



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química**

**Valorización de residuos agroalimentarios mediante  
procesos biotecnológicos**

Tesis que para obtener el grado de:  
**Maestría en Ciencias en Ingeniería Química**

Presenta:  
**Díaz Orozco Lucila**

Director de Tesis: **Dr. Mario Moscosa Santillán**  
Codirector de Tesis: **Dra. María Zenaida Saavedra Leos**

---

---

**SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.**

**AGOSTO, 2025**



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



**UASLP-Sistema de Bibliotecas**  
**Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso**  
**DERECHOS RESERVADOS**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Valorización de residuos agroalimentarios mediante procesos biotecnológicos © 2025 por Díaz Orozco Lucila se distribuye bajo una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en el *Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas* adscrito a la *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*, en el periodo comprendido entre septiembre de 2024 a junio de 2025, bajo la dirección del *Dr. Mario Moscosa Santillán* y la *Dra. María Zenaida Saavedra Leos*. Este proyecto fue realizado con recursos propios.

El programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) de SECIHTI, registro 000896. Número de la beca otorgada por SECIHTI 4001501. Número de CVU: 1316819.

Los datos del trabajo titulado *Valorización de residuos agroalimentarios mediante procesos biotecnológicos* se encuentran bajo el resguardo de la *Facultad de Ciencias Químicas* y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química  
Programa de Maestría

## **Solicitud de Registro de Tesis Maestría**

San Luis Potosí, S.L.P a 03 de mayo de 2025

### **Comité Académico**

**En atención a: Coordinador/a del Posgrado**

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de tema de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: Valorización de residuos agroalimentarios mediante procesos biotecnológicos

que desarrollará el/la estudiante: Lucila Díaz Orozco

bajo la dirección y/o Co-dirección de: el Dr. Mario Moscosa Santillán y la Dra. María Zenaida Saavedra Leos

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

( ) Sí debido a que: \_\_\_\_\_

( ) No

( X ) No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

**A T E N T A M E N T E**

\_\_\_\_\_  
Lucila Díaz Orozco

\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Moscosa Santillán



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

---

---



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química**

**Valorización de residuos agroalimentarios mediante procesos  
biotecnológicos**

Tesis que para obtener el grado de:  
**Maestría en Ciencias en Ingeniería Química**

Presenta:  
**Díaz Orozco Lucila**

**SINODALES:**

**Presidente:** Dr. Raúl González García \_\_\_\_\_  
**Secretario:** Dr. Mario Moscosa Santillán \_\_\_\_\_  
**Vocal:** Dra. María Zenaida Saavedra Leos \_\_\_\_\_  
**Vocal:** Dr. Luis Manuel Rosales Colunga \_\_\_\_\_  
**Vocal:** M.C. Rosa Elena Delgado Portales \_\_\_\_\_

---

---

**SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.**

**AGOSTO, 2025**

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO**

Dr. Mario Moscosa Santillán: Director de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. María Zenaida Saavedra Leos: Codirector de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Raúl González García: Tutor. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Mtra. Rosa Elena Delgado Portales: Tutora. Adscrita a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Luis Manuel Rosales Colunga: Tutor. Adscrito a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química  
Programa de Maestría

## **Carta Cesión de Derechos**

San Luis Potosí, S.L.P., a 04 / 08 /2025

En la ciudad de San Luis Potosí el día XX del mes de XX del año 2025. El que suscribe Lucila Díaz Orozco Alumno(a) del programa de posgrado en Ciencias en Ingeniería Química adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Mario Moscota Santillán y Dra. María Zenaida Saavedra Leos y cede los derechos del trabajo titulado Valorización de residuos agroalimentarios mediante procesos biotecnológicos a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección diazlucila65@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Lucila Díaz Orozco



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química  
Programa de Maestría

## **Carta de Análisis de Similitud**

San Luis Potosí, S.L.P., a 15 de julio de 2025

**L.B. María Zita Acosta Nava**  
**Biblioteca de Posgrado FCQ**

**Asunto:** Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada **Valorización de residuos agroalimentarios mediante procesos biotecnológicos** presentada por **Lucila Díaz Orozco**. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química. El análisis reveló un porcentaje de similitud de **28%** incluyendo referencias y metodología.

Agradezco su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

---

Dr. Erik César Herrera Hernández  
Coordinador Académico del Posgrado  
en Ciencias en Ingeniería Química

## DEDICATORIA

*“Las cosas difíciles parecen posibles en cuanto se las  
piensa un poco, pero se hacen imposibles si se las  
piensa de más”*

*Corazón tan blanco (2010), de Javier Marías.*

*Para quienes me ayudaron a no pensar de más  
cuando las dudas pesaban más que las certezas. Su  
confianza convirtió lo difícil en posible, y esta obra es  
prueba de ello.*

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres, Juana y Héctor, por ser pilar fundamental en todo lo que hoy soy, por inculcarme grandes valores que me han acompañado en todos los aspectos de mi vida, por su gran apoyo y sacrificio, y por siempre creer en mí, mucho más de lo que yo lo hacía. Con infinita gratitud y admiración, les dedico este logro que es tanto suyo como mío, porque es más fácil ser valiente cuando se que están a mi lado. Espero que se sientan tan afortunados de ser mis padres como yo me siento de ser su hija. Deseo algún día llegar a ser como ustedes. Con mucho amor.

A mi tía, Francisca, quien siempre ha sido una gran inspiración y ejemplo en mi vida. Gracias por su apoyo incondicional, por cada palabra de aliento y por recordarme que soy capaz de superar cualquier obstáculo. Por siempre estar a mi lado y quererme como nadie. Espero que te sientas orgullosa porque este logro también es gracias a ti. Con infinito cariño.

A mi hermana Irma, por cuidarme, por enseñarme y por apoyarme a seguir mis sueños. Por ser mi respaldo y mi compañera. Con cariño.

A mi sobrina, Constanza, por llegar a iluminar mi vida, por enseñarme a ser mejor cada día para poder ser un buen ejemplo, y por mostrarme lo que significa el amor de un niño. Espero un día te des cuenta de lo que generaste en mi vida. Con cariño.

A mis abuelos, Teodoro y Silvina, quienes siempre ocuparán un lugar especial en mi corazón. Su apoyo y sabiduría me siguen acompañando en cada paso de mi vida. Aunque ya no estén físicamente, su espíritu me sigue guiando. Este logro es un homenaje a su legado y a todo lo que significaron en mi vida. Con cariño y gratitud.

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A mi director de tesis, el Dr. Mario Moscosa Santillán, por su confianza para recibirme como su alumna y permitirme trabajar a su lado en este proyecto de investigación. Gracias por los conocimientos que compartió conmigo, pero sobre todo gracias por su apoyo y compromiso para sacar adelante el proyecto.

A mi co-directora de tesis, la Dra. María Zenaida Saavedra Leos, por continuar apoyándome a través de los años en la aventura de convertirme en científica, por ser un gran ejemplo de investigadora y persona, y porque gracias a usted este trabajo pudo ir más allá de lo esperado.

A la M.C. Rosa Elena Delgado Portales, por la generosidad y paciencia para compartir sus conocimientos de laboratorio conmigo, por enseñarme a no rendirme, y sobre todo por sus consejos como investigadora y como persona.

Al Dr. Luis Manuel Rosales Colunga, por compartir sus conocimientos dentro y fuera del aula, y apoyarme durante el proyecto a pesar de las dificultades técnicas, por su compromiso y su ética de trabajo.

Al Dr. Raúl González García, por la ayuda brindada para la realización de este proyecto y por los conocimientos otorgados en el aula durante el posgrado.

A la I.A. Alejandra Loredo Becerra, por su apoyo y paciencia en el laboratorio de Microbiología de Alimentos, por su disposición a compartir su conocimiento y por sus consejos.

A la M.C. Elsa Liliana Ramírez Zapata por su apoyo y compañía durante las largas horas en el laboratorio de Microbiología de Alimentos.

Al Dr. César Iván Godínez Hernández, por permitirme usar equipos de su laboratorio en el Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, y por su disposición para enseñarme cosas nuevas.

Al Dr. Marco Martín González Chávez, por la disposición para usar su laboratorio en la Facultad de Ciencias Químicas.

## RESUMEN

Este trabajo presenta un estudio preliminar para la valorización de residuos agroalimentarios mediante procesos biotecnológicos, enfocado en la producción de ácido láctico a partir de sistemas modelo ricos en azúcares. Estos sistemas fueron diseñados para simular las características de los hidrolizados del bagazo de *Agave salmiana*, un residuo lignocelulósico generado en grandes cantidades por la industria mezcalera.

Se evaluaron distintas cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL), así como los efectos del pH, la concentración de glucosa y el control del medio sobre la producción de ácido láctico. Las cepas *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 destacaron por su desempeño. Bajo condiciones optimizadas, *B. coagulans* logró una producción de 58.2 g/L de ácido láctico, con un rendimiento de 0.83 g/g y una conversión de glucosa de hasta 97%, resultados que son comparables a los de procesos industriales que utilizan azúcares refinados.

Este estudio constituye la primera etapa del desarrollo de un proceso sostenible para valorizar bagazo de agave, sentando las bases técnicas para su aplicación a nivel de bioproceso. Los hallazgos evidencian el potencial competitivo de este residuo como materia prima en la producción de ácido láctico, lo que permitiría reducir costos, minimizar impactos ambientales y sustituir parcialmente fuentes fósiles.

En el contexto de la economía circular, la transformación del bagazo de agave en productos de valor agregado contribuye a cerrar ciclos productivos, impulsar la bioeconomía y promover la gestión responsable de residuos agroindustriales.

**Palabras clave:** Biomasa lignocelulósica, bagazo de agave, fermentación microbiana, BAL, ácido láctico.

## ABSTRACT

This work presents a preliminary study for the valorization of agri-food waste through biotechnological processes, focusing on the production of lactic acid from sugar-rich model systems. These systems were designed to simulate the characteristics of *Agave salmiana* bagasse hydrolysates, a lignocellulosic waste generated in large quantities by the mezcal industry.

Different strains of lactic acid bacteria (LAB) were evaluated, as well as the effects of pH, glucose concentration, and environmental control on lactic acid production. The strains *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and *Lactobacillus casei* ATCC 393 stood out for their performance. Under optimized conditions, *B. coagulans* achieved a production of 58.2 g/L of lactic acid, with a yield of 0.83 g/g and a glucose conversion of up to 97%, results comparable to those of industrial processes using refined sugars.

This study constitutes the first stage in the development of a sustainable process for valorizing agave bagasse, laying the technical foundation for its application at the bioprocess level. The findings demonstrate the competitive potential of this waste as a raw material in the production of lactic acid, which would reduce costs, minimize environmental impacts, and partially replace fossil fuels.

In the context of the circular economy, the transformation of agave bagasse into value-added products contributes to closing production cycles, boosting the bioeconomy, and promoting the responsible management of agro-industrial waste.

**Key words:** Lignocellulosic biomass, agave bagasse, microbial fermentation, LAB, lactic acid.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
2.1	BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....	4
2.1.1	<i>Celulosa</i> .....	5
2.1.2	<i>Hemicelulosa</i> .....	7
2.1.3	<i>Lignina</i> .....	8
2.2	CLASIFICACIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	9
2.3	RUTAS DE CONVERSIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....	10
2.4	RESIDUOS AGROINDUSTRIALES .....	11
2.4.1	<i>Residuos del agave tequilero</i> .....	12
2.5	ÁCIDO LÁCTICO .....	14
2.6	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	16
2.6.1	<i>Síntesis química</i> .....	18
2.6.2	<i>Fermentación microbiana</i> .....	18
2.7	MICROORGANISMOS USADOS EN LA PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO .....	20
2.7.1	<i>Bacterias ácido-lácticas</i> .....	21
2.7.1.1	Género <i>Lactobacillus</i> .....	23
2.7.1.2	Género <i>Bacillus</i> .....	24
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
5.1	OBJETIVO GENERAL .....	27
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>

6.1	MATERIALES .....	28
6.2	CEPAS.....	28
6.3	EQUIPOS.....	29
6.4	METODOLOGÍA .....	29
6.4.1	<i>Activación de cepas.....</i>	29
6.4.2	<i>Análisis morfológico.....</i>	32
6.4.3	<i>Conservación y almacenamiento en glicerol .....</i>	33
6.4.4	<i>Preparación del inóculo .....</i>	34
6.4.5	<i>Cuantificación de carga microbiana.....</i>	35
6.4.6	<i>Seguimiento preliminar de pH en medio de cultivo para la cepa Bacillus ATCC 7050 .....</i>	36
6.4.7	<i>Pruebas preliminares de fermentación en sistemas modelo ricos en azúcares con 4 cepas de BAL.....</i>	40
6.4.7.1	<i>Seguimiento de la fermentación en sistemas modelo .....</i>	41
6.4.8	<i>Diseño de experimentos.....</i>	44
6.4.9	<i>Pruebas finales de fermentación en sistemas modelo ricos en azúcares (diseño de experimentos).....</i>	47
6.4.10	<i>Cuantificación de ácido láctico producido mediante HPLC.....</i>	49
6.4.10.1	<i>Preparación de muestras de fermentación.....</i>	51
6.4.10.2	<i>Preparación de soluciones estándar de ácido láctico y glucosa.....</i>	51
6.4.10.3	<i>Condiciones de operación de HPLC .....</i>	51
6.4.10.4	<i>Cuantificación de ácido láctico y glucosa .....</i>	52
6.4.11	<i>Tasa de transformación de glucosa (xG) y rendimiento de ácido láctico (YAL/G) 52</i>	
6.4.12	<i>Análisis estadístico (ANOVA).....</i>	54
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
7.1	ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS .....	56
7.2	ANÁLISIS MORFOLÓGICO .....	60

7.3	SEGUIMIENTO PRELIMINAR DE PH EN MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA <i>BACILLUS COAGULANS</i> ATCC 7050.....	64
7.4	PRUEBAS PRELIMINARES DE FERMENTACIÓN EN 4 SISTEMAS MODELO RICOS EN AZÚCARES Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO FINAL .....	67
7.5	DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	76
7.6	PRUEBAS FINALES DE FERMENTACIÓN EN SISTEMAS MODELO RICOS EN AZÚCARES (DISEÑO DE EXPERIMENTOS) CON CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO .....	78
7.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA PRUEBAS FINALES DE FERMENTACIÓN EN MEDIOS MODELO .....	109
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>119</b>
<b>11</b>	<b>RESEÑA DEL ARTÍCULO.....</b>	<b>133</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de polisacáridos de distintas especies de agave .....	13
<b>Tabla 2.</b> Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico .....	15
<b>Tabla 3.</b> Composición de sistemas modelo.....	41
<b>Tabla 4.</b> Nomenclatura y parámetros para las variables a evaluar en el diseño de experimentos.....	46
<b>Tabla 5.</b> Diseño experimental codificado propuesto .....	46
<b>Tabla 6.</b> Carga microbiana inóculos.....	70
<b>Tabla 7.</b> Peso seco biomasa final .....	75
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación ácido láctico.....	73
<b>Tabla 9.</b> Cuantificación glucosa .....	73
<b>Tabla 10.</b> Tasa de transformación de glucosa ( $xG$ ) y rendimiento de ácido láctico ( $YAL/G$ ).....	76
<b>Tabla 11.</b> Diseño de experimentos .....	77
<b>Tabla 12.</b> Carga microbiana inóculos microorganismos usados en pruebas final.....	84
<b>Tabla 13.</b> Peso seco biomasa final en pruebas finales de fermentación .....	92
<b>Tabla 14.</b> Cuantificación de ácido láctico producido .....	94
<b>Tabla 15.</b> Cuantificación de la glucosa residual en el medio de fermentación .....	96
<b>Tabla 16.</b> Tasa de transformación de glucosa ( $xG$ ) y rendimiento de ácido láctico ( $YAL/G$ ) en pruebas finales .....	101
<b>Tabla 17.</b> Matriz del diseño experimental .....	106
<b>Tabla 18.</b> Resultados del ANOVA correspondientes al análisis de diseño de experimentos propuesto.....	112
<b>Tabla 19.</b> Lista de coeficientes del modelo propuesto .....	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la biomasa lignocelulósica (Abolore et al., 2024).....	5
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la celulosa (Díaz-Orozco et al., 2025).....	6
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la hemicelulosa (Díaz-Orozco et al., 2025).....	8
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la lignina (Díaz-Orozco et al., 2025) .....	9
<b>Figura 5.</b> Composición de la biomasa lignocelulósica del agave (Díaz-Orozco et al., 2025) .....	13
<b>Figura 6.</b> Estructura del ácido L-láctico y D-Lactico (Díaz-Orozco et al., 2025) .....	16
<b>Figura 7.</b> Rutas metabólicas involucradas en la producción de ácido láctico a partir de diferentes fuentes de biomasa lignocelulósica (Cubas-Cano et al., 2020) .....	22
<b>Figura 8.</b> Tubo activación <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> ATCC 8000 .....	56
<b>Figura 9.</b> Tubo activación <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050 .....	57
<b>Figura 10.</b> Tubo activación <i>Bacillus coagulans</i> .....	58
<b>Figura 11.</b> Tubo activación <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	59
<b>Figura 12.</b> Tubo activación <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	59
<b>Figura 13.</b> Morfología microscópica <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> ATCC 8000 .....	60
<b>Figura 14.</b> Morfología microscópica <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050 .....	61
<b>Figura 15.</b> Morfología macroscópica <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050 .....	61
<b>Figura 16.</b> Morfología microscópica <i>Bacillus coagulans</i> .....	61
<b>Figura 17.</b> Morfología macroscópica <i>Bacillus coagulans</i> .....	61
<b>Figura 18.</b> Morfología microscópica <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 .....	62
<b>Figura 19.</b> Morfología macroscópica <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	62
<b>Figura 20.</b> Morfología microscópica <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	63
<b>Figura 21.</b> Morfología macroscópica <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	63
<b>Figura 22.</b> Evolución de pH en medio de cultivo MRS ajustado con solución de NaOH 2M con <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050. ....	66

<b>Figura 23.</b> Comparación de la evolución natural de pH en medio de cultivo MRS y medio modelo de fermentación adicionado con CaCO <sub>3</sub> con <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050. ....	67
<b>Figura 24.</b> Evolución de pH sistemas modelo ricos en azúcares utilizando <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050, <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . ....	69
<b>Figura 25.</b> Curva de crecimiento para <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050 en un sistema modelo rico en azúcares .....	71
<b>Figura 26.</b> Curva de crecimiento para <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 en un sistema modelo rico en azúcares .....	72
<b>Figura 27.</b> Curva de crecimiento para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> en un sistema modelo rico en azúcares .....	73
<b>Figura 28.</b> Curva de calibración para ácido láctico .....	76
<b>Figura 29.</b> Curva de calibración para glucosa .....	76
<b>Figura 30.</b> Cromatograma para ácido láctico y glucosa.....	72
<b>Figura 31.</b> Evolución de pH en medio con y sin control, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 .....	78
<b>Figura 32.</b> Evolución de pH en medio con y sin control, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 .....	80
<b>Figura 33.</b> Comparación de la evolución de pH para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393, en medio con control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa.....	82
<b>Figura 34.</b> Comparación de la evolución de pH para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393, en medio sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa.....	83
<b>Figura 35.</b> Curva de crecimiento en medio con y sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 .....	85
<b>Figura 36.</b> Curva de crecimiento en medio con y sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando <i>L. casei</i> ATCC 393.....	86

<b>Figura 37.</b> Comparación de las curvas de crecimiento para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393, en medio con control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa.....	88
<b>Figura 38.</b> Comparación de las curvas de crecimiento para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393, en medio sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa.....	89
<b>Figura 39.</b> Evolución y comparación de la producción de ácido láctico en medio con 60 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393.....	97
<b>Figura 40.</b> Evolución y comparación de la producción de ácido láctico en medio con 120 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393.....	98
<b>Figura 41.</b> Evolución y comparación del consumo de glucosa (sustrato) en medio con 60 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393.....	99
<b>Figura 42.</b> Evolución y comparación del consumo de glucosa (sustrato) en medio con 120 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para <i>B. coagulans</i> ATCC 7050 y <i>L. casei</i> ATCC 393.....	100
<b>Figura 43.</b> Evolución de pH, crecimiento microbiano, producción de ácido láctico y consumo de glucosa para un sistema modelo rico en azúcares con 60 g/L de glucosa, sin control de pH con <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393.....	109
<b>Figura 44.</b> Efecto de los factores analizados para el modelo planteado en el diseño de experimentos. Tip se refiere a tipo de microorganismo utilizado ( <i>L. casei</i> o <i>B. coagulans</i> ); C_g se refiere a concentración de glucosa; CON se refiere a medio con control y sin control de pH.....	114

## 1 INTRODUCCIÓN

En el contexto actual de crisis climática, escasez de recursos fósiles y aumento de residuos agroindustriales, ha surgido una fuerte demanda en la búsqueda de soluciones sostenibles orientadas hacia el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica proveniente de los residuos agroindustriales. En este marco, la economía circular y la bioeconomía han emergido como modelos clave para el desarrollo económico basado en el uso eficiente y renovable de los recursos biológicos. Este enfoque promueve la generación de productos, energía y materiales a partir de biomasa, con el objetivo de reducir la dependencia de insumos no renovables, minimizar los impactos ambientales y fomentar la circularidad en los procesos industriales. Así, el propósito fundamental de estos modelos es la integración armoniosa entre crecimiento económico, bienestar social y protección ambiental. Para lograr el desarrollo sostenible de la bioeconomía circular, se plantea implementar tecnologías innovadoras para la valorización de residuos orgánicos. En este contexto, los residuos agroindustriales representan una fuente abundante de biomasa lignocelulósica, un recurso renovable compuesto de polisacáridos el cual a través de procesos biotecnológicos puede transformarse en productos de alto valor agregado y biocombustibles.

De esta forma, la industria agroalimentaria, la cual abarca todas las actividades relacionadas con la transformación de materias primas agrícolas, ganaderas, pesqueras y forestales en productos con alto valor agregado, es uno de los sectores económicos más importantes a nivel global, pero también uno de los principales generadores de residuos sólidos orgánicos. En particular, la industria tequilera y mezcalera en México, principalmente en el estado de San Luis Potosí, produce grandes volúmenes de bagazo de agave, un subproducto fibroso resultante de la extracción de azúcares fermentables de las piñas del agave, especialmente en los procesos de producción de mezcal y tequila. Este residuo lignocelulósico, aunque rico en compuestos orgánicos como celulosa, hemicelulosa y lignina, se gestiona de manera inadecuada en la mayoría de los casos, generando problemas de contaminación por su alta carga orgánica y lenta degradación.

