1515/pjct-2016-0010>
- Tang, J., Wang, X. C., Hu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2017). Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. *Bioresource Technology*, *224*, 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.111>
- Tang, J., Wang, X., Hu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2016). Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. *Waste Management*, *52*, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.034>
- Tango, M. S. A., & Ghaly, A. E. (1999). Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass and Bioenergy*, *16*(1), 61–78. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(98\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(98)00062-2)
- Tashiro, Y., Inokuchi, S., Poudel, P., Okugawa, Y., Miyamoto, H., Miyamoto, H., & Sakai, K. (2016). Novel pH control strategy for efficient production of optically active L-lactic acid from kitchen refuse using a mixed culture system. *Bioresource Technology*, *216*, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.031>
- Taylor, K. A. C. C. (1996). A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *56*(1), 49–58. <https://doi.org/10.1007/BF02787869>
- Thapa, L. P., Lee, S. J., Park, C., & Kim, S. W. (2017). Production of L-lactic acid from metabolically engineered strain of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. *Enzyme and Microbial Technology*, *102*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.03.003>
- Toit, M. du, Huch, M., Cho, G.-S., & Franz, C. M. A. P. (2014). The genus *Streptococcus*. In W. H. Holzapfel & B. J. B. Wood (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (pp. 457–505). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch28>
- Tsuge, Y., Kato, N., Yamamoto, S., Suda, M., Jojima, T., & Inui, M. (2019). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for hyperproduction of polymer-grade L- and D-lactic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(8), 3381–3391. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09737-8>

- Turner, K. W., & Martley, F. G. (1983). Galactose Fermentation and Classification of Thermophilic Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1932–1934. <https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1932-1934.1983>
- Wang, K., Yin, J., Shen, D., & Li, N. (2014). Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: Effect of pH. *Bioresource Technology*, 161, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.088>
- Wang, Q., Zhao, X., Chamu, J., & Shanmugam, K. T. (2011). Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresource Technology*, 102(17), 8152–8158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.003>
- Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>
- Wang, Y., Tian, T., Zhao, J., Wang, J., Yan, T., Xu, L., Liu, Z., Garza, E., Iverson, A., Manow, R., Finan, C., & Zhou, S. (2012). Homofermentative production of d-lactic acid from sucrose by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 34(11), 2069–2075. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1003-7>
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., & Ryu, H.-W. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 163–172.
- Wickham, H. (2016). Data Analysis. In H. Wickham (Ed.), *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (pp. 189–201). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_9)
- Wu, Y., Ma, H., Zheng, M., & Wang, K. (2015). Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Bioresource Technology*, 191, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.100>
- Yang, Y., & Sha, M. (2019). *A Beginner's Guide to Bioprocess Modes – Batch, Fed- Batch, and Continuous Fermentation*.
- Yousuf, A., Bastidas-Oyanedel, J.-R., & Schmidt, J. E. (2018). Effect of total solid content and pretreatment on the production of lactic acid from mixed culture dark fermentation of food waste. *Waste Management*, 77, 516–521.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.035>

- Zhang, B., He, P., Ye, N., & Shao, L. (2008). Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. *Bioresource Technology*, 99(4), 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.010>
- Zhang, S. S., Xu, Z. S., Qin, L. H., & Kong, J. (2020). Low-sugar yogurt making by the co-cultivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 with yogurt starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3045–3054. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17347>
- Zhao, J., Xu, L., Wang, Y., Zhao, X., Wang, J., Garza, E., Manow, R., & Zhou, S. (2013). Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from xylose by genetically engineered *Escherichia coli* B. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 57. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-57>
- Zhou, S., Causey, T. B., Hasona, A., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2003). Production of Optically Pure D-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically Engineered *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 399–407. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.399-407.2003>

## Anexos

Tabla A1. Valores de significancia obtenidos con el test de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre la concentración de ácido láctico obtenida en los diferentes momentos de toma de muestra del ensayo de producción en batch. Los valores significativos se muestran en rosado. Se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Concentración de ácido láctico sin buffer				
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
24 horas		0,03346	0,09897	0,4117
48 horas	4,029		3,362E-05	0,0004255
72 horas	3,355	7,385		0,8488
120 horas	2,208	6,238	1,147	
Concentración de ácido láctico con buffer				
	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
24 horas		0,802	0,9687	0,9706
48 horas	1,28		0,9687	0,5384
72 horas	0,6402	0,6402		0,8071
120 horas	0,6264	1,907	1,267	

Tabla A2. Modelos probados para ajustar los datos obtenidos en ambos ensayos en batch, con y sin buffer. Y es la producción de ácido láctico; X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> las variables pH inicial y concentración de inóculo, respectivamente; b<sub>0</sub> una constante, b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub> el coeficiente lineal de las variables X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> y b<sub>4</sub> el coeficiente cuadrático de las variables X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>, respectivamente, y b<sub>12</sub> el coeficiente de la interacción entre las dos variables (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>).