Por lo tanto, la fabricación de productos de valor agregado a partir de distintas fuentes de biomasa lignocelulósica, como el bagazo de agave representa una alternativa sostenible que puede contribuir a mitigar los desafíos asociados con la gestión de residuos agroindustriales como el bagazo de agave. Así mismo, la identificación de beneficios y necesidades tecnológicas para optimizar el aprovechamiento de estos residuos resulta fundamental para impulsar el desarrollo de procesos más eficientes y sostenibles. Esto no solo permite una valorización integral de residuos orgánicos, sino que también contribuye al avance de un modelo productivo más responsable con el entorno. En este sentido, se destaca la importancia de adoptar un modelo de economía circular, considerando el potencial valor de los productos derivados dentro del mercado bioeconómico.

Por otra parte, la demanda de ácido láctico ha crecido exponencialmente en los últimos años, impulsada por sus múltiples aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética, química y de materiales biodegradables (Nwamba et al., 2021). En este sentido, el ácido láctico se ha consolidado como una molécula plataforma dentro de la bioeconomía. Sin embargo, su producción convencional a partir de azúcares refinados implica altos costos y un impacto ambiental significativo, lo que ha llevado a la búsqueda de materias primas alternativas y procesos más amigables con el medio ambiente.

En este contexto, el bagazo de agave surge como una materia prima prometedora para procesos biotecnológicos. Su alto contenido de polisacáridos obtenidos a partir de la biomasa lignocelulósica, lo hace ideal para ser transformado en productos de alto valor agregado mediante fermentación microbiana usando bacterias ácido-lácticas (BAL). De esta manera, la integración de estas biotecnologías en el aprovechamiento de residuos se alinea directamente con los principios de la economía circular, ya que permite cerrar ciclos de producción al transformar desechos en insumos útiles, reduciendo la dependencia de recursos fósiles y minimizando el impacto ambiental. Así, la producción biotecnológica de ácido láctico a partir de residuos agroindustriales no solo contribuye a la mitigación de problemas ambientales

asociados a los desechos orgánicos, sino que también impulsa el desarrollo de cadenas de valor sostenibles dentro de sectores industriales estratégicos.

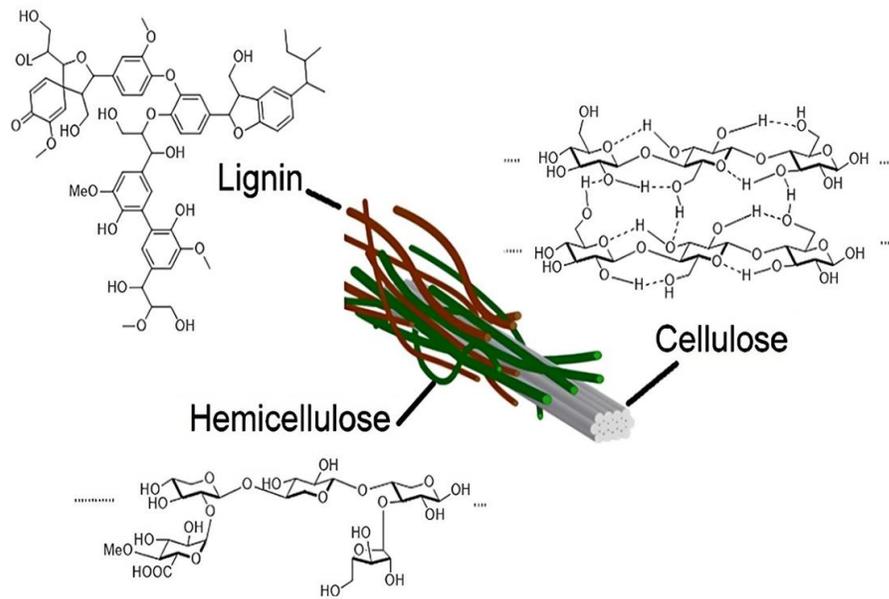
En este contexto, la presente investigación tiene como finalidad establecer un proceso biotecnológico de fermentación microbiana con bacterias ácido-lácticas en sistemas modelo ricos en azúcares, como base para la posterior valorización del bagazo de *Agave salmiana*.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Biomasa lignocelulósica

Ante la necesidad de encontrar fuentes alternativas para la obtención de productos químicos básicos y combustibles de transporte con bajo impacto ambiental, la biomasa lignocelulósica se perfila como un insumo estratégico, dado su elevado volumen de producción anual (Deng et al., 2023). De esta manera, el manejo responsable y sostenible de los residuos agroalimentarios se ha convertido en un aspecto fundamental de las estrategias globales que buscan crear armonía entre la protección ambiental y el crecimiento económico (Serrano-Martínez et al., 2024). Autores como Dahmen et al., (2019) mencionan que los recursos renovables, como la biomasa lignocelulósica, representan una buena alternativa para lograr las cero emisiones netas de carbono.

La biomasa, como recurso biológico sostenible típico, se refiere a diversos organismos, incluidos animales, plantas y microorganismos, que facilitan la conversión de dióxido de carbono, agua y luz solar a través de la fotosíntesis (K. Wang et al., 2024). La biomasa lignocelulósica se refiere a materiales de origen vegetal, los cuales forman parte de la pared celular vegetal de un conjunto de tejidos celulósicos, típicamente compuesta por polisacáridos y polímeros aromáticos, además de otros componentes en menor proporción como la pectina, proteínas, sales y minerales (Ameh et al., 2024; Li et al., 2024). La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente de polisacáridos de celulosa (23-50%) y hemicelulosa (12-29%), así como del polímero aromático como lignina (13-31%) (Abolore et al., 2024). En la Figura 1 se muestra la estructura química de la biomasa lignocelulósica.

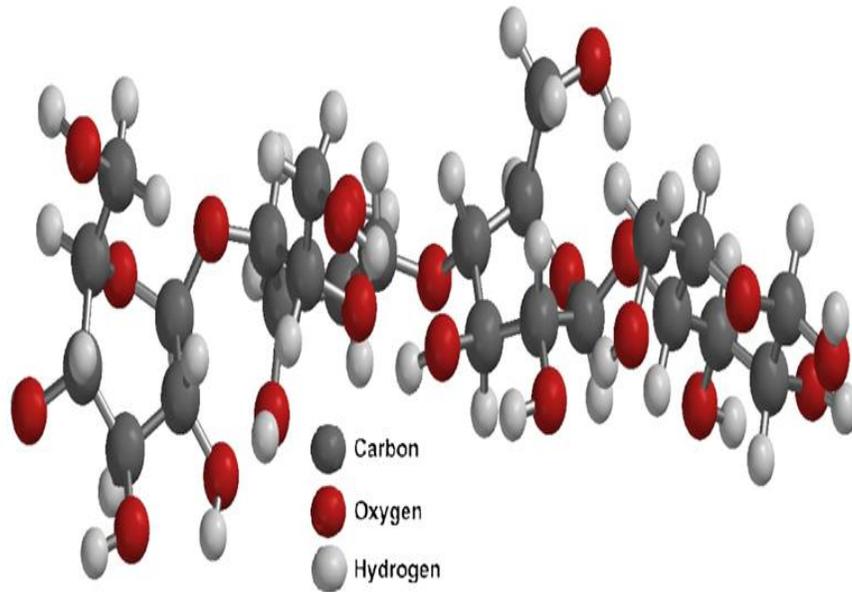


**Figura 1.** Estructura química de la biomasa lignocelulósica (Abolore et al., 2024)

### 2.1.1 Celulosa

La celulosa es el componente principal de las paredes celulares de las plantas, proporciona rigidez y fuerza a las células vegetales y es la fuente más abundante de polisacáridos renovables en la Tierra (Sharma et al., 2019). La celulosa presenta una estructura semicristalina lineal, la cual contiene unidades repetidas de D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4, las cuales se organizan para formar celulosa natural (Adewuyi, 2022). La Figura 2 muestra la estructura química de la celulosa. Las microfibrillas de celulosa son cadenas de celulosa, compuestas por grupos de 500 a 1400 unidades de D-glucosa empaquetadas (Zoghalmi & Paës, 2019). La compleja estructura multinivel de la celulosa está compuesta de manojos o agregados de fibrillas ultrafinas donde las diversas cadenas de celulosa están presentes en la fibrilla superfina y cada una de las fibrillas está formada por dominios repetidos grandes ordenados (cristalinos) y pequeños desordenados (amorfo) con diferentes dimensiones de sección transversal (Collard & Blin, 2014). De esta manera,

las cadenas de celulosa están altamente alineadas en la región cristalina de una fibrilla de celulosa y de acuerdo con el alineamiento se establecen las distintas formas de la celulosa (Klemm et al., 2011).



**Figura 2.** Estructura química de la celulosa (Díaz-Orozco et al., 2025)

Del mismo modo, el polimorfo de celulosa se refiere a las diferentes formas cristalinas de celulosa: celulosa I, celulosa II, celulosa III y celulosa IV. La celulosa I es una celulosa natural y su estructura cristalina y composición altamente organizada la hacen particularmente resistente a la degradación. En la celulosa I, las cadenas de celulosa individuales están dispuestas en paralelo y unidas por enlaces de hidrógeno. Debido a esta configuración, la celulosa I tiene una alta resistencia a la tensión y es un material que proporciona estructura a las plantas (Goldberg et al., 2015).

La celulosa II se forma cuando la celulosa I se somete a procesos químicos específicos como la mercerización o el tratamiento con ácidos fuertes. La celulosa II es amorfa y menos organizada. El proceso químico rompe los enlaces de hidrógeno que sujetan las cadenas de celulosa, lo que da como resultado una estructura menos ordenada. La celulosa II es más accesible a las reacciones químicas y se utiliza a

menudo en procesos industriales para producir productos a base de celulosa, como rayón, celofán y acetato de celulosa (Khan et al., 2022).

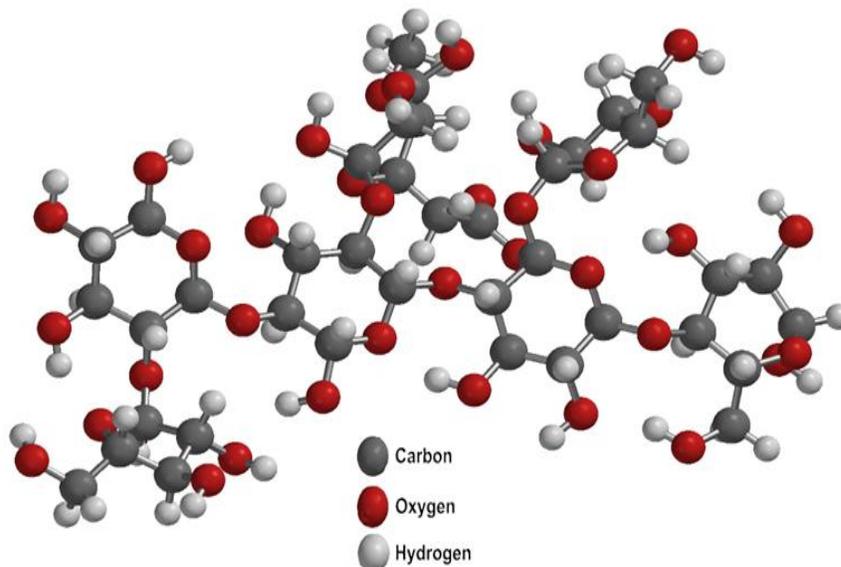
La celulosa III es un alomorfo (estructura química con diferentes variaciones) de la celulosa producida al tratar la celulosa I o II con aminas y tiene una disposición estructural variada a pesar de estar compuesto de monómeros de glucosa idénticos y a menudo exhibe menos cristalinidad.

La celulosa IV se produce cuando la celulosa III se calienta a temperaturas extremadamente altas y se trata con glicerol (He et al., 2021). La celulosa I y la celulosa II son los dos tipos de celulosa más comunes en la naturaleza, la celulosa III y IV se investigan con menos frecuencia. La estructura final de cada tipo de celulosa puede verse directamente influenciada por técnicas de pretratamiento; la elección del método de tratamiento depende de la composición esperada y las características de la celulosa. Por tanto, el componente fundamental del complejo lignocelulósico es la celulosa, que forma una estructura esquelética a lo largo de la pared celular. Sin embargo, los huecos internos también están llenos de compuestos aglutinantes, como hemicelulosa y lignina.

### **2.1.2 Hemicelulosa**

La hemicelulosa es un grupo de polisacáridos heterogéneos presentes en las paredes celulares de las plantas, que actúan como una matriz de soporte complementaria no cristalina a la celulosa cristalina (R. Xu et al., 2025). A diferencia de la celulosa, que es un polímero lineal compuesto únicamente de moléculas de glucosa, la hemicelulosa tiene una estructura ramificada y es más amorfa, lo que la hace menos resistente, además se encuentra asociada a la celulosa y la lignina en la pared celular (Nwamba et al., 2021). Aunque su estructura y composición pueden variar según la especie vegetal, la hemicelulosa generalmente está formada por una mezcla de pentosas como xilosa y arabinosa, además de hexosas como manosa,

ramnosa, glucosa y galactosa, y ácido glucónico (Li et al., 2024). La Figura 3 muestra la estructura química de la hemicelulosa.

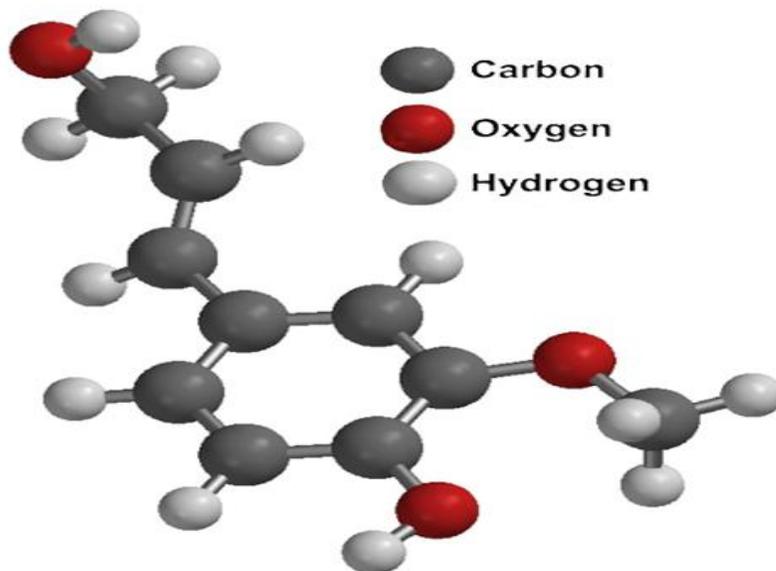


**Figura 3.** Estructura química de la hemicelulosa (Díaz-Orozco et al., 2025)

### 2.1.3 *Lignina*

La lignina es un polímero orgánico complejo y heterogéneo que se encuentra en las paredes celulares de las plantas, especialmente en los tejidos lignocelulósicos como la madera, el bagazo y otros residuos agrícolas. Es uno de los principales componentes de la biomasa vegetal, junto con la celulosa y la hemicelulosa. La lignina es un polímero fenólico cuya composición es diversa por los diferentes monómeros y enlaces que la componen, que son resultado de las distintas enzimas que participan en la biosíntesis y durante la polimerización en la pared celular (Sapouna et al., 2023). De manera general, la lignina es un compuesto fenólico natural de alto peso molecular, constituido por unidades de fenilpropano enlazadas mediante enlaces éter y enlaces carbono-carbono. Sus tres monómeros básicos, conocidos como monolignoles, son el alcohol p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico. Una vez integrados en la estructura polimérica de la lignina, estos monómeros dan lugar a unidades

estructurales denominadas p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), respectivamente (Tanis et al., 2024; Tavares et al., 2022). De esta forma, la lignina actúa como un pegamento que une las fibras de celulosa y hemicelulosa, proporcionando rigidez, impermeabilidad y resistencia a los tejidos vegetales. La Figura 4 muestra la estructura química de la lignina.



**Figura 4.** Estructura química de la lignina (Díaz-Orozco et al., 2025)

## 2.2 Clasificación de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se puede dividir en dos categorías principales: biomasa de desechos leñosos y biomasa de desechos no leñosos. La biomasa leñosa incluye residuos forestales como árboles de abeto y cedro, astillas de madera y aserrín entre otros. La biomasa leñosa es el material orgánico más abundante en la tierra con composiciones variables de celulosa, hemicelulosa y lignina, según la especie de árbol (Konstantinavičienė & Vitunskienė, 2023). Por otra parte, la biomasa no leñosa se refiere a los materiales vegetales que no provienen de árboles o maderas, pero que pueden ser utilizados como fuente de energía o como materia prima para diversos procesos industriales (Bichot et al., 2020).

Las fuentes de celulosa no madereras se clasifican en tres categorías principales según su origen: subproductos agrícolas, desechos municipales lignocelulósicos y cultivos energéticos. Los subproductos agrícolas se refieren a las partes no comestibles del cultivo que quedan después de la cosecha. Incluyen residuos agrícolas primarios o del campo que se generan durante la cosecha como tallos, hojas, vainas, y residuos secundarios que se procesan a base de residuos formados simultáneamente con el producto durante el procesamiento como melaza, bagazo y pulpa (Calvo-Saad et al., 2023; Erdiwansyah et al., 2024). Los residuos municipales, se refieren a diversos tipos de residuos generados en áreas urbanas, así como a los residuos domésticos, comerciales y de la industria alimentaria de lignocelulosa. Los residuos municipales incluyen una amplia gama de materiales como residuos de papel, cartón, restos de comida, residuos de jardín y residuos textiles Umer et al., 2024). En los cultivos energéticos, la celulosa bacteriana o microbiana se diferencia de la celulosa vegetal en que tiene mayor pureza, resistencia, moldeabilidad y capacidad de retención de agua. La celulosa bacteriana es un polímero obtenido por fermentación con microorganismos de los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina*, de las cuales la especie más eficiente es la *Acetobacter Xylinum*. Este polímero presenta la misma estructura química de la celulosa de origen vegetal, pero difiere en su conformación y propiedades fisicoquímicas (Manandhar & Shah, 2023).

### **2.3 Rutas de conversión biotecnológica de la biomasa lignocelulósica**

La biomasa lignocelulósica representa una materia prima estratégica para aplicaciones industriales debido a su carácter renovable y alto contenido de carbohidratos fermentables. Su valorización puede llevarse a cabo principalmente a través de dos rutas biotecnológicas, una es la hidrólisis enzimática de azúcares seguida de fermentación; y otra es la fermentación anaerobia para la obtención de ácidos carboxílicos, donde las principales diferencias son el tipo de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, el grado de hidrólisis y el tipo de microorganismos. Para la

primera ruta es necesario un pretratamiento físico o químico seguido de una hidrólisis enzimática completa para liberar los azúcares fermentables así como el uso de microorganismos específicos para cada tipo de azúcar, mientras que para la fermentación anaerobia el pretratamiento y la hidrólisis puede ser parcial debido a la versatilidad metabólica de los microorganismos involucrados y a la naturaleza del proceso mismo, donde se utilizan grupos de diferentes tipos de bacterias que trabajan juntas, y que pueden ser capaces de producir sus propias enzimas para degradar parcialmente la lignocelulosa, e incluso en la fermentación anaerobia los microorganismos son capaces de consumir polisacáridos parcialmente hidrolizados, por lo tanto, no es necesario completar la hidrólisis (Rawoof et al., 2021). En procesos industriales basados en la hidrólisis enzimática, la glucosa liberada es transformada eficientemente por cepas microbianas en productos como bioetanol o ácido láctico. Por su parte, la fermentación anaerobia se orienta al desarrollo y optimización de tecnologías existentes en la producción de biogás y carboxilatos (Abedi & Hashemi, 2020). La abundancia de esta biomasa y la posibilidad de integrar microorganismos específicos en los procesos permite no solo reducir residuos y costos operativos, sino también ayuda a la sostenibilidad y reducción de desechos, siendo esto clave para procesos industriales más ecológicos.

## **2.4 Residuos agroindustriales**

Los residuos orgánicos se encuentran en abundancia a nivel global y están compuestos principalmente por materia orgánica biodegradable, la cual representa una fuente valiosa para la obtención de compuestos químicos de origen biológico. Conforme al Artículo 19 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de Residuos (SEMARNAT, 2003), los residuos pueden clasificarse en función de su origen, incluyendo aquellos derivados de actividades pesqueras, agrícolas, silvícolas, forestales, avícolas y ganaderas, así como los desechos provenientes de los insumos utilizados en dichas actividades. Dentro de esta clasificación se encuentran los residuos agroindustriales, los cuales según Sadh et al., (2018) en el contexto de la

agroindustria, se subdividen en dos categorías principales: residuos agrícolas y residuos industriales. Los residuos agrícolas corresponden a los materiales residuales que quedan en el campo tras la cosecha, como hojas, tallos o vainas, mientras que los residuos industriales se refieren a los desechos orgánicos generados durante el procesamiento industrial, incluyendo compuestos como celulosa, hemicelulosa, lignina y nitrógeno. Por otro lado, los residuos industriales son materiales secundarios que no constituyen el producto principal de los procesos de transformación, producción o procesamiento de materia prima, pero que poseen un valor económico, ambiental o industrial, permitiendo su aprovechamiento en distintos sectores. Un ejemplo representativo de residuo agroindustrial es el bagazo de agave, subproducto característico de las industrias tequilera y mezcalera.

#### **2.4.1 Residuos del agave tequilero**

El tequila es una de las bebidas más populares y reconocidas a nivel mundial. Es obtenido a partir de la fermentación y destilación de distintas variedades de agave. Autores como Álvarez-Chávez et al., (2021) reportan que el agave se utiliza principalmente para la producción de bebidas alcohólicas no destiladas como el pulque, y destiladas (licores) incluyendo tequila, mezcal, bacanora, raicilla y sotol, entre otros. Es una tradición y parte importante de la economía mexicana. Sin embargo, la producción de tequila genera principalmente dos tipos de desechos: las vinazas líquidas provenientes de la destilación y el bagazo sólido resultante de la molienda del agave para la extracción de jugos (Lara-Topete et al., 2024).

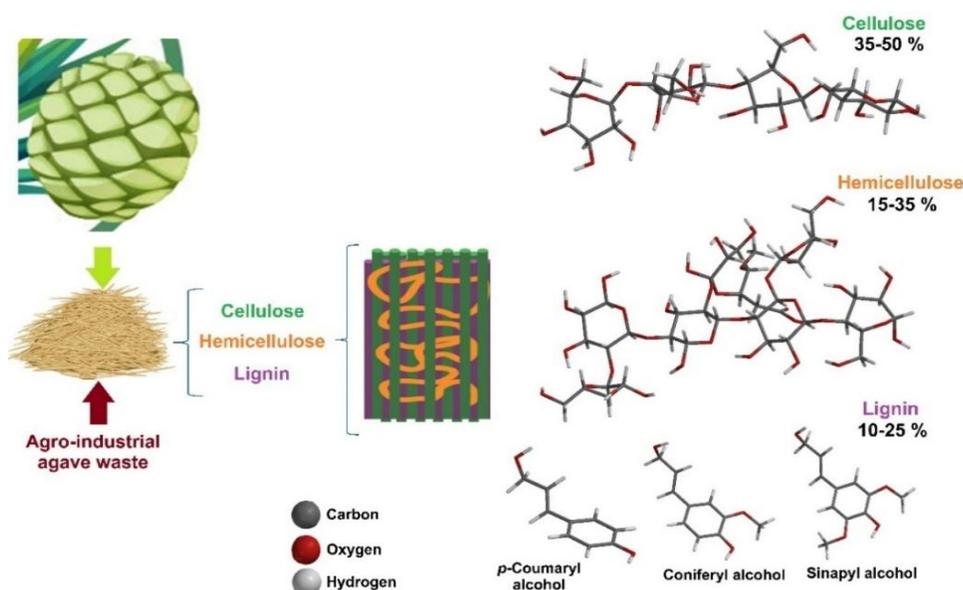
El bagazo de agave es un material fibroso residual resultante de la extracción del jugo fermentable de la piña de agave, y representa alrededor de un 40% del peso total del procesamiento del agave molido en peso húmedo (Kumar & Ram, 2021). El bagazo está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, además de otros compuestos como cenizas (Palacios Hinestroza et al., 2019). Diversos estudios han demostrado que la composición estándar incluye entre 41-45% de celulosa, 19-25% de hemicelulosa, 15-20% de lignina y entre 6-7% de otros

componentes, sin embargo, dependiendo de la especie de agave los porcentajes pueden variar (Estrada Maya & Weber, 2022; Lazaro-Romero et al., 2024). A continuación, en la Tabla 1 se muestran algunos porcentajes de estos polisacáridos de la familia *Asparagaceae*, género *Agave* para las especies *tequilana*, *salmiana* y *duranguensis*. En la Figura 5 se muestra la composición de la biomasa lignocelulósica del agave.

**Tabla 1.** Porcentaje de polisacáridos de distintas especies de agave

Componente (%)	<i>Agave tequilana</i>	<i>Agave salmiana</i>	<i>Agave americana</i>	<i>Agave durangensis</i>
	Bagazo	Bagazo	Bagazo	Bagazo
<b>Celulosa</b>	41.8-42.0	35.0	39.4	48.0
<b>Hemicelulosa</b>	4.4-20	4.6	-	34.1
<b>Lignina</b>	7.1-20.1	13.0-19.1	11.6	20.7

Fuente: (Álvarez-Chávez et al., 2021; Honorato-Salazar et al., 2021; Lazaro-Romero et al., 2024)



**Figura 5.** Composición de la biomasa lignocelulósica del agave (Díaz-Orozco et al., 2025)

De esta forma, el bagazo de agave es un subproducto lignocelulósico generado en grandes cantidades por las industrias tequilera y mezcalera, y tiene un gran potencial para ser utilizado en procesos biotecnológicos, como la producción de ácido láctico mediante fermentación microbiana. Los procesos de fermentación podrían potenciar la liberación de los compuestos bioactivos, con la adición de bacterias ácido-lácticas, con el objetivo de promover la liberación mediante la acidificación y la actividad enzimática (Bautista-Espinoza et al., 2025). Esta estrategia permite valorizar este residuo agroindustrial, reduciendo su impacto ambiental y generando un producto de alto valor agregado con amplias aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y de materiales biodegradables.

## 2.5 Ácido láctico

El ácido láctico, es un compuesto orgánico natural formado por un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo, lo cual lo convierte en un ácido carboxílico de fórmula  $\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$  (John et al., 2007).

El ácido láctico es un quirómero, lo que significa que presenta dos isómeros ópticamente activos, llamados enantiómeros. Las dos formas de enantiómeros son, la dextrógira llamado ácido L (+) láctico y la levógira llamada ácido D (-) láctico, además de una forma ramificada constituida por fracciones equimolares de las formas L (+) y D (-) ópticamente inactiva (de França et al., 2022), como se muestra en la Figura 6. Por lo tanto, el comportamiento químico del ácido láctico está determinado por sus propiedades fisicoquímicas, como el carácter ácido, la reactividad de los grupos carboxilo e hidroxilo y a su actividad óptica simétrica en el carbono quiral (Castillo Martinez et al., 2013).

El ácido láctico se hidroliza a dióxido de carbono y agua, es un líquido con aspecto y consistencia viscosa, higroscópico, incoloro, inodoro, soluble en éter, miscible en agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter de petróleo y disulfuro de carbono, con un punto de fusión bajo (Oyewole et al., 2023). En la Tabla 2 se muestran

algunas de las propiedades fisicoquímicas para los isómeros de ácido láctico en la naturaleza.

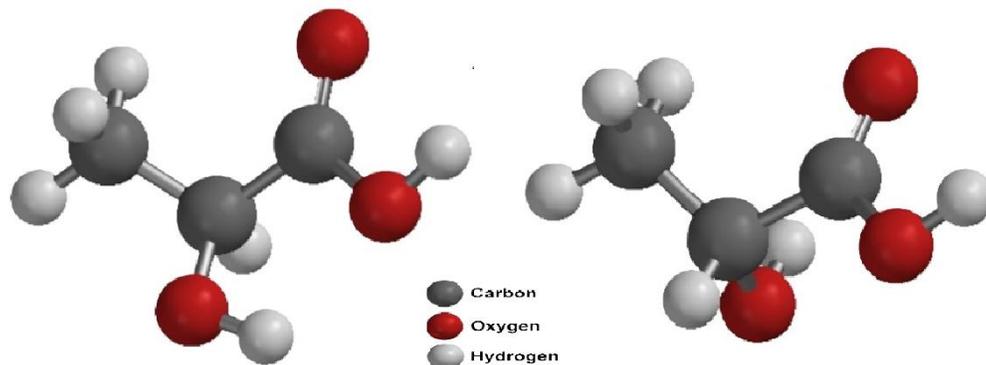
**Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico**

Isómero	Ácido D (-) láctico	Ácido L (+) láctico	Mezcla de isómeros (DL)
<b>Punto de fusión (°C)</b>	52.7 – 54	52.7 – 54	16.4 - 18
<b>Punto de ebullición (°C a 1.87 kPa)</b>	103	103	82 – 122
<b>Viscosidad (mPa.s)</b>	40.33	40.33	40.33
<b>Densidad (kg/L a 20 °C)</b>	1.249 – 1.33	1.249 – 1.33	1.249 – 1.33
<b>Constante de disociación (pKa a 25 °C)</b>	3.79 – 3.86	3.79 – 3.86	3.73 – 3.79
<b>Calor de fusión (kJ/mol)</b>	11.33	11.33	16.86

Fuente: (Díaz-Orozco et al., 2025)

Debido a que el ácido láctico es una molécula  $\alpha$ -hidroxi de tres carbonos con dos grupos funcionales y un centro quiral, puede presentar reacciones de conversión química, convirtiéndolo en una molécula química versátil (Dusselier et al., 2013). El ácido láctico es un ácido orgánico importante y multifuncional, el cual presenta una amplia gama de aplicaciones industriales relacionados a sectores como el alimentario, farmacéutico, cosmético y biomédico (de Oliveira et al., 2023). Se ha reportado que el ácido D (-) láctico es perjudicial para el metabolismo humano, provocando acidosis o descalcificación, por lo cual es usado solo en el sector químico, mientras que el ácido L (+) láctico es el preferido por los sectores alimentario y farmacéutico dado que es

metabolizado por el organismo humano mediante la L-lactato deshidrogenasa (*ldhL*) que metaboliza el ácido L (+) láctico a partir del ácido pirúvico dependiente de NAD<sup>+</sup>. Además, está clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la FDA (Coelho et al., 2019; Reddy et al., 2008).



**Figura 6.** Estructura del ácido L-láctico y D-Lactico (Díaz-Orozco et al., 2025)

## 2.6 Producción de ácido láctico

El ácido láctico es el ácido hidroxicarboxílico más simple debido al  $\beta$ -carbono simétrico, y a los grupos hidroxilo reactivo (-OH) y carboxilo (-COOH). De acuerdo con Boonpan et al., (2013) existen tres tipos de ácido láctico: ácido L-láctico, ácido D-láctico y ácido D, L-láctico que es una mezcla de D y L-isómero (mezcla racémica), la forma de mezcla racémica siempre se produce mediante síntesis química, mientras que un ácido L- o D-láctico ópticamente puro se puede obtener mediante fermentación microbiana a partir de recursos renovables, dependiendo de la cepa elegida. El ácido láctico puede sufrir varias reacciones de conversión química, lo que lo convierte en una plataforma química versátil (Thygesen et al., 2021). Autores como Abdel-Rahman et al., (2013) indican que las aplicaciones industriales del ácido láctico están dirigidas a la industria alimentaria, farmacéutica, médica, cosmética, química y textil entre otras. Así mismo, autores como John et al., (2007) reportan que las aplicaciones para el área alimentaria representan aproximadamente el 85% de la demanda de ácido láctico, mientras que las aplicaciones industriales no alimentarias solo el 15% de la demanda total.

La relevancia del ácido láctico se debe a que es la biomolécula más producida debido a su versátil aplicación siendo un precursor en la producción de productos químicos de valor agregado en diversos sectores industriales como el alimentario, cosmético, farmacéutico, textil, plástico y químico. A nivel industrial el ácido láctico tiene un rol muy importante en la industria alimentaria, pues juega un papel relevante en las fermentaciones, probióticos, productos funcionales, así como en la producción de agentes antimicrobianos orgánicos empleados como conservantes (Jim Jem et al., 2010).

El ácido láctico presenta gran variedad de propiedades funcionales como reductor del pH de las carnes para inhibir su deterioro bacteriano, ayudando en la manipulación y moldeado de chocolates y dulces, mejorando el sabor, reduciendo la inversión de sacarosa en la producción de dulces y regulando el pH de lácteos, encurtidos, productos horneados y bebidas, entre otras funciones (Sionek et al., 2023). Así mismo, el ácido láctico ha ganado importancia en la industria cosmética como humectante por su capacidad de retención de agua, como aclarador de la piel y como rejuvenecedor debido a que el ácido L-láctico tiene la capacidad de inhibir la actividad de la tirosinasa, enzima esencial en la síntesis de melanina, reduciendo así la aparición de manchas en la piel (Rawoof et al., 2021). En el ámbito farmacéutico, el ácido láctico es empleado en la fabricación de ungüentos tópicos, soluciones parentales y lociones donde aporta principios activos como una fuente de minerales y ayuda al equilibrio hidroelectrolítico (Abd Alsaheb et al., 2015). En cuanto a la industria química, la presencia de dos grupos funciones reactivos convierten al ácido láctico en el monómero de materia prima con mayor potencial para transformaciones químicas en productos versátiles y útiles en la industria como el ácido propiónico, ácido acético y ácido acrílico (Ojo & de Smidt, 2023).

En este sentido, el ácido láctico puede ser producido a través de dos rutas, una es la síntesis química a partir de fuentes basadas en hidrocarburos, y otra es mediante la fermentación microbiana utilizando rutas biotecnológicas.

### **2.6.1 Síntesis química**

La síntesis química del ácido láctico se lleva a cabo mediante una serie de etapas específicas, donde se inicia con la adición del cianuro de hidrogeno al acetaldehído en presencia de una base, dando lugar a la formación de lactonitrilo, esta reacción se realiza en fase líquida bajo condiciones de alta presión. Posteriormente, el lactonitrilo obtenido es separado mediante destilación. En seguida, el lactonitrilo destilado se somete a un proceso de hidrólisis ácida utilizando HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrados, permitiendo la formación del ácido láctico, así como de una sal de amonio. Finalmente, el ácido láctico es esterificado con metanol, seguido de una hidrólisis acuosa en medio ácido, para obtener ácido láctico puro y poder recuperar el metanol (Datta et al., 1995; Komesu et al., 2017).

Sin embargo, la producción de ácido láctico por síntesis química es un proceso costoso y depende de subproductos de otras industrias derivados de recursos petroquímicos (Datta & Henry, 2006). Por otra parte, la síntesis química produce la mezcla racémica del ácido DL-láctico, la cual en muchas aplicaciones no es deseada (Pontes et al., 2021).

### **2.6.2 Fermentación microbiana**

La síntesis de ácido láctico por fermentación microbiana tiene como ventaja la producción de isómeros puros, el uso de residuos agroindustriales como sustratos de fermentación, el uso de microorganismos específicos para cada isómero del ácido láctico, el bajo costo de materia prima, el bajo consumo de energía y un alto rendimiento de producto obtenido (Koutinas et al., 2014). En este sentido Dusselier et al., (2013) indican que el 90% de la producción comercial se realiza mediante esta síntesis, y generalmente, los microorganismos transforman una fuente adecuada de carbohidratos en ácido láctico. Los sustratos son principalmente hexosas y pentosas fácilmente hidrolizables derivados de residuos agroindustriales (Kienberger et al., 2023). Actualmente, la glucosa y la sacarosa constituyen las principales materias

primas empleadas en la fermentación microbiana, aunque por otra parte la celulosa no comestible tiene un enorme potencial, ya que se considera un sustrato clave en la industria química.

En términos generales, la producción de ácido láctico a partir de la fermentación microbiana utilizando residuos agroindustriales como sustrato comprende cuatro fases principales: primero se realiza el pretratamiento de la biomasa, seguido de un proceso de sacarificación para liberar los azúcares fermentables, posteriormente los azúcares son fermentados por diversos microorganismos y finalmente el proceso concluye con la separación y purificación del ácido láctico obtenido (Wan-Mohtar et al., 2023).

A continuación, se detallan las etapas del proceso, comenzando con la primera etapa, el pretratamiento de la biomasa el cual puede realizarse mediante diversas técnicas. Entre las técnicas físicas más usadas se encuentran la molienda y extrusión, mientras que entre las técnicas químicas se pueden emplear tratamientos con álcalis, ácidos y disolventes orgánicos. En cuanto a las técnicas fisicoquímicas estas abarcan procesos como la autohidrólisis, hidrotérmólisis, oxidación y pirólisis, entre otros. Así mismo, es posible emplear técnicas eléctricas como el uso de campos eléctricos pulsados, además de técnicas biológicas que emplean hongos y bacterias (Bichot et al., 2020; Deng et al., 2023; Roy et al., 2020). En este sentido, la elección de la técnica de pretratamiento depende fundamentalmente del tipo de biomasa lignocelulósica, dado que sus características físicas y químicas determinan la agresividad de la técnica a emplear. Aunado a esto, otro factor relevante para determinar la técnica adecuada es analizar el producto final de interés, es decir, si el objetivo es producir biocombustibles o ácidos orgánicos como el ácido láctico.

La segunda etapa, la sacarificación, se lleva a cabo comúnmente mediante hidrólisis enzimática, ácida o alcalina con el objetivo de liberar azúcares fermentables a partir de los polisacáridos presentes en la biomasa (Granget et al., 2024). La hidrólisis enzimática es una operación para convertir polisacáridos, por ejemplo, la lignocelulosa en monosacáridos, dado que ofrece mejores ventajas sobre otros métodos, como una mayor eficiencia y una menor formación de subproductos indeseados, por tal motivo,

la hidrólisis enzimática es el tipo de más utilizado en la producción de ácido láctico (Ewaschuk et al., 2002).

La tercera etapa es la fermentación del hidrolizado por microorganismos seleccionados para producir ácido láctico puro ya sea en su forma L o D. En la industria, los procesos homofermentativos son más aceptados, dado que proporcionan rendimientos elevados de ácido láctico con una alta pureza óptica además de una baja generación de subproductos. El ácido láctico derivado de la fermentación microbiana suele contener aproximadamente un 99.5% del isómero L y un 0.5% del isómero D (Vink et al., 2003). El proceso de fermentación microbiana regularmente se desarrolla a temperaturas entre 20 a 35 °C, en un intervalo de 12 a 48 horas, o hasta que se agoten los azúcares fermentables y el pH disminuya por debajo de 3.5, momento en el cual los microorganismos entran en fase de muerte (Wan-Mohtar et al., 2023).

Finalmente, en la cuarta etapa, el ácido láctico producido se separará del medio de fermentación. En esta etapa se emplean técnicas como la centrifugación, la filtración y la extracción con solventes para eliminar proteínas, azúcares residuales y otros compuestos no deseados. Posteriormente, el ácido láctico se purifica y recupera mediante técnicas como la precipitación, el intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, la electrodiálisis o la filtración por membrana, obteniéndose el producto final con el grado de pureza requerido según la aplicación industrial (Alves de Oliveira et al., 2019).

## **2.7 Microorganismos usados en la producción biotecnológica de ácido láctico**

La producción biotecnológica de ácido láctico se puede llevar a cabo mediante procesos fermentativos microbianos, empleando diversos grupos de microorganismos. Los microorganismos más utilizados en este proceso incluyen bacterias ácido-lácticas (BAL) homofermentativas y heterofermentativas, algunas cepas de *Bacillus*, cepas de *Escherichia coli*, y en menor medida ciertos hongos filamentosos y levaduras. Estos organismos pueden fermentar azúcares simples y complejos, convirtiéndolos en ácido

láctico con alta eficiencia (Abedi & Hashemi, 2020). La elección del microorganismo depende del tipo de sustrato, el isómero deseado y las condiciones del proceso. Las bacterias ácido-lácticas, especialmente las del género *Lactobacillus*, son las más utilizadas debido a su alto rendimiento y versatilidad en procesos industriales. Sin embargo, los avances en biotecnología están permitiendo el uso de cepas genéticamente modificadas y hongos filamentosos para aprovechar sustratos no convencionales (Sionek et al., 2023; Upadhyaya et al., 2014).

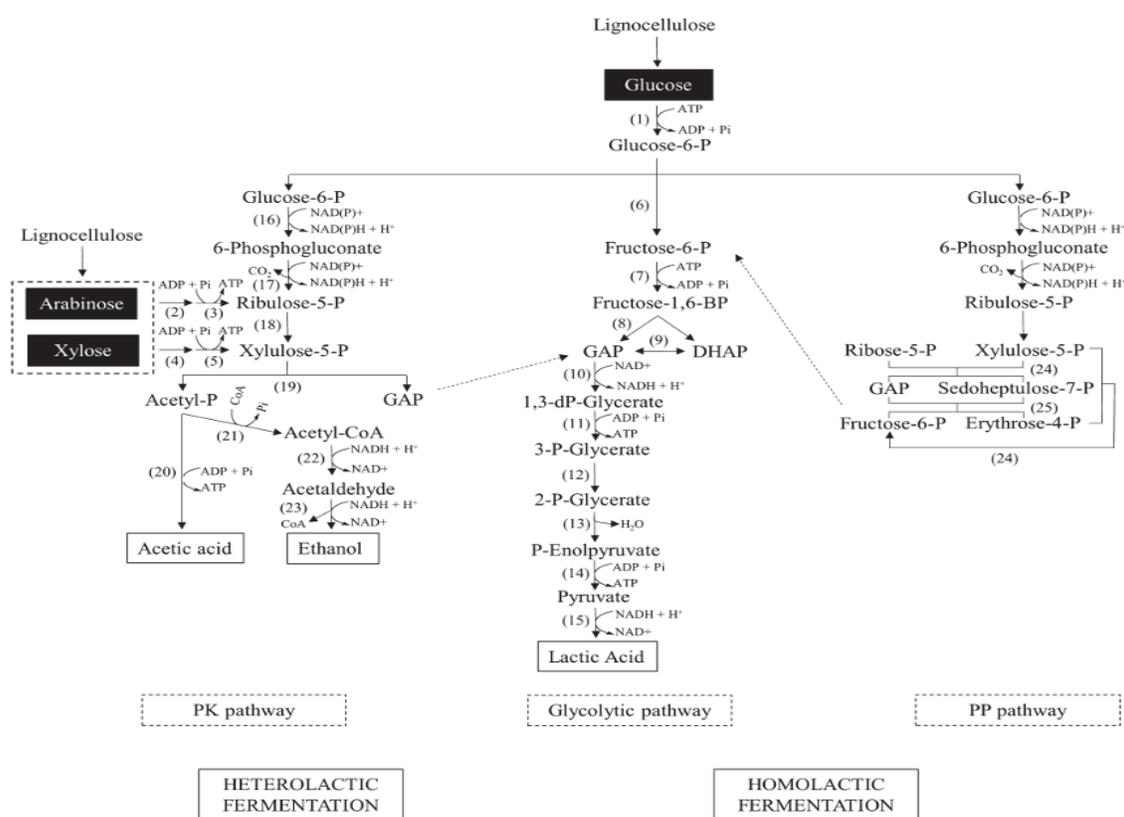
### **2.7.1 Bacterias ácido-lácticas**

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son microorganismos empleados en la producción de productos fermentados. Pueden actuar como cultivos iniciadores generando ácido láctico (principal producto de la fermentación de azúcares) o como cultivos no iniciadores (produciendo compuestos aromáticos). Las diversas cepas de bacterias ácido-lácticas se seleccionan según los fenotipos deseados para que puedan conferir características específicas a los productos deseados (Tirloni et al., 2023).