Modelo	Ecuación
--------	----------

1	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2$
2	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2$
3	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2 + b_{12}X_1X_2$
4	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2$
5	$Y = b_0 + b_1X_1$
6	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_3X_1^2$
7	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_3X_1^2 + b_{12}X_1X_2$
8	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_{12}X_1X_2$
9	$Y = b_0 + b_2X_2$
10	$Y = b_0 + b_2X_2 + b_4X_2^2$
11	$Y = b_0 + b_2X_2 + b_4X_2^2 + b_{12}X_1X_2$
12	$Y = b_0 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2$
13	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_4X_2^2$
14	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_4X_2^2 + b_{12}X_1X_2$
15	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2$
16	$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_{12}X_1X_2$

Tabla A3. R<sup>2</sup>, p-valor y falta de ajuste de los modelos probados para el ajuste de los datos obtenidos en el ensayo de producción de ácido láctico, tanto con como sin buffer.

Modelo	Sin buffer			Con buffer		
	R <sup>2</sup> (%)	p-valor	Falta de ajuste	R <sup>2</sup> (%)	p-valor	Falta de ajuste
1	57,34	0,033	0,086	18,93	0,432	0,019
2	69,56	0,087	0,082	37,02	0,527	0,068
3	76,82	0,107	0,081	70,67	0,178	0,027
4	64,61	0,052	0,087	52,58	0,135	0,028
5	30,23	0,080	0,062	18,85	0,182	0,023
6	40,88	0,122	0,063	36,26	0,165	0,025
7	48,15	0,180	0,060	69,91	0,030	0,044

8	37,50	0,153	0,060	52,50	0,051	0,033
9	27,11	0,101	0,060	0,08	0,935	0,018
10	27,17	0,281	0,051	0,27	0,989	0,016
11	34,44	0,370	0,048	33,91	0,378	0,020
12	34,38	0,185	0,057	33,72	0,200	0,024
13	57,39	0,096	0,073	19,13	0,663	0,016
14	64,66	0,130	0,071	52,77	0,272	0,022
15	67,99	0,040	0,100	36,34	0,338	0,021
16	75,26	0,050	0,100	69,99	0,084	0,035



Figura A1. Equipo AMPTS II utilizado para el ensayo de producción de ácido láctico en modo semicontinuo. De izquierda a derecha: unidad de incubación, unidad de fijación de CO<sub>2</sub> y unidad de medición del biogás.

Tabla A4. Valores de significancia obtenidos con el test de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre las réplicas biológicas en cuanto a la concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico obtenida en el ensayo de producción semicontinua. Se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Concentración de ácido láctico			
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
Reactor 1		0,8829	0,9848
Reactor 2	0,6728		0,7971
Reactor 3	0,2358	0,9086	

Rendimiento de ácido láctico			
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
Reactor 1		0,8829	0,9848
Reactor 2	0,6728		0,7971
Reactor 3	0,2358	0,9086	
Productividad de ácido láctico			
	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3
Reactor 1		0,9827	0,9164
Reactor 2	0,2513		0,8333
Reactor 3	0,5631	0,8144	

Tabla A5. Valores de significancia obtenidos con el test de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre las distintas fases de operación del ensayo de producción semicontinua de ácido láctico. Se evaluó la diferencia en cuanto a concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico. Los valores significativos se muestran en rosado. Se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Concentración de ácido láctico				
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Fase 1		0,0001389	0,1558	0,4188
Fase 2	7,291		4,9E-06	7,465E-05
Fase 3	3,086	9,173		0,4315
Fase 4	2,206	7,635	0,4315	
Rendimiento de ácido láctico				
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Fase 1		0,0001387	0,1558	0,4185

Fase 2	7,291		4,899E-06	7,449E-05
Fase 3	3,086	9,173		0,99
Fase 4	2,207	7,636	0,4305	
Productividad de ácido láctico				
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
Fase 1		0,01199	0,265	0,01675
Fase 2	4,778		0,0004837	3,954E-05
Fase 3	2,648	6,6		0,4784
Fase 4	4,577	7,989	2,058	

## Trabajos presentados en congresos

A continuación se listan los trabajos presentados en congresos en el marco de esta tesis de maestría:

- III Congreso Nacional de Biociencias, Uruguay (2022)
  - Título: Producción de ácido láctico a partir de suero de queso mediante consorcios microbianos
  - Tipo de participación: Póster
- Microbial Ecology and Water Engineering, Holanda (2021)
  - Título: Biological lactic acid production using cheese whey as feedstock
  - Tipo de participación: Póster (virtual)
- Jornadas Latinoamericanas de Digestión Anaerobia, Uruguay (2020)
  - Título: Characterization and evaluation of three inocula for biological lactic acid production from cheese whey Uruguay
  - Tipo de participación: Póster (virtual)

## Artículos científicos

A continuación se presentan los trabajos publicados hasta la fecha en el marco de mi actividad en el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE:

- Título: Alkaline pretreatment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) waste for unlocking low-cost cellulosic biofuel
  - Autores: María Inés Etchelet, Antônio Djalma Nunes Ferraz, Adriana Ferreira Maluf Braga, Leonardo Clavijo, Ines Loaces, Francisco Noya, Claudia Etchebehere
  - Año 2020
  - Revista Fuel
  - ISSN: 00162361
  - DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117068>
  
- Título: Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse (Completo, 2019)
  - Autores: Mirian Niz, Inés Etchelet, Laura Fuentes, Claudia Etchebehere, Marcelo Zaiat
  - Año 2019
  - Revista International Journal of Hydrogen Energy
  - ISSN: 03603199
  - DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>