Autores como Abedi & Hashemi, (2020) indicaron que las bacterias ácido-lácticas son microorganismos que pueden producir grandes cantidades de ácido láctico a partir de azúcares fermentables como monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa) y disacáridos (sacarosa, maltosa y lactosa), requiriendo nutrientes como vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos y péptidos. Las bacterias ácido lácticas son microaerófilas o anaeróbicas que crecen a una temperatura entre 5 y 45 °C con un pH óptimo de 5.5 a 6.5, son Gram positivas, catalasas negativas y no forman esporas. Algunas cepas productoras de ácido láctico pertenecen a los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus* y *Weissella*.

Las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de ácido láctico incluyen la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la vía de las pentosas fosfato (PP) y la vía de la fosfoctolasa (PK). Diversas bacterias ácido-lácticas pueden presentar una o varias

de estas rutas metabólicas, y tanto el rendimiento en la conversión de sustrato como la cantidad de energía generada dependen de la cepa microbiana y de las condiciones específicas del cultivo. Por lo tanto, en función de las características metabólicas, las bacterias ácido-lácticas pueden clasificarse en bacterias homofermentativas productoras de ácido láctico, y en bacterias heterofermentativas productoras de ácido láctico junto con otros compuestos orgánicos y dióxido de carbono (Cubas-Cano et al., 2020) (Figura 7).



**Figura 7.** Rutas metabólicas involucradas en la producción de ácido láctico a partir de diferentes fuentes de biomasa lignocelulósica (Cubas-Cano et al., 2020)

Las bacterias homofermentativas cuentan con la enzima aldolasa, lo que les permite transformar la glucosa casi exclusivamente en ácido láctico. Este tipo de bacterias suelen metabolizar azúcares hexosas y pentosas a través de la vía del

glucólisis y la vía de las pentosas fosfato, alcanzando un rendimiento teórico de 1 gramo de ácido láctico por cada gramo de glucosa consumida, produciendo dos moléculas de ácido láctico como producto final por mol de glucosa consumida. Algunos ejemplos de bacterias ácido-lácticas homofermentativas incluyen los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y algunos *Lactobacillus*. En contraste, las bacterias heterofermentativas pueden metabolizar la glucosa en ácido láctico, ácido acético, formiato, etanol y dióxido de carbono entre otros. Estas bacterias utilizan tanto azúcares hexosas como pentosas mediante la vía del fosfogluconato y la vía fosfoacetolasa, con un rendimiento teórico de entre 0.5-0.6 gramo de producto por gramo de sustrato. Algunos ejemplos de bacterias ácido-lácticas heterofermentativas son los géneros *Oenococcus*, *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* (Parra-Huertas, 2010). En este sentido, se estima que alrededor del 90% del ácido láctico disponible en el mercado se produce mediante la fermentación de azúcares, siendo las bacterias ácido-lácticas las principales productoras debido a su capacidad para producir ácido láctico con un alto rendimiento y en un corto tiempo de fermentación, utilizando como fuente de carbono azúcares simples (Haokok et al., 2023).

### **2.7.1.1 Género *Lactobacillus***

*Lactobacillus* es el género más extenso dentro del grupo de las bacterias ácido-lácticas. Taxonómicamente, *Lactobacillus* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae*. Estas bacterias son grampositivas, catalasa negativa, no forman esporas y tienen forma de bastón alargado, siendo su principal producto de fermentación el ácido láctico. Las especies del género *Lactobacillus* se clasifican en tres grupos según su metabolismo fermentativo: el grupo I, formado por bacterias obligadamente homofermentativas, incluye especies como *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* y *L. salivarius*; el grupo II, compuesto por bacterias facultativamente heterofermentativas, abarca especies como *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. plantarum* y *L. sakei*; finalmente, el grupo III corresponde a

bacterias obligadamente heterofermentativas, entre las que se *encuentran* *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* y *L. reuteri* (Ibrahim, 2016).

Los *lactobacillus* heterofermentativos facultativos fermentan hexosas por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) casi por completo a una mezcla de L y D lactato. Bajo condiciones limitantes de glucosa, fermentan hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico, y también son capaces de degradar pentosas. Por otra parte, los *lactobacillus* heterofermentativos obligados fermentan hexosas a ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido acético y/o etanol a través de la vía del 6-fosfogluconato, que involucra la enzima clave pentosa fosfocetolasa, que está ausente en especies heterofermentativas obligadas pero presente en facultativas. Las cepas heterofermentativas obligadas carecen de la enzima clave de la vía homofermentativa, la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa. El metabolismo de los carbohidratos puede generar diversos productos finales que se ven influenciados por la presencia de oxidantes (Calasso & Gobbetti, 2011).

#### **2.7.1.2 Género *Bacillus***

El género *Bacillus* también ha sido reportado en la producción de ácido láctico. Taxonómicamente, *Bacillus* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales* y familia *Bacillaceae* (Pilo & Frey, 2011). Estas bacterias son grampositivas, aerobias o anaerobias facultativas, productoras de endosporas y resistentes al calor, y se caracterizan por tener una particular forma de bastón. Algunas de las especies reportadas son *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. spp* (Abdel-Rahman et al., 2013). En comparación otros géneros de bacterias ácido-lácticas, las especies del género *Bacillus* presentan varias mejoras potenciales en la producción de ácido láctico, como es la posibilidad de crecer y fermentar utilizando medios de fermentación más económicos, además de producir ácido láctico en condiciones de mayor temperatura (>50 °C).

En este contexto, el bagazo de agave representa un residuo agroindustrial con alto potencial de aprovechamiento, dadas sus características lignocelulósicas y su disponibilidad en regiones productoras de tequila y mezcal. La producción de ácido láctico mediante fermentación microbiana, empleando bacterias ácido-lácticas y utilizando residuos como fuente de carbono, ha demostrado ser una alternativa viable y más sostenible frente a procesos convencionales basados en materias primas refinadas. Sin embargo, para lograr una valorización efectiva del bagazo, es indispensable comprender las condiciones óptimas de fermentación, la selección adecuada de cepas microbianas y el comportamiento del sistema bajo diferentes parámetros de operación. Dada la complejidad del sustrato real, se hace necesario establecer primero un sistema modelo que permita evaluar los factores clave del proceso y sentar las bases para su posterior aplicación con hidrolizados de biomasa. Así, el desarrollo de procesos biotecnológicos eficientes para la transformación de residuos como el bagazo de agave no solo permitiría reducir su impacto ambiental, sino también generar productos de alto valor agregado, alineándose con los principios de la economía circular y contribuyendo al fortalecimiento de la bioeconomía. A partir de estas consideraciones, se plantea la necesidad de una investigación que sienta las bases técnicas para dicha valorización, lo cual se aborda en la siguiente sección.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

La industria agroalimentaria genera grandes cantidades de residuos que representan un problema ambiental y económico significativo. Un ejemplo destacado es el bagazo de agave, un subproducto de la industria tequilera y mezcalera. En este sentido, el bagazo de agave es un residuo lignocelulósico que contiene una alta concentración de celulosa, hemicelulosa y otros compuestos que lo hacen un recurso potencialmente útil como materia prima en procesos biotecnológicos. Al ser San Luis Potosí un estado con alta producción mezcla, se tiene a disposición la materia prima, lo que resulta en una ventaja para poder utilizarla en distintos procesos. En este contexto, la fermentación microbiana utilizando bacterias ácido-lácticas (BAL) se presenta como una alternativa prometedora para la valorización del bagazo de agave, al permitir la producción de ácido láctico, un compuesto de alto valor agregado con aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y de bioplásticos. Sin embargo, a pesar del potencial del bagazo de agave como sustrato para estos procesos, aún existen desafíos que limitan su aprovechamiento eficiente. Entre ellos, destacan la necesidad de desarrollar métodos efectivos de pretratamiento para liberar los azúcares fermentables, la selección de cepas adecuadas, y la optimización de las condiciones de fermentación para maximizar el rendimiento de ácido láctico.

### **4 HIPÓTESIS**

Es posible establecer condiciones de fermentación microbiana utilizando bacterias ácido-lácticas (BAL) en sistemas modelo ricos en azúcares, que permitan optimizar la producción de ácido láctico y sentar bases para la futura valorización del bagazo de *Agave Salmiana*.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Establecer un proceso biotecnológico de fermentación microbiana con bacterias ácido-lácticas en sistemas modelo ricos en azúcares, como base para la posterior valorización del bagazo de *Agave salmiana*.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Seleccionar cepas de bacterias ácido-lácticas y evaluar su capacidad de producir ácido láctico en sistemas modelo ricos en azúcares.
- Evaluar la influencia de los parámetros de operación (pH, temperatura, tiempo y concentración inicial de sustrato) sobre la fermentación de sistemas modelo ricos en azúcares.
- Demostrar la viabilidad de condiciones de fermentación en sistemas modelo ricos en azúcares como base para la futura aplicación con hidrolizados de bagazo de *Agave salmiana*.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

Los materiales utilizados fueron caldo de *Lactobacillus* MRS (de Man, Rogosa & Sharpe, BD DIFCO), caldo de soya tripticasa (BD Bacto), agar bacteriológico (BD Bioxon), agar soya tripticaseína (BD Bioxon), extracto de levadura (BD Bacto), peptona de caseína (BD Bioxon), glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) (reactivos LABESSA), hidróxido de sodio (NaOH) (Merck), carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>), glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) y agua destilada, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

Así mismo, durante los análisis en cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se utilizaron ácido láctico grado analítico (Jalmek), D(+)-glucosa grado analítico (SIGMA) y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck), proporcionados por el Laboratorio de Agroprocesos del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP.

### 6.2 Cepas

Las cepas microbianas utilizadas fueron: *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 8000 (CINVESTAV, CDBB-B-1083) en medio líquido (caldo) y medio sólido (agar inclinado), almacenada en refrigeración a -5 °C, adquirida del cepario en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional; *Bacillus coagulans* ATCC 7050 (Microbiologics, M-0596P) en forma de cultivo liofilizado con una presentación KWIK-STIK, almacenada en refrigeración a -5 °C y adquirida de la compañía Microbiologics; *Bacillus coagulans* en medio sólido (placa de agar Luria Bertani) y *Lactobacillus casei* ATCC 393 (placa de agar MRS) almacenadas en refrigeración a -5 °C y ambas cepas proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería de la UASLP; además, *Lactobacillus rhamnosus* (placa de agar MRS) proporcionada por el

Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

### **6.3 Equipos**

Se utilizó una incubadora orbital con agitación ES-20 (Biosan); un medidor de pH modelo HI98103 (Hanna); un refractómetro digital brix (Generic) y un microscopio compuesto binocular Bscope (Testmark). Así mismo, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) Agilent Technologies Serie 1000 con una columna Aminex HPX-87C Bio Rad.

### **6.4 Metodología**

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, la metodología se divide en las etapas que se describen a continuación.

#### **6.4.1 Activación de cepas**

Las cepas (*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 8000, *Bacillus coagulans* ATCC 7050, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus*) fueron activadas, es decir, se pusieron en crecimiento dado que fueron conservadas en estado latente, en almacenamiento por congelación o liofilización. Este proceso es esencial en la microbiología, dado que las bacterias deben estar activas y en crecimiento para ser usadas, en este caso en fermentaciones. En este sentido, el proceso de activación fue diferente para cada cepa, dependiendo del estado de conservación en el que se encontraba.

La cepa *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 8000 fue activada en medio líquido y sólido a partir de los medios originales obtenidos del cepario del CINVESTAV (líquido y sólido). La activación en medio líquido se llevó a cabo tomando una alícuota del medio líquido puro y colocándola en tubos de ensayo conteniendo 20 ml de caldo

MRS previamente esterilizado en autoclave (121°C durante 15 minutos). Por otra parte, la activación en medio sólido se llevó a cabo tomando una asada del cultivo puro y realizando una estría cruzada en placas Petri con agar MRS (agar esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos y placas esterilizadas en horno a 170 °C durante 60 minutos). Los tubos inoculados y placas sembradas se guardaron en un desecador y fueron incubados a una temperatura de 35 °C durante 48 h. El proceso de activación se realizó por duplicado para el microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, se debería observar turbidez, así como la formación de biomasa en el fondo del tubo, mientras que en la placa la formación de colonias.

La cepa *Bacillus coagulans* ATCC 7050 fue activada en medio líquido colocando varios cristales del cultivo liofilizado en tubos conteniendo 20 ml de caldo soya tripticasa previamente esterilizados en autoclave (121°C durante 15 minutos). Los tubos inoculados fueron incubados a una temperatura de 35 °C durante 48 h. El proceso de activación se realizó por duplicado para el microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, se debería observar turbidez, así como la formación de biomasa en el fondo del tubo. A partir de los tubos se hizo una reactivación en medio sólido, tomando una asada del cultivo y realizando una estría cruzada en placas Petri con agar MRS (agar esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos y placas esterilizadas en horno a 170 °C durante 60 minutos). Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 h, y transcurrido el tiempo se debería observar la formación de colonias.

La otra cepa de *Bacillus coagulans* fue activada en medio líquido y sólido a partir de la placa de agar original. La activación en medio líquido se llevó a cabo tomando una asada de una colonia y colocándola en tubos de ensayo conteniendo 20 ml de caldo soya tripticasa previamente esterilizado en autoclave (121°C durante 15 minutos). Por otra parte, la activación en medio sólido se llevó a cabo tomando una asada de una colonia de la placa de agar original y realizando una estría cruzada en placas Petri con agar soya tripticasa (agar esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos y placas esterilizadas en horno a 170 °C durante 60 minutos). Los tubos inoculados y placas sembradas fueron incubados a una temperatura de 35 °C durante

48 h. El proceso de activación se realizó por duplicado para el microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, se debería observar turbidez, así como la formación de biomasa en el fondo del tubo, mientras que en la placa la formación de colonias.

La cepa *Lactobacillus casei* ATCC 393 fue activada en medio líquido y sólido a partir de la placa de agar original. La activación en medio líquido se llevó a cabo tomando una asada de una colonia de la placa original y colocándola en tubos de ensayo conteniendo 20 ml de caldo MRS previamente esterilizado en autoclave (121°C durante 15 minutos). Por otra parte, la activación en medio sólido se llevó a cabo tomando una asada de una colonia de la placa de agar original y realizando una estría cruzada en placas Petri con agar MRS (agar esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos y placas esterilizadas en horno a 170 °C durante 60 minutos). Los tubos inoculados y placas sembradas se guardaron en un desecador y fueron incubados a una temperatura de 35 °C durante 24 h. El proceso de activación se realizó por duplicado para el microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, se debería observar turbidez, así como la formación de biomasa en el fondo del tubo, mientras que en la placa la formación de colonias.

La cepa *Lactobacillus rhamnosus* fue activada en medio líquido y sólido a partir de la placa de agar original. La activación en medio líquido se llevó a cabo tomando una asada de una colonia de la placa original y colocándola en tubos de ensayo conteniendo 20 ml de caldo MRS previamente esterilizado en autoclave (121°C durante 15 minutos). Por otra parte, la activación en medio sólido se llevó a cabo tomando una asada de una colonia de la placa de agar original y realizando una estría cruzada en placas Petri con agar MSR (agar esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos y placas esterilizadas en horno a 170 °C durante 60 minutos). Los tubos inoculados y placas sembradas se guardaron en un desecador y fueron incubados a una temperatura de 35 °C durante 24 h. El proceso de activación se realizó por duplicado para el microorganismo. Transcurrido el tiempo de incubación, se debería

observar turbidez, así como la formación de biomasa en el fondo del tubo, mientras que en la placa la formación de colonias.

#### **6.4.2 Análisis morfológico**

El análisis morfológico de cepas consiste en observar las características físicas y estructurales de las bacterias, principalmente mediante técnicas microscópicas y observación en medios de cultivo. Este análisis es fundamental en microbiología para la identificación preliminar de las bacterias y su clasificación. La morfología microscópica se realiza con un microscopio óptico, tras realizar la técnica de tinción Gram. Las características observables mediante el uso de microscopio son forma celular (cocos, bacilos y espirilos), agrupación (diplococos, estreptococos, estafilococos y bacilos en cadena), tinción de Gram (Gram positivas púrpuras o Gram negativas rosas) y presencia de estructuras (esporas o flagelos). Por otra parte, en la morfología macroscópica se puede observar el tamaño de la colonia (puntiforme, pequeña o grande), forma (circular, irregular o filamentosa), elevación (plana o convexa), color (blanco, crema o amarillo), brillo (opaco o brillante) y textura (seca, mucoide o cremosa).

En este sentido, para todas las cepas se realizó la tinción de Gram. El procedimiento comenzó con la preparación de un frotis bacteriano sobre un portaobjetos limpio. Para ello, se colocó una gota de agua destilada si la muestra era sólida, y con un asa estéril se transfirió una pequeña porción de la colonia bacteriana. En el caso de muestra líquida, con un asa estéril se transfirió una gota del medio. Luego se extendió formando una película delgada y se dejó secar al aire. Una vez seco, el frotis se fijó pasando el portaobjetos brevemente por la llama de un mechero, con el lado de la muestra hacia arriba, cuidando de no sobrecalentarlo. Posteriormente, se inició la tinción en sí. El frotis se cubrió por completo con cristal violeta y se dejó actuar durante un minuto. Luego se enjuagó con agua. A continuación, se añadió Lugol y se dejó actuar también por un minuto antes de enjuagar nuevamente con agua. Enseguida se aplicó un agente decolorante, que fue alcohol-acetona y se enjuagó

inmediatamente dos veces con agua destilada para detener la acción del alcohol. Finalmente, se aplicó safranina como colorante de contraste durante un minuto, tras lo cual se realiza un último enjuague con agua. Después del lavado, se dejó secar el portaobjetos al aire. La observación se realizó al microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100x), aplicando una gota de aceite de inmersión sobre el frotis. Las bacterias Gram positivas se observarán de color violeta o púrpura, debido a que retienen el cristal violeta gracias a su pared celular gruesa de peptidoglicano. En cambio, las bacterias Gram negativas aparecerán rosadas o rojizas, ya que pierden el colorante primario durante la decoloración y toman la safranina debido a su pared delgada y la presencia de una membrana externa.

#### **6.4.3 Conservación y almacenamiento en glicerol**

La congelación se utiliza comúnmente para preservar la viabilidad de las bacterias lácticas durante un largo periodo, manteniendo sus propiedades tecnológicas (actividad acidificante, propiedades organolépticas y conservantes). Generalmente se añaden diversos agentes al medio de acondicionamiento para proteger las células del daño por congelación. El efecto de los diferentes agentes protectores varía según el microorganismo congelado. La resistencia a la congelación generalmente se mejora añadiendo un agente crioprotector como el glicerol (Fonseca et al., 2006). En este sentido, la conservación en glicerol de bacterias lácticas es una técnica común y eficaz para preservar estas cepas a largo plazo. El glicerol actúa como crioprotector, evitando la formación de cristales de hielo que podrían dañar las células bacterianas.

Por lo tanto, la conservación de todas las cepas inició con el cultivo bacteriano líquido de la cada cepa en un medio adecuado, ya sea MRS o soya tripticasa (MRS para cepas del género *Lactobacillus* y soya tripticasa para cepas del género *Bacillus*), el cual se incubó a una temperatura de 35 °C durante 24 a 48 horas, hasta que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Esta fase es ideal, ya que las células presentan mayor resistencia al estrés por congelación. Paralelamente, se preparó una

solución estéril de glicerol al 40% v/v (esterilizada en autoclave a 121 °C durante 15 minutos). Una vez que el cultivo líquido estuvo listo este se mezcló con el glicerol. Para este caso, se mezclaron 1 mL del cultivo bacteriano con 0.5 mL de glicerol al 40%. Esta mezcla se realizó en tubos Eppendorf de 2.0 mL estériles, procurando homogeneizar suavemente para no dañar las células. Los tubos Eppendorf se etiquetaron adecuadamente con el nombre de la cepa, fecha de conservación y medio utilizado. Luego, se almacenaron en congelación a -15 °C.

Así mismo, es importante evitar la recongelación, por lo que se recomienda preparar alícuotas pequeñas que se puedan utilizar individualmente. Para la reactivación posterior de las cepas, se extrajo una alícuota de 1 mL y se inocularon tubos directamente en medio MRS o soya tripticasa fresco, incubando bajo las condiciones óptimas para el crecimiento de la cepa conservada.

#### **6.4.4 Preparación del inóculo**

La preparación de un inóculo de una cepa consistió en reactivar su crecimiento en condiciones óptimas para que alcance su estado fisiológico adecuado antes de ser usada en un proceso de fermentación. Se realizó el mismo procedimiento a continuación descrito para la preparación de los inóculos de todas las cepas utilizadas.

Para preparar el inóculo a partir de una cepa de bacteria ácido-láctica conservada en glicerol, se extrajo una pequeña cantidad del cultivo almacenado en el tubo Eppendorf. Con ayuda de una micropipeta, se transfirió 1 ml de muestra a un tubo de ensayo con 20 ml de caldo MRS o soya tripticasa previamente esterilizados en autoclave (121 °C durante 15 minutos). El cultivo bacteriano se incubó bajo condiciones apropiadas para cada cepa, generalmente a temperatura de 35 °C, durante un periodo de 24 a 48 horas, y específicamente en un ambiente microaerófilo, es decir, un entorno con una baja concentración de oxígeno de entre 2 y 10%, para el caso de las cepas del género *Lactobacillus*. Transcurrido el tiempo de incubación, en el inóculo obtenido se debería observar turbidez y formación de biomasa en el fondo

del tubo, lo que indicaría la posibilidad utilizarlo directamente en los medios de fermentación.

#### **6.4.5 Cuantificación de carga microbiana**

Por otra parte, se empleó la técnica de Miles & Misra (1938) para cuantificar la carga microbiana del inóculo de cada cepa y así estimar valores para realizar curvas de crecimiento. La técnica de Miles & Misra es un método microbiológico clásico utilizado para cuantificar bacterias viables en una muestra líquida mediante recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Es una alternativa práctica y económica a la técnica de extensión o vertido en placa. Para el procedimiento de la técnica se trabajó en campana de flujo laminar o con mecheros Bunsen para asegurar un ambiente estéril. Se partió de preparar tubos de dilución, con 9.0 mL de agua peptonada 0.1% previamente esterilizados en autoclave (121 °C durante 15 minutos). Primero se prepararon diluciones seriadas a partir del cultivo líquido (inóculo) en tubos de dilución (agua peptonada al 0.1%), generalmente en diluciones decimales (1:10, 1:100, 1:1000, etc.), utilizando micropipeta estéril en zona de esterilidad. Esto es, de cada tubo se transfería 1 mL de muestra al siguiente tubo, asegurando una mezcla adecuada de cada dilución antes de proceder a la siguiente. Por otra parte, se prepararon placas Petri con agar MRS o soya tripticasa (agar esterilizado en autoclave 121 °C durante 15 minutos y placas esterilizadas en horno a 170 °C durante 60 minutos), vertiendo aproximadamente 25 mL de agar en cada placa Petri, y posteriormente se llevaron a prueba de esterilidad en incubadora a 35 °C por 24 h. Una vez transcurrido el tiempo se sacaron de la incubadora y se dejaron a temperatura ambiente para garantizar que estuvieran secas para que las gotas aplicadas se absorbieran correctamente sin mezclarse. Así mismo, se marcaron tres divisiones en cada placa Petri, cada una correspondiente a una dilución. Enseguida, con una micropipeta estéril, se tomó un volumen pequeño de cada dilución (20 µL) y se depositó una gota sobre una parte de superficie del agar. En cada placa se aplicaron 3 gotas por dilución, asegurando que estén separadas entre sí. Es fundamental

etiquetar la posición de cada gota según su dilución para facilitar el análisis posterior. Las gotas aplicadas se dejaron absorber completamente en un ambiente estéril antes de incubar las placas. Las placas se colocaron en posición invertida y se incubaron a 35 °C durante 24 a 48 horas, dependiendo de la cepa, y específicamente para el caso de los *Lactobacillus*, las placas se guardaron en desecador al momento de incubarse, para proporcionar un ambiente microaerófilo. Tras la incubación, se deberían observar las colonias formadas en cada gota, pertenecientes a cada dilución. Posteriormente se seleccionaron aquellas diluciones donde el número de colonias sea adecuado para el conteo (generalmente entre 3 y 30 colonias por gota) y se procedió al conteo de colonias con ayuda de un cuentacolonia.

A partir de los datos obtenidos, se calculó el promedio del número de colonias por gota para cada dilución. Finalmente, el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/mL) en la muestra original se determina mediante la fórmula:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{(Promedio\ de\ colonias\ por\ gota) * (Factor\ de\ dilución)}{Volumen\ de\ la\ gota\ en\ mL}$$

Por lo tanto, este procedimiento aseguró que la cepa estuviera activa, en buenas condiciones fisiológicas y adecuadamente adaptada al medio, lo que favoreció su desempeño en el proceso de fermentación, además permitió determinar con precisión la cantidad de microorganismos viables en la muestra original. La cantidad de inóculo preparado de cada cepa varió dependiendo de la cantidad de medios de fermentación a utilizar para las pruebas. La metodología se sugirió igual para la preparación de todos los inóculos.

#### **6.4.6 Seguimiento preliminar de pH en medio de cultivo para la cepa *Bacillus* ATCC 7050**

Se realizó un seguimiento y ajuste de pH para la cepa *Bacillus* ATCC 7050 en un medio de cultivo, considerando que es relevante seguir la evolución en pH dado que este género de bacterias posee la capacidad de producir ácido láctico como

resultado de su metabolismo, lo que afecta el pH del medio. Algunas razones esenciales para realizar el seguimiento se relacionan con el crecimiento óptimo de las bacterias ácido-lácticas, las cuales tienen un intervalo óptimo de pH (generalmente entre 5.0 a 7.0) en el que crecen y producen ácido láctico de manera eficiente, por lo tanto, si el pH desciende demasiado rápido o fuera de este intervalo, puede inhibirse el crecimiento bacteriano, lo que afecta la productividad del metabolito de interés en el proceso. Por lo tanto, se llevó a cabo este seguimiento de pH con la finalidad de poder estandarizar la técnica de medición y ajuste de pH, así como para determinar un valor aproximado de la cantidad a usar de solución neutralizante.

Para el seguimiento y ajuste del pH es posible utilizar diferentes métodos de control como el monitoreo continuo donde medidores de pH automatizados permiten registrar cambios en tiempo real. Sin embargo, en este caso se utilizó el método de corrección manual, agregando agentes alcalinos como NaOH o CaCO<sub>3</sub> para neutralizar el exceso de ácido producido y mantener el pH dentro del intervalo deseado. El seguimiento preliminar de pH se realizó sólo para el *Bacillus coagulans* ATCC 7050, dado que solo se buscaba analizar el comportamiento del pH en condiciones naturales de la bacteria. El pH se mantuvo en un intervalo de  $6 \pm 0.5$  unidades, ajustándolo con una solución neutralizante de NaOH 2M, eligiendo ese agente alcalino con esa molaridad de acuerdo con estudios previamente reportados (Chen et al., 2020; Patel et al., 2005; Payot et al., 1998).

La metodología para el seguimiento y ajuste de pH se describe a continuación: se prepararon dos sistemas iguales, cada uno compuesto por medio líquido e inóculo, mezclados en un matraz de 250 mL, el cual se encontraba cerrado con un tapón plástico de rosca. Cada sistema debe tener un volumen final de 150 mL, con una proporción de inóculo del 10% (v/v), es decir, en cada sistema debe haber 135 mL de medio líquido MRS y 15 mL de inóculo. Por lo tanto, primero se preparó el medio líquido solo y se esterilizó en autoclave (121 °C durante 15 minutos). Un matraz funcionó como sistema de seguimiento de pH, en este solo se midió la evolución natural del pH en el medio, mientras que el otro matraz funcionó como sistema de control, donde el pH fue

ajustado periódicamente según se requería para mantener el valor constante e igual al inicial, en un intervalo deseado de  $\pm 0.5$  unidades. Para ambos sistemas se propuso un muestreo cada hora.

El proceso de muestreo para ambos sistemas inició midiendo el pH inicial en área de esterilidad, una vez preparados los medios líquidos MRS y habiendo agregado con una micropipeta el 10% (v/v) de inóculo. La técnica para la medición consistió abrir el matraz y tomar con una micropipeta estéril 4 mL del medio líquido del sistema y ponerla en un tubo de ensayo, donde con un potenciómetro manual se midió el pH, introduciéndolo en el tubo con la muestra. Una vez medido el pH del sistema, se cerraba con el tapón de rosca el matraz y se llevó a la incubadora con agitación a una temperatura de 37 °C y 200 rpm. Transcurrida 1 hora, se detuvo la incubadora, se sacó el matraz y se realizó el mismo proceso mencionado. En el caso del sistema de seguimiento de pH, únicamente se realizó el monitoreo durante todo el proceso.

Para el caso del matraz con ajuste, se abrió el matraz y se tomó con una micropipeta estéril 4 mL del medio líquido del sistema y ponerla en un tubo de ensayo, con un potenciómetro manual se midió el pH, introduciéndolo en el tubo con la muestra. Si la lectura del pH se mantenía en el intervalo de  $6 \pm 0.5$  unidades no se realizaba ningún ajuste, y se continuaba con proceso en la incubadora. Sin embargo, si el valor del pH salía del intervalo de  $\pm 0.5$  unidades, se realizaba un ajuste con la solución de NaOH 2M. La técnica empleada consistió en agregar 0.1 mL de NaOH 2M (esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos) con una pipeta estéril a los 4 mL de muestra recolectada en el tubo de ensayo, homogenizar y medir el pH con el potenciómetro. Si la adición inicial era suficiente para ajustar el pH al valor deseado, ahí terminaba el ajuste de la muestra tomada, no obstante, si el pH de la muestra aún se mantenía por debajo de lo esperado, el proceso de adición de NaOH y medición era repetido las veces necesarias hasta lograr el ajuste, siempre agregando de 0.1 mL en cada vez. Una vez ajustado el pH en la muestra de 4 mL, se realizó una relación lineal con los mililitros de NaOH adicionados al tubo con la muestra respecto a los mililitros necesarios para ajustar el volumen del sistema completo. Es importante mencionar

que el volumen del sistema iba disminuyendo con respecto al tiempo, esto por las muestras tomadas cada hora, por lo tanto, la relación planteada tuvo que considerar que para cada muestreo el volumen del sistema completo disminuía 4 mL respecto a los 150 mL iniciales, considerando los 4 mL tomados para el ajuste en curso. Por ejemplo, la relación para el ajuste en el tiempo 1, es decir, con un volumen al momento en el sistema total de 142 mL (considerando que ya se muestreo 2 veces, inicio y tiempo 1), se realizó, considerando que si en la muestra de 4 mL se agregó 0.1 mL de NaOH, al volumen de 142 mL sería necesario agregar 3.55 mL de NaOH 2M, empleando una regla de 3 para el cálculo. Una vez obtenido del valor calculado, con una pipeta estéril se tomaban los mililitros necesarios de NaOH y se agregaban al sistema y este se agitaba manualmente por unos segundos. El matraz se cerraba con el tapón de rosca. Se repitió el proceso de seguimiento y ajuste de pH durante 16 horas seguidas. Transcurridas las 16 horas y tras el último ajuste de pH en el sistema correspondiente, el sistema se dejó en incubación y agitación durante 8 horas, para completarse 24 horas desde el inicio del experimento, y así realizar una última medición de pH en ambos sistemas. Los valores se anotaron en bitácora para posteriormente graficarlos y observar el comportamiento de ambos sistemas.

Por otra parte, a la par del seguimiento y ajuste de pH, se realizó un seguimiento de la carga microbiana del sistema con ajuste de pH, la cual se realizaba cada 2 horas, en el mismo momento del muestreo para pH. La metodología para la carga microbiana consistió en tomar con una micropipeta estéril 1 mL del medio líquido del sistema y colocarla en un tubo de dilución con 9.0 mL de agua peptonada, realizando diluciones para posteriormente utilizar la técnica de Miles & Misra, la cual se describió anteriormente. Este seguimiento se realizó con el objetivo de observar la evolución de la carga microbiana respecto al tiempo y al ajuste de pH. Durante el seguimiento, se ajustó la metodología buscando mejorar la práctica en el laboratorio, para asegurar que no existiera contaminación en los sistemas.

#### **6.4.7 Pruebas preliminares de fermentación en sistemas modelo ricos en azúcares con 4 cepas de BAL**

Las pruebas preliminares de fermentación en sistemas modelo tienen como objetivo evaluar, optimizar y entender las condiciones necesarias para un proceso de fermentación eficiente. Por lo tanto, se planteó realizar pruebas preliminares que ayudaran a identificar las condiciones óptimas para el proceso, como la concentración de azúcares (glucosa), concentración de nutrientes (extracto de levadura), evolución de pH, temperatura de incubación, agitación, °Brix, tiempo de fermentación, así como la evolución en crecimiento microbiano, además de evaluar el rendimiento de cada cepa para la producción de ácido láctico y validar si el medio modelo contiene el sustrato necesario para sostener su actividad metabólica.

La metodología de fermentación y cantidades del medio para los sistemas modelo se realizaron con base en los estudios de P. Xu et al., (2013) y Nalawade et al., (2020). Por lo tanto, se planteó la preparación de 4 sistemas modelo para la fermentación microbiana con iguales composiciones, solo variando el microorganismo a inocular, como se muestra en la Tabla 3. Los sistemas se prepararon en medio líquido cada uno compuesto por medio de fermentación e inóculo, mezclados en un matraz de 250 mL, el cual se encontraba cerrado con un tapón plástico de rosca. Cada sistema debe tener un volumen final de 150 mL, con una proporción de inóculo del 10% (v/v), es decir, en cada sistema debería haber 135 mL de medio de fermentación y 15 mL de inóculo. Los medios líquidos solo con los nutrientes se esterilizaron en autoclave (121 °C durante 15 minutos) y posteriormente en área de esterilidad se agregó el inóculo con una micropipeta estéril, con la relación antes mencionada. Los sistemas ya listos se colocaron en una incubadora con agitación, a una temperatura de 37 °C y 200 rpm. Se realizó un seguimiento de la fermentación durante 96 horas. A continuación, se describe la metodología empleada en el seguimiento de los distintos parámetros en la fermentación en sistemas modelo.

**Tabla 3. Composición de sistemas modelo**

<b>Composición</b>	<b>Sistema BC- 7050/100/SIN- PH</b>	<b>Sistema BC/100/SIN- PH</b>	<b>Sistema L.C- 393/100/SIN- PH</b>	<b>Sistema L.R/100/SIN- PH</b>
<b>Glucosa</b>	100 g/L	100 g/L	100 g/L	100 g/L
<b>Carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>)</b>	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
<b>Extracto de levadura</b>	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L
<b>Microorganismo</b>	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

Fuente: Elaboración propia

#### **6.4.7.1 Seguimiento de la fermentación en sistemas modelo**

A lo largo de la fermentación se midieron las siguientes variables:

- pH
- Porcentaje de sólidos solubles (°Brix)
- Crecimiento bacteriano (conteo en placa)
- Biomasa seca
- Producción final de ácido láctico

El seguimiento de pH en un sistema modelo rico en azúcares para la producción de ácido láctico en fermentación utilizando bacterias lácticas es fundamental, ya que es un indicador clave del avance de la fermentación y tiene un impacto directo sobre el crecimiento bacteriano, la actividad enzimática, la estabilidad del producto y la calidad final.

El proceso de seguimiento de pH inició una vez preparados los medios líquidos y agregado el 10% (v/v) de inóculo, todo trabajado en área de esterilidad. La técnica para la medición de pH consistió en abrir el matraz y tomar con una micropipeta estéril 3 mL del medio líquido del sistema y ponerla en un tubo de ensayo, donde con un potenciómetro manual se midió el pH, introduciéndolo en el tubo con la muestra. Los datos obtenidos se registraron en una bitácora. Una vez medido el pH los sistemas se cerraron con el tapón de rosca y se colocaron en una incubadora con agitación, a una temperatura de 37 °C, 200 rpm durante 96 horas. En este caso, el muestreo se realizó cada 2 horas, por lo tanto, transcurrido el tiempo se detenía la incubadora, se sacaban los matraces y se realizaba el mismo proceso mencionado. En estas pruebas preliminares, no se realizó ajuste de pH, solo se monitoreó su evolución natural en el medio adicionado con CaCO<sub>3</sub>.

El seguimiento de los grados Brix en un medio de fermentación de ácido láctico es esencial porque permite evaluar el consumo de azúcares presentes en el medio, lo cual está directamente relacionado con la producción de ácido láctico y con la eficiencia del proceso fermentativo. La medición indirecta de la densidad de un líquido mediante un refractómetro se refiere principalmente al azúcar presente. Según la escala de estos equipos 1 °Brix puede corresponder a un índice de refracción de una solución de glucosa en agua al 1%. Por tal motivo, se realizó una medición de grados Brix cada 2 horas. La técnica para la medición de °Brix consistió en tomar con una micropipeta estéril 0.5 mL del medio líquido de cada sistema y colocarla en el refractómetro para su medición. Los datos obtenidos se registraron en una bitácora.

El seguimiento del crecimiento bacteriano mediante curvas de crecimiento en un sistema modelo rico en azúcares para la producción de ácido láctico a través de fermentación microbiana es fundamental para comprender, optimizar y controlar el proceso. Estas curvas permiten visualizar el comportamiento celular a lo largo del tiempo y relacionarlo con parámetros clave

como la producción de ácido láctico, el consumo de sustratos y las condiciones del sistema. En este sentido, se realizaron siembras en placas Petri con agar MRS para *Lactobacillus* y agar soya tripticasa para *Bacillus*, por la técnica de Miles & Misra (descrita anteriormente en la sección de cuantificación de carga microbiana) cada 4 horas, variando las diluciones empleadas dependiendo de la evolución del sistema, para posteriormente realizar el conteo en placa.

La determinación de la biomasa seca final en un proceso de fermentación es una medida clave para evaluar el rendimiento y la eficiencia, puesto que permite cuantificar la cantidad de células producidas durante el cultivo. Para determinar la biomasa seca final en los sistemas modelo ricos en azúcares utilizados en la producción de ácido láctico por fermentación microbiana, se tomó un volumen representativo del sistema final (aproximadamente 60 ml) con ayuda de una micropipeta y se transfirió a tubos de centrifuga estériles (previamente lavados, secados y pesados). Los tubos fueron centrifugados a 3,500 revoluciones por minuto durante aproximadamente 30 minutos, con el fin de separar las células bacterianas del sobrenadante. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y una vez obtenida la biomasa y algún otro compuesto insoluble ( $\text{CaCO}_3$ ) en el tubo, estos se colocaron en una incubadora a una temperatura de 60 °C durante 24 horas. Luego los tubos fueron pesados utilizando una balanza analítica de alta precisión. La diferencia entre el peso final y el peso inicial del recipiente correspondió al peso seco de la biomasa. Finalmente, este valor se expresó en gramos por litro (g/L), dividiendo el peso seco obtenido entre el volumen de cultivo inicialmente procesado. Este método proporciona una medida confiable y reproducible del crecimiento celular y es ampliamente utilizado para evaluar la eficiencia y rendimiento de procesos fermentativos. Así mismo se consideró que el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) es poco soluble en agua con una densidad de 2.71 g/cm<sup>3</sup> a 25 °C y puede empezar a descomponerse a temperaturas superiores a 840°C, por lo tanto, no fue posible retirarlo del medio de fermentación una vez finalizado el proceso para cuantificar la biomasa seca (P. Xu et al., 2013).

La determinación del ácido láctico final producido en un medio de fermentación es fundamental para evaluar la eficiencia del proceso fermentativo, la calidad del producto y para optimizar las condiciones de cultivo. Este parámetro refleja directamente el grado de conversión del sustrato en producto deseado y es clave para procesos industriales, alimentarios y biotecnológicos. En este caso, se realizó la cuantificación de ácido láctico mediante HPLC el cual es un método preciso y específico ampliamente usado. El proceso de cuantificación se detalla más adelante.

#### **6.4.8 *Diseño de experimentos***

Los diseños de experimentos son metodologías estadísticas que permiten planificar, realizar, analizar e interpretar experimentos de manera eficiente, con el objetivo de obtener conclusiones válidas y reproducibles. Son técnicas que estructuran cómo se deben variar las variables independientes (factores) para estudiar su efecto sobre una o más variables de respuesta, minimizando el número de ensayos necesarios y maximizando la información obtenida. Un diseño de experimentos debe definir las variables a controlar (factores que se mantienen constantes); la o las variables que se van a probar (factores del diseño y sus niveles); los objetos a los cuales se les medirá el efecto de los factores; y las variables que se van a medir como respuesta al efecto de los tratamientos sobre los objetos de estudio. Estos diseños sirven para identificar relaciones causa-efecto, es decir, determinar qué factores influyen significativamente en un proceso; también ayudan a optimizar procesos, reducir costos y tiempo minimizando el número de experimentos, así como también ayudan a modelar sistemas complejos generando ecuaciones matemáticas que describan el comportamiento de un proceso.

En este sentido, entre los tipos más comunes de diseños experimentales se encuentran los diseños factoriales, en los que se estudian dos o más factores (variables independientes) y se prueban todas las combinaciones posibles de niveles de factores. Los experimentos factoriales proporcionan una metodología para estudiar

las interrelaciones entre los factores múltiples, y están bien ajustados para determinar que un factor procede en forma diferente a niveles diferentes de los otros factores, además de que proporcionan buena información con relativamente pocas corridas experimentales. Dentro de los diseños factoriales se encuentran varios tipos, como el diseño factorial completo donde se prueban todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores; otro tipo es el diseño factorial fraccionado donde se usa solo una fracción de las combinaciones del diseño factorial completo, sin embargo, en este tipo de diseño se presenta la limitante de perder información sobre algunas interacciones.

Considerando lo anterior y con base en los datos de las pruebas preliminares, se propuso un diseño de experimentos factorial  $2^n$ , para evaluar 3 variables de interés en los sistemas modelo, como es el tipo de microorganismo, variación de pH (con control y sin control) y la concentración de sustrato (glucosa). De esta manera, el diseño de experimentos factorial constaría con un total de 8 experimentos, de acuerdo con la ecuación:

$$N_e = 2^n = 2^3 = 8$$

Donde  $N_e$  es el número total de experimentos y  $n$  es el número de factores.

Como parámetros fijos se consideraron la temperatura de incubación (37 °C), agitación constante (200 rpm), volumen del matraz (150 ml), concentración del resto de componentes del medio de fermentación y tiempo de fermentación (96 horas).

Para fijar los intervalos de las variables a evaluar, se partió de resultados encontrados en bibliografía, así como de los datos de las pruebas preliminares realizadas (Gonzalez-Vara et al., 1996; P. Xu et al., 2013). En cuanto al tipo de microorganismo, se eligieron dos cepas (la mejor de cada género *Lactobacillus* y *Bacillus*), para la variación de pH se eligió un parámetro de control y otro sin control, mientras que para la concentración de azúcares se estimó un parámetro inferior y otro superior (60 g/L y 120 g/L de glucosa). En la Tabla 4 se presenta la nomenclatura y

parámetros para las variables a evaluar en el diseño de experimentos. Así mismo, en la Tabla 5 se muestra el diseño experimental propuesto codificado.

**Tabla 4.** Nomenclatura y parámetros para las variables a evaluar en el diseño de experimentos

<b>Variables</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Parámetro 1</b>	<b>Parámetro 2</b>
<b>Concentración de glucosa</b>	X <sub>1</sub>	60 g/L	120 g/L
<b>Microorganismo</b>	X <sub>2</sub>	Bacillus coagulans ATCC 7050	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393
<b>Variación pH</b>	X <sub>3</sub>	Con control	Sin control

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 5.** Diseño experimental codificado propuesto

<b>Número de experimento</b>	<b>Variables</b>		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
<b>1</b>	+1	-1	+1
<b>2</b>	-1	-1	+1
<b>3</b>	+1	-1	-1
<b>4</b>	-1	-1	-1
<b>5</b>	+1	+1	+1
<b>6</b>	-1	+1	+1
<b>7</b>	+1	+1	-1
<b>8</b>	-1	+1	-1

Fuente: Elaboración propia

#### **6.4.9 Pruebas finales de fermentación en sistemas modelo ricos en azúcares (diseño de experimentos)**

Las pruebas finales de fermentación en sistemas modelo de acuerdo con el diseño de experimentos planteado, pretenden encontrar las condiciones óptimas para el proceso, como la concentración de glucosa, evolución de pH en sistemas con y sin ajuste, además de evaluar el rendimiento de cada cepa para la producción de ácido láctico y validar si el medio modelo bajo condiciones específicas es ideal para la producción de ácido láctico con buenos rendimientos.

La metodología de fermentación se realizó con base en los estudios de P. Xu et al., (2013) y Nalawade et al., (2020), y se planteó la siguiente metodología. Se inició con la preparación de 9 sistemas modelo ricos en azúcares para la fermentación microbiana con diferentes composiciones: 4 medios con 60 g/L de glucosa, 20 g/L de  $\text{CaCO}_3$  y 10 g/L de extracto de levadura; 5 medios con 120 g/L de glucosa, 20 g/L de  $\text{CaCO}_3$  y 10 g/L de extracto de levadura. Para estos sistemas se optó por agregar  $\text{CaCO}_3$  dado que está reportado como agente neutralizante lo que ayuda a regular el pH en los medios de fermentación, de acuerdo con los autores mencionados anteriormente. Los sistemas se prepararon para un volumen inicial de 150 ml, en matraces de 250 ml, los cuales se encontraban cerrados con un tapón plástico de rosca, con su composición correspondiente de glucosa,  $\text{CaCO}_3$  y extracto de levadura, y tomando en cuenta una proporción del 10% (v/v) de inóculo. Los medios solo con los nutrientes se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos y posteriormente en área de esterilidad se agregó el inóculo con una micropipeta estéril, con la relación antes mencionada.

El proceso de muestreo para sistemas con y sin ajuste de pH inició midiendo el pH inicial en área de esterilidad, una vez preparados los medios modelo líquidos y habiendo agregado con una micropipeta el 10% (v/v) de inóculo. La técnica para la medición consistió en abrir el matraz y tomar con una micropipeta estéril 3 mL del medio líquido del sistema y ponerla en un tubo de ensayo, donde con un potenciómetro manual se midió el pH, introduciéndolo en el tubo con la muestra. Una vez medido el

pH del sistema, se cerró con el tapón de rosca el matraz y se llevó a la incubadora con agitación a una temperatura de 37 °C y 200 rpm. Transcurridas 4 horas, se detenía la incubadora, se sacaba el matraz y se realizaba el mismo proceso mencionado. En el caso de los sistemas sin ajuste de pH, únicamente se empleó este proceso durante todo el monitoreo.

Para el caso de los sistemas con ajuste, donde el pH fue ajustado periódicamente según se requería para mantener el valor constante e igual al inicial, en un intervalo deseado de  $\pm 0.5$  unidades, se partió de abrir el matraz y tomar con una micropipeta estéril 3 mL del medio líquido del sistema y ponerla en un tubo de ensayo, donde con un potenciómetro manual se midió el pH, introduciéndolo en el tubo con la muestra. Mientras el pH se mantuviera en el intervalo de  $6 \pm 0.5$  unidades no fue necesario realizar ningún ajuste, y se seguía solo este proceso. Sin embargo, una vez que el valor medido de pH rebasaba el intervalo de  $\pm 0.5$  unidades, fue necesario realizar un ajuste con la solución de NaOH 2M. La técnica empleada consistió en agregar 0.07 mL de NaOH 2M (esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos) con una pipeta estéril a los 3 mL de muestra recolectada en el tubo de ensayo, homogenizar y medir el pH con el potenciómetro. Si la adición inicial era suficiente para ajustar el pH de la muestra al valor deseado, ahí terminaba el ajuste de la muestra tomada, no obstante, si el pH de la muestra aún se mantenía por debajo de lo esperado, el proceso de adición de NaOH y medición era repetido las veces necesarias hasta lograr el ajuste, siempre agregando de 0.07 mL en cada vez. Una vez ajustado el pH en la muestra de 3 mL, se realizó una relación lineal con los mililitros de NaOH adicionados al tubo con la muestra respecto a los mililitros necesarios para ajustar el volumen del sistema completo. Es importante mencionar que el volumen del sistema iba disminuyendo con respecto al tiempo, esto por las muestras tomadas cada hora, por lo tanto, la relación planteada tuvo que considerar que para cada muestreo el volumen del sistema completo disminuía 3 mL respecto a los 150 mL iniciales, considerando los 3 mL tomados para el ajuste en curso. Por ejemplo, la relación para el ajuste en el tiempo 1, es decir, con un volumen al momento en el sistema total de 144 mL (considerando que ya se muestreo 2 veces, inicio y tiempo 1), se realizó,

considerando que si en la muestra de 4 mL se agregó 0.1 mL de NaOH, al volumen de 144 mL sería necesario agregar 3.3 mL de NaOH 2M, empleando una regla de 3 para el cálculo. Una vez obtenido del valor calculado, con una pipeta estéril se tomaban los mililitros necesarios de NaOH y se comenzaba a adicionar la mitad del total de la solución al sistema, esto para evitar cambios bruscos, enseguida el medio se agitaba manualmente por unos segundos, y se volvía a tomar con una micropipeta estéril una muestra de 3 mL, se medía el pH, y en caso de ser necesario se agregaba los mililitros restantes del total calculado, por el contrario, si el pH ya se encontraba en el intervalo deseado, ahí concluía el ajuste. Una vez ajustado el pH del sistema, se cerró el matraz con el tapón de rosca y se llevó a la incubadora con agitación a una temperatura de 37 °C y 200 rpm. Se repitió el proceso de seguimiento y ajuste de pH cada 4 horas durante 96 horas. Transcurridas las 4 horas se saca el sistema y se repite el proceso. Los valores se anotaron en bitácora para posteriormente graficarlos y observar el comportamiento de ambos sistemas.

Por otra parte, a la par del seguimiento y ajuste de pH, se realizó un seguimiento de la carga microbiana del sistema con ajuste de pH, la cual se realizaba en el mismo momento del muestreo para pH. La metodología para la carga microbiana consistió en tomar con una micropipeta estéril 1 mL del medio líquido del sistema y colocarla en un tubo de dilución con 9.0 mL de agua peptonada al 0.1%, realizando diluciones seriada (aproximadamente 6 diluciones) para posteriormente utilizar la técnica de Miles & Misra, la cual se describió anteriormente, para la siembra en placas Petri con agar. Este seguimiento se realizó con el objetivo de observar la evolución de la carga microbiana respecto al tiempo y al ajuste de pH.

#### **6.4.10 Cuantificación de ácido láctico producido mediante HPLC**

La cuantificación de ácido láctico es el proceso mediante el cual se determina la cantidad exacta de ácido láctico presente en una muestra, generalmente expresada en gramos por litro (g/L). La cuantificación se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas analíticas, entre las que destaca la cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC). Es una técnica analítica que permite separar, identificar y cuantificar los componentes individuales de una mezcla líquida, basándose en sus diferentes interacciones con una fase estacionaria y una fase móvil. Es una forma avanzada de cromatografía líquida en la que se usa alta presión para forzar la fase móvil (un líquido) a través de una columna empacada con un sólido poroso (fase estacionaria), lo cual permite analizar compuestos con gran precisión y rapidez.

El principio general de la cromatografía de alta resolución es la separación la cual se basa en la afinidad diferencial de los analitos (componentes de la muestra) por la fase móvil y la fase estacionaria, donde los compuestos que interactúan más fuertemente con la fase estacionaria se retrasan mientras que los que interactúan más con la fase móvil pasan más rápido por la columna. Esto permite separar los componentes de una mezcla en función de sus propiedades fisicoquímicas (polaridad, tamaño, carga, etc.).

Los componentes principales de un equipo HPLC incluyen una bomba que impulsa la fase móvil a alta presión a través de la columna cromatográfica; un inyector que permite introducir un volumen preciso de muestra al sistema; la columna cromatográfica, la cual contiene la fase estacionaria, sitio donde ocurre la separación de los analitos; y finalmente, un detector como el UV o el RID donde se identifican y miden los compuestos eluidos. Así mismo, el sistema de adquisición registra las señales y genera los cromatogramas de cada muestra.

Entre los diferentes modos de operación de un HPLC, se encuentra el de fase reversa (RP-HPLC), en el cual existe una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Otro modo de operación es el de fase normal, donde existe una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar. Otro caso es el modo de operación por exclusión de tamaño utilizado en la separación por tamaño molecular de proteínas y polímeros, mientras que el modo de operación por intercambio iónico permite separar los compuestos según su carga, por ejemplo, ácidos orgánicos, aminoácidos o iones. Para este caso, el modo de operación fue cromatografía líquida de alta resolución por el método de intercambio iónico.

#### **6.4.10.1 Preparación de muestras de fermentación**

Las muestras fueron recolectadas de los sistemas cada 24 horas y al finalizar la fermentación láctica. Se tomaron alícuotas de 2 mL del cultivo utilizando micropipeta estéril y se colocaron tubos Eppendorf de 2 mL estériles. Los tubos se centrifugaron a 8,000 rpm durante 10 minutos para eliminar biomasa celular y residuos sólidos. El sobrenadante fue cuidadosamente recuperado con la ayuda de una micropipeta y colocado en un nuevo tubo Eppendorf. Posteriormente la muestra fue filtrada utilizando filtros de jeringa con poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) para su análisis por HPLC.

#### **6.4.10.2 Preparación de soluciones estándar de ácido láctico y glucosa**

Se preparó una solución madre de ácido láctico (Jalmek, pureza  $\geq 85\%$ ) a una concentración de 5 mg/mL utilizando fase móvil. A partir de esta, se realizaron diluciones seriadas para obtener soluciones estándar con concentraciones menores a 5 mg/mL, dependiendo de las concentraciones esperadas en las muestras. Todas las soluciones fueron filtradas previamente a través de filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Para el caso de la glucosa, también se preparó una solución madre de glucosa (Sigma, pureza 99.5%) a una concentración de 5 mg/mL utilizando fase móvil. A partir de esta, se realizaron diluciones seriadas para obtener soluciones estándar con concentraciones menores a 5 mg/mL, dependiendo de las concentraciones esperadas en las muestras. Todas las soluciones fueron filtradas previamente a través de filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### **6.4.10.3 Condiciones de operación de HPLC**

El análisis se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) marca Agilent Serie 1100, equipado con una bomba isocrática, un inyector manual y un detector de índice de refracción (RID). Se utilizó una columna Aminex HPX-87C (300 mm  $\times$  7.8 mm, Bio-Rad) mantenida a 30 °C. La fase móvil consistió en ácido sulfúrico 0.005 M filtrado antes de su uso. El flujo se estableció en

0.5 mL/min, con una presión de 25-26 bar y el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ L por muestra.

#### **6.4.10.4 Cuantificación de ácido láctico y glucosa**

Una vez preparadas las muestras a analizar y con el equipo programado en las condiciones específicas, se procede a lavar dos veces con fase móvil la jeringa y el puerto de inyección del cromatógrafo, para posteriormente realizar un lavado de la jeringa con la muestra y proceder a inyectar la muestra y comenzar el análisis. Se inyectan 20  $\mu$ L, y el tiempo de análisis por muestra se estableció en 20 minutos.

Transcurrido el tiempo de análisis, a través del software ChemStation (Agilent Technologies), el equipo arroja una tabla de resultados con los datos propios correspondientes, así como un cromatograma donde se pueden observar picos correspondientes a los compuestos encontrados en la muestra. Los tiempos de retención y las áreas de los picos fueron registrados y analizados. La identificación del ácido láctico y glucosa se realizó comparando el tiempo de retención con el de los estándares, y comprobando los resultados con el manual Analysis of carbohydrates, alcohols and organics acids by ion-exchange chromatography (Agilent Technologies). La concentración en las muestras se determinó mediante interpolación de las áreas bajo los picos en la curva de calibración, con un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ )  $\geq$  0.98.

#### **6.4.11 Tasa de transformación de glucosa ( $x_G$ ) y rendimiento de ácido láctico ( $Y_{AL/G}$ )**

La tasa de transformación de glucosa y el rendimiento de ácido láctico son herramientas indispensables para el control y optimización de procesos fermentativos, y así evaluar la eficiencia del proceso biotecnológico. La tasa de transformación de glucosa es la fracción o porcentaje de glucosa que ha sido consumida respecto a la

cantidad inicial durante la fermentación, y se expresa de la siguiente manera de acuerdo con la ecuación:

$$x_G = \frac{C_G^0 - C_G^f}{C_G^0} * 100$$

Donde  $C_G^0$  es la concentración inicial de glucosa y  $C_G^f$  la concentración final de glucosa.

Por otra parte, el rendimiento de ácido láctico se expresa en función del número de moles de ácido láctico obtenidos respecto a los moles teóricos a partir del consumo de glucosa, considerando la relación metabólica  $1G = 2AL$ , y se representa de la siguiente manera de acuerdo con la ecuación:

$$Y_{AL/G} = \frac{n_{AL-obtenidos}}{n_{AL-teóricos}}$$

Donde  $n_{AL-obtenidos}$  es el número de moles de ácido láctico obtenidos y  $n_{AL-teóricos}$  es el número de moles de ácido láctico teóricos. El número de moles de ácido láctico obtenidos se calcula de acuerdo con la ecuación:

$$n_{AL-obtenidos} = \frac{m_{AL-obtenido}}{PM_{AL}}$$

Donde  $m_{AL}$  es la masa de ácido láctico obtenido y  $PM_{AL}$  es el peso molecular de ácido láctico. El peso molecular usado para ácido láctico fue 90.078 g/mol.

El número de moles de ácido láctico teóricos se calcula con base en la relación  $1G = 2AL$  de acuerdo con la ecuación:

$$n_{AL-teóricos} = 2n_{Glucosa-consumida}$$

Donde  $n$  se refiere al número de moles de glucosa consumida, y  $n_{Glucosa-consumida}$  se calcula de acuerdo con la ecuación:

$$n_{Glucosa-consumida} = \frac{m_{Glucosa-consumida}}{PM_G}$$

Donde  $m_{\text{Glucosa-consumida}}$  es la masa de glucosa consumida y  $PM_G$  es el peso molecular de la glucosa. El peso molecular usado para glucosa fue 180.156 g/mol.

Por lo tanto, una vez obtenidos los datos por HPLC se procedió a realizar los cálculos correspondientes al rendimiento de ácido láctico y tasa de transformación de glucosa con base en las fórmulas mencionadas.

#### **6.4.12 Análisis estadístico (ANOVA)**

El análisis de varianza ANOVA es una técnica estadística que se utiliza para comparar las medias de tres o más grupos independientes y determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Se basa en el principio de que la variabilidad total observada en los datos puede descomponerse en distintas fuentes de variación, lo cual permite identificar si las diferencias entre los grupos se deben al azar o a un efecto real del factor estudiado.

El ANOVA funciona comparando dos tipos principales de variación: la variación entre grupos y la variación dentro de los grupos. La variación entre grupos, también llamada suma de cuadrados entre grupos mide cuánto difieren las medias de los distintos grupos entre sí. En contraste, la variación dentro de los grupos, o suma de cuadrados dentro de los grupos, mide qué tanto se dispersan los datos individuales respecto a la media de su propio grupo. A partir de estos valores, se calcula un estadístico denominado F, que es el cociente entre la varianza media entre los grupos y la varianza media dentro de los grupos. Si este valor F resulta ser suficientemente alto, se considera que hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, que establece que todas las medias de los grupos son iguales, y se acepta la hipótesis alternativa, que indica que al menos una de las medias es diferente.

Existen diferentes tipos de ANOVA, dependiendo del número de factores involucrados en el análisis. El ANOVA de un factor o de una vía se emplea cuando se estudia el efecto de un solo factor sobre una variable cuantitativa dependiente. El ANOVA de dos factores permite estudiar simultáneamente el efecto de dos factores

independientes y además analizar si existe una interacción entre ellos. También existe el ANOVA de medidas repetidas, que se aplica cuando los mismos sujetos son medidos varias veces bajo diferentes condiciones o en distintos momentos. Por lo tanto, con las mediciones de las respuestas obtenidas al ejecutar el diseño de experimentos, se planteó realizar un análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de analizar la influencia de las variables independientes consideradas en el experimento.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Activación de las cepas

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 8000

Para confirmar la activación de la cepa el tubo fue analizado. El medio de crecimiento utilizado fue caldo MRS, dado que es un medio específico para *Lactobacillus* por ser rico y equilibrado en fuente de carbono (glucosa), fuente de nitrógeno (triptona, extracto de levadura y carne) y otros componentes como sales de amonio y sulfatos, además de que posee un valor de pH de aproximadamente 6.5, siendo el óptimo de las bacterias lácticas. El tubo presentaba ligera turbidez y poca formación de biomasa en el fondo (Figura 8). Por otra parte, la placa sembrada no presentaba colonias, lo cual indicó que la activación de la cepa no fue posible en este medio. Sin embargo, al intentar hacer una nueva activación, el tubo ya no presentó turbidez ni formación de biomasa. Por lo tanto, se concluyó que la reactivación no tuvo éxito, por lo que no fue viable utilizar este microorganismo para experimentos posteriores.



**Figura 8.** Tubo activación *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 8000

- *Bacillus coagulans* ATCC 7050

Para confirmar la activación de la cepa el tubo fue analizado. El medio de crecimiento utilizado fue caldo soya tripticasa, dado que es un medio nutritivo no específico, con una rica fuente de carbono (glucosa), nitrógeno (triptona y peptona de soya) y otros componentes como cloruro de sodio y una fuente de fosfato, además de que posee un valor de pH de 7, siendo el bueno para las bacterias. Al observar el tubo, presentaba ligera turbidez, así como poca formación de biomasa en el fondo (Figura 9). La placa sembrada presentaba pocas colonias formadas. Lo anterior indicó que la activación de la cepa se realizó con éxito y se procedió al análisis morfológico.

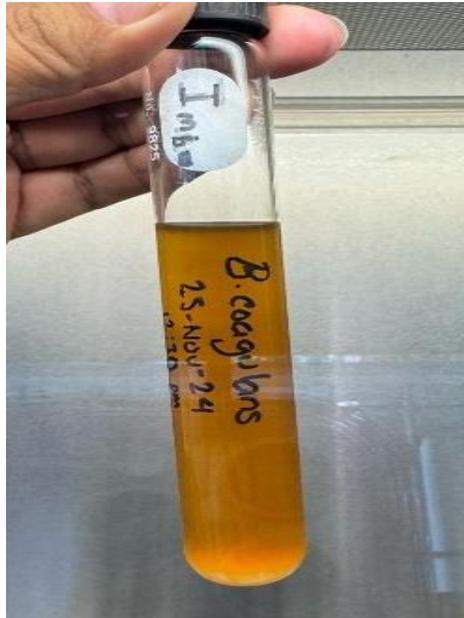


**Figura 9.** Tubo activación *Bacillus coagulans* ATCC 7050

- *Bacillus coagulans*

Para confirmar la activación de la cepa el tubo fue analizado. El medio de crecimiento utilizado fue caldo soya tripticasa, dado que es un medio nutritivo no específico, con una rica fuente de carbono (dextrosa), nitrógeno (triptona y peptona de soya) y otros componentes como cloruro de sodio y una fuente de fosfato, además de que posee un valor de pH de 7, siendo el bueno para las bacterias. Al observar el tubo, presentaba ligera turbidez, así como poca formación de biomasa en el fondo (Figura

10). La placa sembrada presentaba pocas colonias formadas. Lo anterior indicó que la activación de la cepa se realizó con éxito y se procedió al análisis morfológico.



**Figura 10.** Tubo activación *Bacillus coagulans*

- *Lactobacillus casei* ATCC 393

Para confirmar la activación de la cepa el tubo fue analizado. El medio de crecimiento utilizado fue caldo MRS, dado que es un medio específico para *Lactobacillus* por ser rico y equilibrado en fuente de carbono (dextrosa), nitrógeno (triptona) y vitaminas (extracto de levadura y carne), además de que posee un valor de pH de aproximadamente 6.5, siendo el óptimo de las bacterias lácticas. El tubo presentaba ligera turbidez y poca formación de biomasa en el fondo (Figura 11). La placa sembrada presentaba cantidad distinguible de colonias formadas. Lo anterior indicó que la activación de la cepa se realizó con éxito y se procedió al análisis morfológico.



**Figura 11.** Tubo activación *Lactobacillus casei* ATCC 393

- *Lactobacillus rhamnosus*

Para confirmar la activación de la cepa el tubo fue analizado. El medio de crecimiento utilizado fue caldo MRS, dado que es un medio específico para *Lactobacillus* por ser rico y equilibrado en fuente de carbono (dextrosa), nitrógeno (triptona) y vitaminas (extracto de levadura y carne), además de que posee un valor de pH de aproximadamente 6.5, siendo el óptimo de las bacterias lácticas. El tubo presentaba ligera turbidez y poca formación de biomasa en el fondo (Figura 12). La placa sembrada presentaba cantidad distinguible de colonias formadas. Lo anterior indicó que la activación de la cepa se realizó con éxito y se procedió al análisis morfológico.



**Figura 12.** Tubo activación *Lactobacillus rhamnosus*

## 7.2 Análisis morfológico

- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 8000

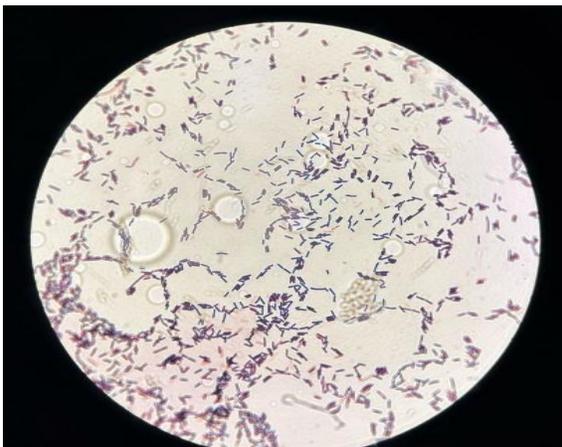
La Figura 13 ilustra que la morfología microscópica presentada es en forma de cocos pequeños, agrupados en racimos, mientras que la tinción en color violeta indica una bacteria Gram positiva. En cuanto a la morfología macroscópica, este análisis no se pudo realizar ya que no fue posible crecer en placas de agar el microorganismo. Sin embargo, *Lactobacillus delbrueckii* es una bacteria Gram positiva (aunque algunas son Gram variables), con forma de bacilo alargado y de extremos redondeados. Todas las cepas de esta bacteria tienen forma de bastón alargado y su tamaño varía de 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2,0 a 9,0  $\mu\text{m}$  de largo. Su crecimiento puede ser individualmente, en pares o en cadenas cortas. Es catalasa negativa, homofermentativa, y no presenta flagelo (Kadam et al., 2006; Subba Rao et al., 2008). Por lo tanto, se puede concluir que la cepa observada en el microscopio no presenta la morfología propia del género. En este sentido, se concluye en una posible contaminación y se decidió no utilizar este microorganismo en experimentos futuros.



**Figura 13.** Morfología microscópica *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 8000

- *Bacillus coagulans* ATCC 7050

En la Figura 14 se puede observar que la morfología microscópica presentada es en forma de bacilos (bastón) de tamaño mediano, con un crecimiento en cadenas cortas y en pares, las cuales se agrupan formando redes en su estructura, mientras que la tinción en color violeta indica una bacteria Gram positiva. En cuanto a la morfología macroscópica, como se muestra en la Figura 15 se pueden observar colonias circulares pequeñas, de borde regular, con una ligera elevación, de color ligeramente crema, superficie lisa mate y de consistencia cremosa. Su crecimiento en placa es de pocas colonias. De acuerdo con Poudel et al., (2016) y Patel et al., (2006) *Bacillus coagulans* es un género de bacterias que se caracterizan por ser formadoras de esporas en condiciones aeróbicas. Generalmente son Gram positivas (aunque algunas son Gram variables), con colonias que presentan organismos que se tiñen de rosado y otras que se tiñen de púrpura, esto es debido a que la capa de peptidoglicano puede hacerse menos gruesa y compleja a medida que envejece la bacteria, siendo incapaz de retener el cristal violeta al ser tratada con alcohol. Tienen forma de bastón, rectas o ligeramente curvadas y se pueden encontrar de forma individual, en pares y en cadenas. La gran mayoría de ellas son móviles, es decir, que se proyectan en todas direcciones. Por lo tanto, se puede concluir que la cepa observada si presenta la morfología propia del género. En este sentido, se decidió utilizar este microorganismo en experimentos futuros.



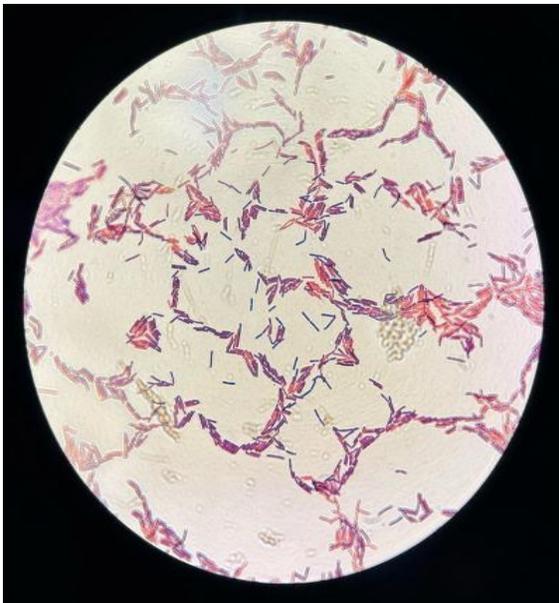
**Figura 14.** Morfología microscópica *Bacillus coagulans* ATCC 7050



**Figura 15.** Morfología macroscópica *Bacillus coagulans* ATCC 7050

- *Bacillus coagulans*

Como se muestra en la Figura 16 la morfología microscópica presentada es en forma de bacilos de tamaño largo, con un crecimiento en cadenas cortas y en pares, los cuales se agrupan formando redes en su estructura, mientras que la tinción en color violeta indica una bacteria Gram positiva. En cuanto a la morfología macroscópica, como se muestra en la Figura 17 se pueden observar colonias circulares pequeñas, de borde regular, con una ligera elevación, de color ligeramente crema, superficie lisa mate y de consistencia cremosa. Su crecimiento en placa es de pocas colonias. De acuerdo con lo señalado por Poudel et al., (2016) y Patel et al., (2006) y mencionado anteriormente, se puede concluir que la cepa observada si presenta la morfología propia del género. En este sentido, se decidió utilizar este microorganismo en experimentos futuros.



**Figura 16.** Morfología microscópica  
*Bacillus coagulans*



**Figura 17.** Morfología macroscópica  
*Bacillus coagulans*

- *Lactobacillus casei* ATCC 393

La Figura 18 revela que la morfología microscópica presentada es en forma de bacilos rectos medianos, con un crecimiento en cadena, las cuales se agrupan formando redes entrecruzadas gruesas y creando huecos con la disposición, mientras que la tinción en color violeta indica una bacteria Gram positiva. En cuanto a la morfología macroscópica, como se muestra en la Figura 19 se pueden observar colonias circulares pequeñas, de borde regular, planas, de color blanco grisáceo, superficie lisa mate y de consistencia cremosa. Su crecimiento en placa es de colonias abundantes. De acuerdo con lo propuesto por Kadam et al., (2006) y Subba Rao et al., (2008) y mencionado anteriormente, se puede concluir que la cepa observada si presenta la morfología propia del género. En este sentido, se decidió utilizar este microorganismo en experimentos futuros.



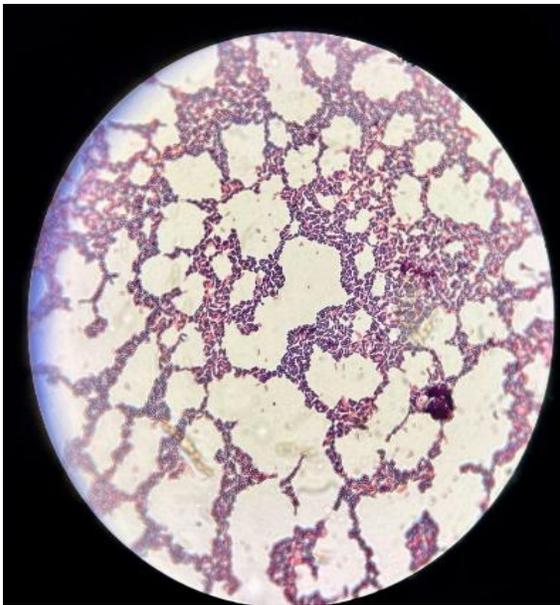
**Figura 18.** Morfología microscópica  
*Lactobacillus casei* ATCC 393



**Figura 19.** Morfología macroscópica  
*Lactobacillus casei* ATCC 393

- *Lactobacillus rhamnosus*

La Figura 20 sostiene que la morfología microscópica presentada es en forma de bacilos rectos medianos, con un crecimiento en cadena, las cuales se agrupan formando redes entrecruzadas gruesas y creando huecos con la disposición, mientras que la tinción en color violeta indica una bacteria Gram positiva. En cuanto a la morfología macroscópica, como se muestra en la Figura 21 se pueden observar colonias circulares pequeñas, de borde regular, planas, de color blanco grisáceo, superficie lisa mate y de consistencia cremosa. Su crecimiento en placa es de colonias abundantes. De acuerdo con lo expresado por Kadam et al., (2006) y Subba Rao et al., (2008) y mencionado anteriormente, se puede concluir que la cepa observada si presenta la morfología propia del género. En este sentido, se decidió utilizar este microorganismo en experimentos futuros.



**Figura 20.** Morfología microscópica  
*Lactobacillus rhamnosus*



**Figura 21.** Morfología macroscópica  
*Lactobacillus rhamnosus*

### 7.3 Seguimiento preliminar de pH en medio de cultivo para la cepa *Bacillus coagulans* ATCC 7050

- Cuantificación de carga microbiana del inóculo

Se realizó el conteo y cálculos para determinar la carga microbiana del inóculo introducido al medio de cultivo MRS. El inóculo se incubó durante 48 horas a una temperatura de 35 °C en una incubadora sin agitación. La carga microbiana se calculó observando el crecimiento en las placas sembradas con diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , posteriormente se eligieron aquellas que presentaran colonias contables, es decir, que estuvieran separadas entre sí y que por lo tanto fueran visibles. De acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994, se deben considerar y contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias. Las placas de al menos una de las diluciones realizadas deben estar en este intervalo, para que sea viable contar las colonias.

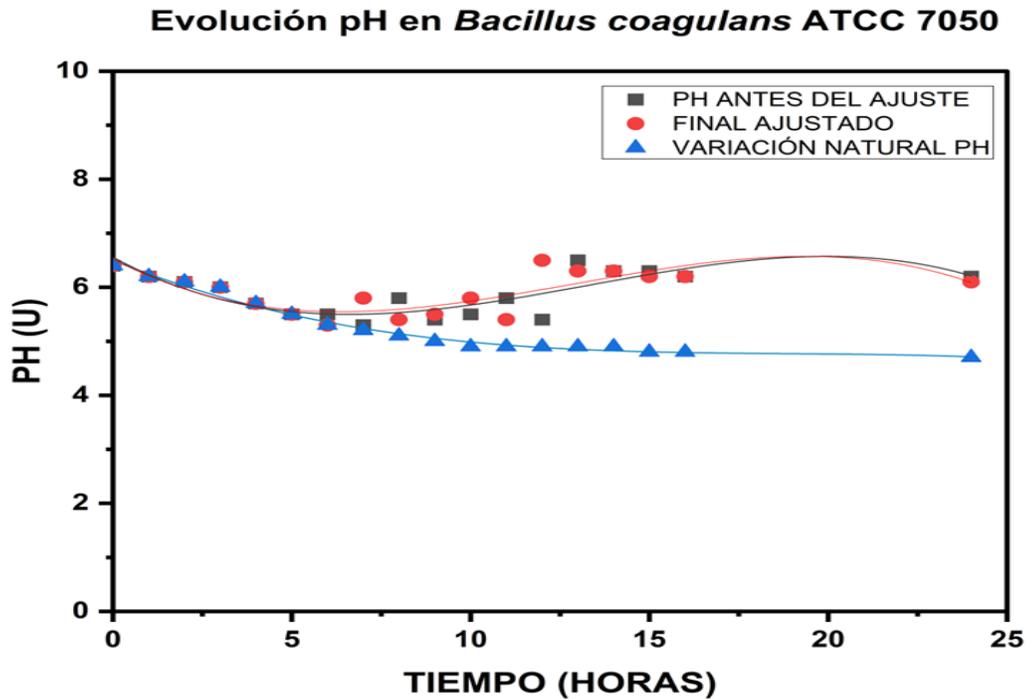
El conteo en placa se realizó por duplicado para verificar los resultados. Por lo tanto, considerando lo anterior, para el caso del *B. coagulans* ATCC 7050 se tomó en cuenta la dilución  $10^{-4}$ , que corresponde con los parámetros descritos en la norma, y de esta forma se estimaron las UFC/mL de acuerdo con la fórmula descrita anteriormente para la técnica de Miles & Misra. Al realizar los cálculos correspondientes se obtuvo un conteo final para el inóculo de  $11 \times 10^6$  UFC/ml lo que de acuerdo con investigaciones previamente reportadas corresponde a una buena carga microbiana para poder utilizarse como inóculo (Fonseca et al., 2001; Nalawade et al., 2020).

- Seguimiento de pH

La variación del pH en un medio con bacterias ácido-lácticas tiene un impacto significativo en su crecimiento, metabolismo, y producción de ácido láctico. Estas bacterias son sensibles a los cambios de pH debido a su metabolismo fermentativo, que produce ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, los cuales a su vez

modifican el pH del medio. Un pH demasiado bajo ( $< 4$ ) puede inhibir su crecimiento, reducir su viabilidad y provocar daño celular debido a la acumulación de protones ( $H^+$ ) en el citoplasma. Por otra parte, un pH demasiado alto ( $> 7$ ) también puede inhibir su crecimiento, ya que no están adaptadas a condiciones alcalinas (Cubas-Cano et al., 2020). Así mismo, la eficiencia del proceso para la obtención del metabolito de interés, como es el caso del ácido láctico, y la tasa de transformación de glucosa pueden verse afectados por la apertura del sistema al momento del muestreo de pH, dado que tal apertura puede tener un posible efecto en la ruptura de la condición de anaerobiosis, considerando que las bacterias ácido-lácticas muestran mejores desempeños bajo condiciones bajas de oxígeno (Ibrahim, 2016; Minervini & Calasso, 2021; Weiss et al., 1983).

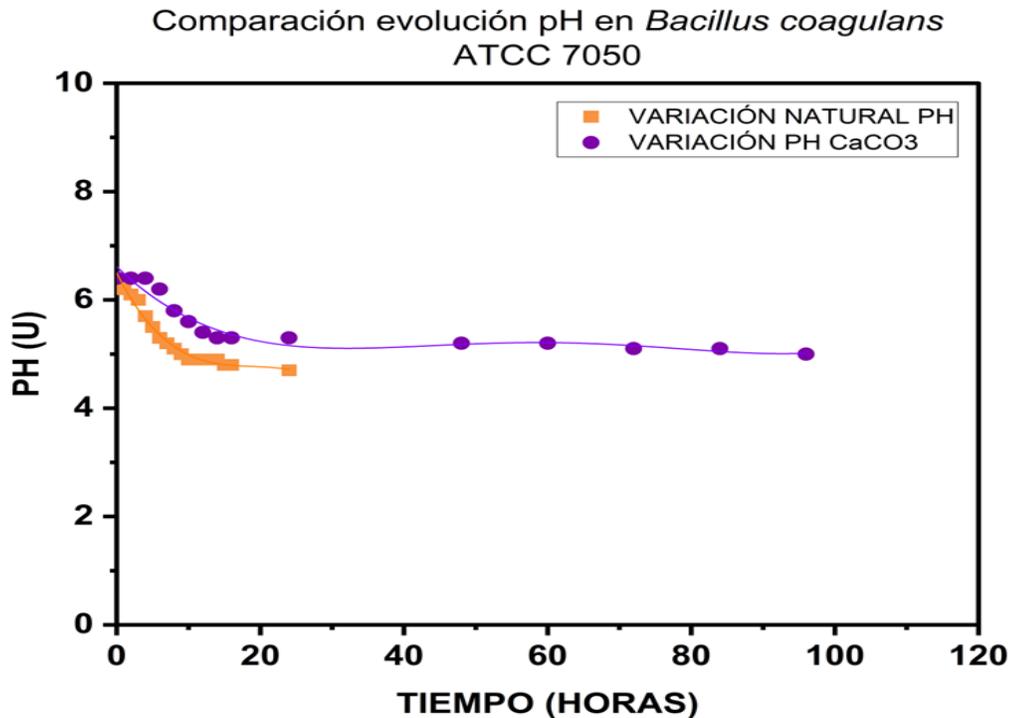
En la Figura 22 se destaca la evolución de pH en un sistema modelo rico en azúcares para fermentación bacteriana con y sin control. El control de pH implica mantener el pH constante e igual al valor inicial con un margen de variación de  $\pm 0.5$  unidades (Granget et al., 2024). Como se puede observar, el sistema presenta una disminución importante en la variación normal de pH (puntos verdes) entre el tiempo 5 y el tiempo 11, mientras que después se estabiliza manteniéndose en un intervalo de pH adecuado (5.5 a 6.5) para *Bacillus coagulans* ATCC 7050. Por otra parte, se observa que una vez ha disminuido el pH en aproximadamente 1 unidad respecto del tiempo durante las primeras 7 horas, se realizó el ajuste necesario y el pH mostró un comportamiento de aumento para posteriormente mantenerse constante en el intervalo óptimo deseado (entre 5.5 y 6.5). Según lo reportado por autores como Poudel et al., (2016) las cepas de *Bacillus* también presentan un pH neutro óptimo para el crecimiento o la producción de ácido láctico, pero son sensibles al pH ácido (por debajo de 5.0). El intervalo de pH en las cepas de *Bacillus* es amplio y se encuentra entre 5.0 y 9.0, sin embargo, en condiciones de pH no controlado, las cepas de no pueden acumular altas concentraciones de ácido láctico debido a su intolerancia a valores de pH ácidos, mientras que, con pH controlado, se espera una mejora en la concentración y la productividad en la fermentación láctica.



**Figura 22.** Evolución de pH en medio de cultivo MRS ajustado con solución de NaOH 2M con *Bacillus coagulans* ATCC 7050.

La Figura 23 muestra la comparación en la evolución del pH para la cepa de *Bacillus coagulans* ATCC 7050, en un medio de cultivo estándar (MRS) respecto a un medio modelo rico en azúcares preparado con una concentración de 100 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura y adicionado con un agente neutralizante de pH como es el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) en una concentración de 20 g/L, el cual tiene como propósito estabilizar el pH durante las fermentaciones. Se observa que el comportamiento de pH en el medio con  $\text{CaCO}_3$  tiende a disminuir menos en comparación con el medio MRS, es decir, la evolución de pH en el medio modelo adicionado con  $\text{CaCO}_3$  muestra una disminución de 1.5 unidades respecto al tiempo, mientras que la disminución de pH en el medio MRS es de aproximadamente 2.0

unidades, lo que indica que el uso de un agente neutralizante puede ayudar a estabilizar el pH en el intervalo deseado.



**Figura 23.** Comparación de la evolución natural de pH en medio de cultivo MRS y medio modelo de fermentación adicionado con CaCO<sub>3</sub> con *Bacillus coagulans* ATCC 7050.

#### 7.4 Pruebas preliminares de fermentación en 4 sistemas modelo ricos en azúcares y cuantificación de ácido láctico final

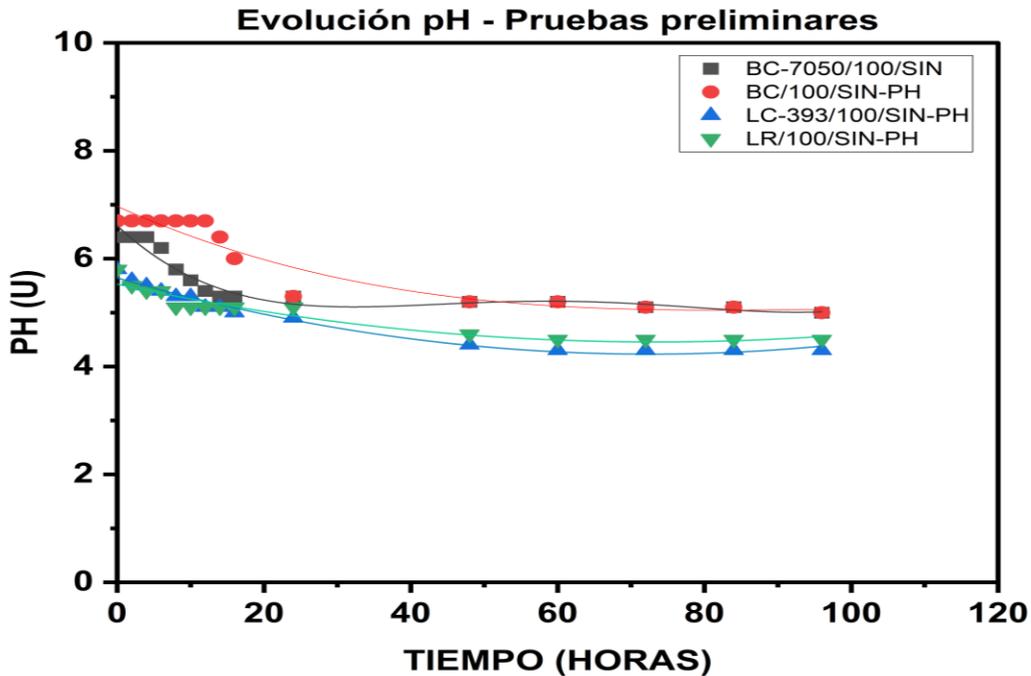
- Evolución de pH

Se realizó un seguimiento a la evolución natural del pH en el medio de fermentación, el cual contenía el sustrato, extracto de levadura y carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) como agente neutralizante con el objetivo de estabilizar la acidificación propia del medio durante la fermentación láctica, dado que el pH es uno de los principales factores a considerar para lograr mantener las bacterias en un estado óptimo para su

debido crecimiento celular y por consiguiente, que sean capaces de fermentar los azúcares disponibles en el medio a metabolitos de interés.

En la Figura 24 se puede observar la evolución de pH para cada microorganismo (*Bacillus coagulans* ATCC 7050, *Bacillus coagulans*, *L. casei* ATCC 393 y *L. rhamnosus*) durante las 96 horas de fermentación láctica. Cada grupo de microorganismos, *Bacillus* y *Lactobacillus* presentan un comportamiento similar. Se debe considerar que el pH inicial fue diferente para cada microorganismo, dado que en estas pruebas no se realizó un ajuste de pH, y se buscó analizar la evolución natural de pH para cada sistema dependiendo del microorganismo. Por ejemplo, para el caso de los *Bacillus*, se observa una mayor disminución de pH, desde 6.4 hasta 5, siendo las primeras 20 horas donde es más visiblemente el decaimiento de pH. Por otra parte, para el caso de los *Lactobacillus*, se observa una menor disminución de pH, que va desde 5.8 hasta 4.5. En este sentido, se puede evidenciar que los cuatro microorganismos son capaces de trabajar en condiciones ácidas iniciales, siendo la principal diferencia que el pH inicial no es igual entre ellos. Un pH inicial más bajo de un microorganismo respecto de otro en una fermentación láctica puede influir significativamente en el crecimiento microbiano y en la producción del metabolito de interés (Chen et al., 2020; Granget et al., 2024). En este contexto, algunos microorganismos están adaptados a iniciar la fermentación en pH bajo y mantienen una buena actividad metabólica, sin embargo, para otros microorganismos un pH inicial bajo puede inducir un estrés ácido causando muerte celular prematura o aumento en la formación de subproductos y biomasa, lo cual puede limitar desde un inicio la producción de ácido láctico, disminuyendo el rendimiento fermentativo (Cubas-Cano et al., 2018). Por otra parte, romper la condición de anaerobiosis al abrir el matraz para la medición de pH durante la fermentación láctica puede tener efectos importantes en la eficiencia final del proceso, y estos dependen de varios factores como el tipo de bacteria, la duración de la exposición al oxígeno y la sensibilidad del microorganismo al oxígeno, lo cual puede reducir la eficiencia del proceso al disminuir la producción de ácido láctico y desviar el metabolismo hacia otros productos, especialmente en cepas estrictamente anaerobias. Sin embargo, si el control de pH es crítico y no

automatizable, deben tomarse medidas para minimizar la exposición al oxígeno y elegir cepas más tolerantes al oxígeno (Ibrahim, 2016; Minervini & Calasso, 2021; Weiss et al., 1983).



**Figura 24.** Evolución de pH sistemas modelo ricos en azúcares utilizando *Bacillus coagulans* ATCC 7050, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus*.

- Cuantificación de carga microbiana de los inóculos y curvas de crecimiento

Para la cuantificación de la carga microbiana del inóculo, así como de las muestras para los puntos en las curvas de crecimiento, se empleó la técnica antes descrita de Miles & Misra. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las placas (24 horas para *Lactobacillus* y 48 horas para *Bacillus*), se realizó el conteo usando un cuentacolonia, siguiendo los parámetros que indica la NOM-092-SSA1-1994 para elegir las diluciones y estimar una cantidad real de colonias por dilución. Para el inóculo, se esperaba una carga microbiana entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL, cifra recomendada en fermentaciones lácticas por autores como Nalawade et al., (2020). Los resultados

de la cuantificación del inóculo para los 4 microorganismos (*Bacillus coagulans* ATCC 7050, *Bacillus coagulans*, *L. casei* ATCC 393 y *L. rhamnosus*) se muestran en la Tabla 6, en UFC/mL y logaritmo base 10 (log), dado que este último es el valor más utilizado para las curvas de crecimiento, pues proporciona una mejor visualización del crecimiento exponencial de las células.

**Tabla 6. Carga microbiana inóculos**

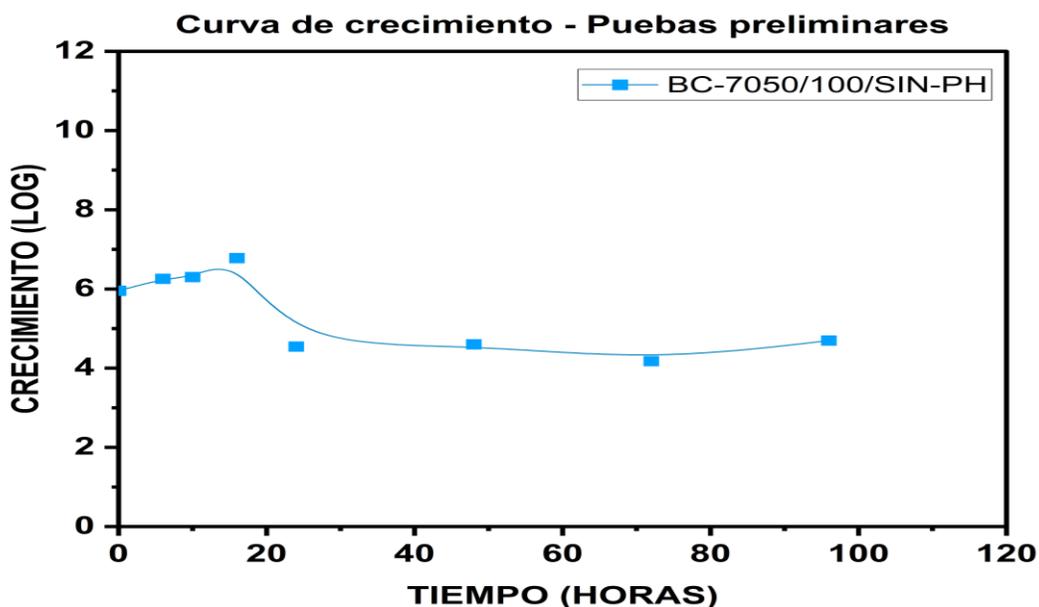
Microorganismo	Carga microbiana inóculo	
	UFC/mL	Log
<b><i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050</b>	9x10 <sup>5</sup>	5.95
<b><i>Bacillus coagulans</i></b>	70x10 <sup>3</sup>	4.84
<b><i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393</b>	8x10 <sup>6</sup>	7.90
<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i></b>	26x10 <sup>7</sup>	8.14

Fuente: Elaboración propia

Como se aprecia en la Tabla 6, la carga microbiana en el inóculo de *L. casei* ATCC 393 y *L. rhamnosus* se encuentra dentro del intervalo óptimo para poder usarse en un proceso de fermentación, proporcionando un grado de seguridad respecto al funcionamiento del microorganismo en un medio de fermentación. Sin embargo, las cepas de *Bacillus* muestran una carga microbiana muy baja en el inóculo, lo que puede ocasionar que el microorganismo no sea capaz de trabajar adecuadamente en el medio de fermentación, dada la baja cantidad de células viables que se añaden al inicio de la fermentación láctica. En este contexto, la carga microbiana del inóculo se presenta como un factor crítico que influye directamente en el rendimiento del proceso fermentativo, puesto que un inóculo con baja carga microbiana propicia una prolongación de la fase lag, es decir, el tiempo de adaptación del microorganismo al medio es mayor lo que a su vez retrasa el inicio de la fermentación, además de que al ser poca población microbiana el consumo del sustrato es lento e incompleto y por

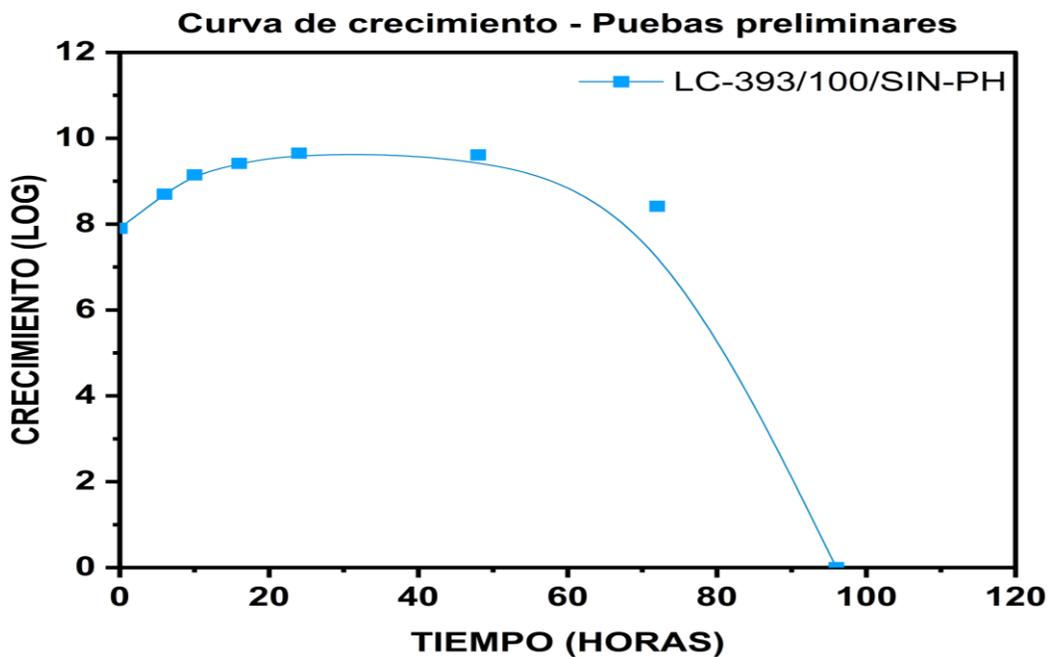
tanto no se alcanza una tasa de producción suficiente de ácido láctico, lo que se refleja en un bajo rendimiento en el proceso. A pesar de ello y tomando en cuenta dicha información, las 4 cepas fueron usadas en las pruebas preliminares de fermentación, sin embargo, las curvas de crecimiento para la cepa de *Bacillus coagulans* no se pudo realizar dado que en algunos puntos de muestreo no hubo crecimiento en las diluciones empleadas, hecho que era de esperarse dado la baja carga del inóculo.

A continuación, se presentan las curvas de crecimiento para *Bacillus coagulans* ATCC 7050, *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus*. En la Figura 25 se observa el comportamiento de la curva de crecimiento para *B. coagulans* ATCC 7050 durante la fermentación láctica, la curva muestra una pequeña fase exponencial durante las primeras 10 horas, seguida de una mínima fase estacionaria entre la hora 10 y 16 y finalmente una fase de muerte evidente a partir de las 24 horas, lo cual se puede atribuir a la acidificación propia del sistema modelo, lo que indicaría que la adición del  $\text{CaCO}_3$  como agente buffer en el medio no es suficiente para mantener el pH óptimo (6.0) por lo que sería necesario emplear otra metodología que ayude a la regulación del pH.



**Figura 25.** Curva de crecimiento para *Bacillus coagulans* ATCC 7050 en un sistema modelo rico en azúcares

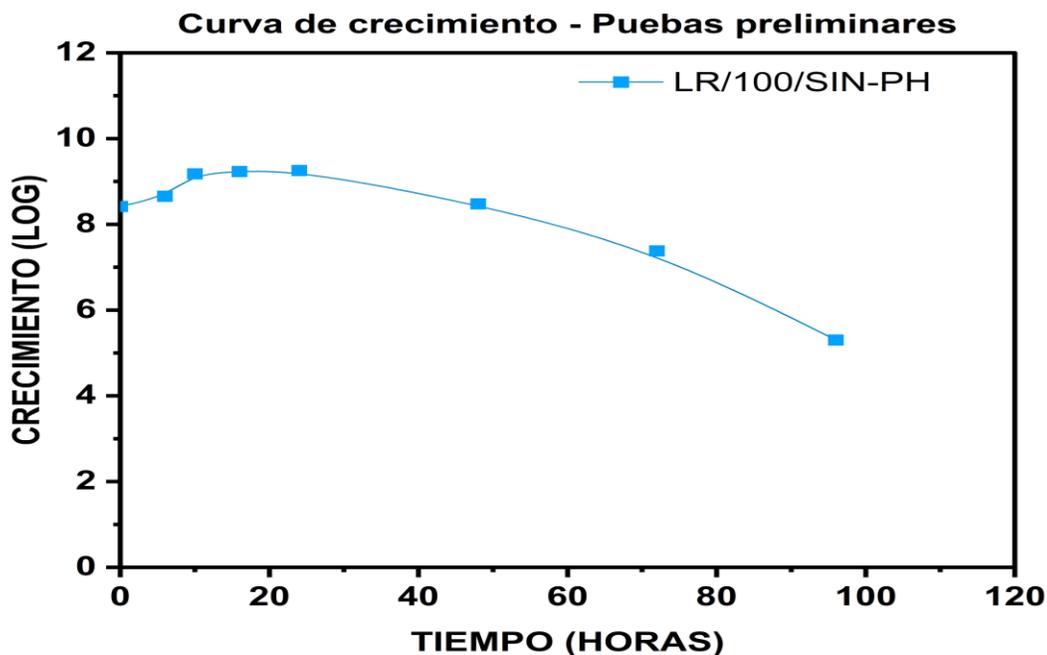
Así mismo en la Figura 26 se señala el comportamiento de la curva de crecimiento para *L. casei* ATCC 393 durante la fermentación láctica, el cual muestra una mínima fase exponencial durante las primeras 6 horas, seguida de una fase estacionaria entre el tiempo 10 y 24 y finalmente una fase de muerte evidente a partir de las 72 horas, lo cual se puede atribuir a la acidificación propia del sistema modelo, lo que indicaría que la adición del  $\text{CaCO}_3$  como agente buffer en el medio no es suficiente para mantener el pH óptimo (6.0) por lo que sería necesario emplear otra metodología que ayude a la regulación del pH.



**Figura 26.** Curva de crecimiento para *Lactobacillus casei* ATCC 393 en un sistema modelo rico en azúcares

Del mismo modo, en la Figura 27 se observa el comportamiento de la curva de crecimiento para *L. rhamnosus* durante la fermentación láctica, el cual muestra una mínima fase exponencial durante las primeras 10 horas, seguida de una fase estacionaria entre el tiempo 10 y 24 y finalmente una fase de muerte progresiva a partir de las 48 horas, lo cual se puede atribuir a la acidificación propia del medio modelo, lo

que indicaría que la adición del  $\text{CaCO}_3$  como agente buffer en el medio no es suficiente para mantener el pH óptimo (6.0) por lo que sería necesario emplear otra metodología que ayude a la regulación del pH.



**Figura 27.** Curva de crecimiento para *Lactobacillus rhamnosus* en un sistema modelo rico en azúcares

En este sentido, para los experimentos posteriores se propuso una metodología para controlar el pH con la adición de NaOH al medio según fuera requerido.

- Grados Brix

Con la medición de grados Brix usando un refractómetro, se esperaba observar el comportamiento en el consumo de glucosa del medio, sin embargo, los datos obtenidos no fueron consistentes con lo esperado, pues no se presentó disminución alguna en el porcentaje de grados Brix, lo que llevó por un momento a pensar que no había un consumo de glucosa. No obstante, dicha suposición fue descartada rápidamente al observar que el medio de fermentación presentaba turbidez, así como

una acidificación, lo cual indicaba que si se estaba produciendo metabolitos en el medio. Posteriormente mediante HPLC se confirmó el consumo de glucosa. Si bien si se demostró un consumo de glucosa, la medición con refractómetro de grados Brix demostró no ser viable para este caso, lo cual se puede atribuir a una interferencia del ácido láctico formado presente en el medio, lo cual impide que el aparato pueda medir la señal correctamente. Por lo tanto, la medición de grados Brix fue descartada.

- Biomasa final

La determinación de la biomasa seca final en un medio de fermentación es una medida clave para evaluar el rendimiento y la eficiencia del proceso fermentativo, ya que permite cuantificar la cantidad de células producidas durante el cultivo. Para determinar la biomasa seca final de los medios de fermentación, fue necesario considerar que en la suspensión final (precipitado) seca y pesada, se encontraba una cierta cantidad de  $\text{CaCO}_3$ , ya que es un compuesto insoluble en agua, por lo que no se pudo extraer del medio al momento de centrifugar. Por lo tanto, el primer paso para realizar los cálculos de biomasa final en los medios modelo fue hacer una correlación entre la cantidad conocida de  $\text{CaCO}_3$  presente al inicio de la fermentación, con la cantidad teórica final que restaría en el medio al finalizar la fermentación, considerando que se extrajo una alícuota homogénea del medio en cada muestreo. De esta forma, de acuerdo con el volumen restante del medio final se pudo estimar la cantidad presente ahí de  $\text{CaCO}_3$ , la cual es necesaria conocer para poder realizar el cálculo de la biomasa final. Una vez conocida la cantidad de  $\text{CaCO}_3$  restante en el medio y con el peso los tubos secos vacíos y peso de los tubos secos con la muestra, al peso de los tubos con muestras se les resta la cantidad teórica de  $\text{CaCO}_3$  presente en el volumen restante del medio final. De esta forma se obtiene el peso seco de la biomasa, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$m_{\text{Biomasa}} = m_{\text{Materia seca}} - m_{\text{CaCO}_3}$$

Donde m se refiere al peso seco.

Tomando en cuenta lo anterior, los resultados obtenidos de peso seco de biomasa se muestran en la Tabla 7. Dado que solo se cuantificó el peso seco final de biomasa, no fue posible establecer una relación con el peso inicial, sin embargo, con los datos obtenidos se puede observar que los pesos son muy similares entre sí, y considerando que todos los medios estuvieron bajo las mismas condiciones, se creó una hipótesis de que todos los microorganismos tuvieron un crecimiento y formación de biomasa similar, indicando que en ningún caso se tiene una fase exponencial de crecimiento celular y que más bien las células viables solo se mantienen y llega un momento en que mueren, sin haber un crecimiento de nuevas células. Tal hipótesis se puede respaldar en el hecho de que quizá el inóculo no tiene la suficiente carga microbiana o que a los microorganismos les cuesta adaptarse al medio de fermentación (Chen et al., 2020; Y. Wang et al., 2016).

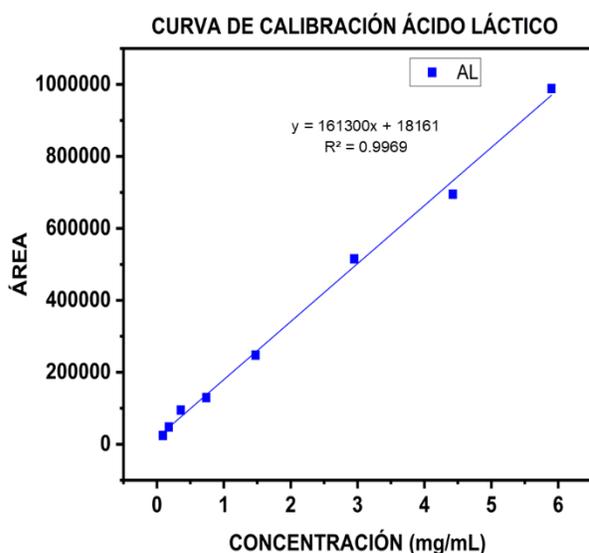
**Tabla 7. Peso seco biomasa final**

<b>Experimento</b>	<b>Peso seco biomasa (g/mL)</b>
<b>BC-7050/100/SIN-PH</b>	0.4324
<b>BC/100/SIN-PH</b>	0.3361
<b>LC-393/100/SIN-PH</b>	0.4485
<b>LR/100/SIN-PH</b>	0.3998

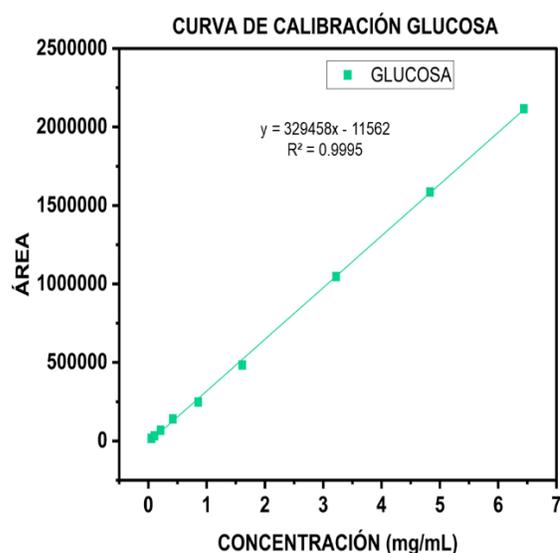
- Cuantificación de glucosa y ácido láctico usando HPLC

Para las pruebas preliminares, se cuantificó el ácido láctico en el medio fermentado, así como la glucosa residual, es decir, la glucosa que no fue consumida en el medio de fermentación, valor que servirá para realizar cálculos posteriores de glucosa consumida, la cual corresponderá al valor de la glucosa inicial menos el valor de la glucosa residual cuantificada mediante HPLC. Para poder cuantificar tales

compuestos fue necesario realizar curvas de calibración para el ácido láctico y la glucosa, las cuales deben tener un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor a 0.98, el cual indica que tan bien se ajusta la recta de calibración a los datos experimentales. La Figura 28 muestra la curva de calibración para el ácido láctico con un  $R^2 = 0.9969$ , y a su vez la Figura 29 muestra la curva de calibración para la glucosa con un  $R^2 = 0.9995$ .



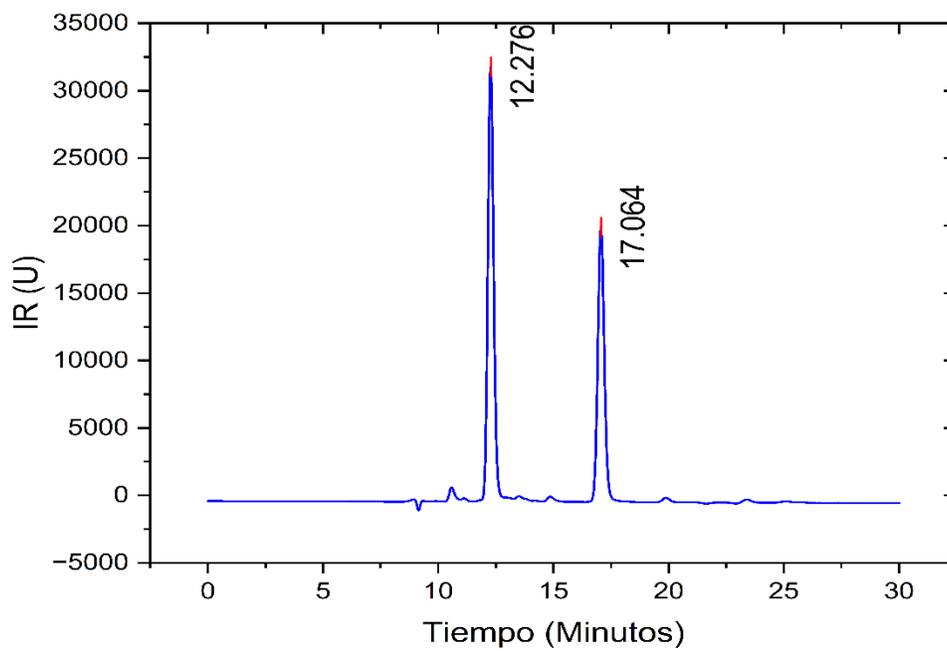
**Figura 28.** Curva de calibración para ácido láctico



**Figura 29.** Curva de calibración para glucosa

Con las curvas de calibración establecidas, se procedió a analizar las muestras donde se obtuvo un cromatograma con los picos de los compuestos presentes, y del pico se integró el área bajo la curva para posteriormente realizar la cuantificación. Los picos característicos del ácido láctico y glucosa se encontraron alrededor de los 17 y 12 minutos de retención, respectivamente. Los tiempos de retención son siempre los mismos (con ligeras variaciones decimales) para cada compuesto. A continuación se muestra un cromatograma típico (Figura 30), en el cual se pueden identificar los picos correspondientes al ácido láctico (tiempo de retención = 17.062 minutos) y a la glucosa (tiempo de retención = 12.276 minutos), de acuerdo con manual Analysis of

carbohydrates, alcohols and organic acids by ion-exchange chromatography (Agilent Technologies).



**Figura 30.** Cromatograma para ácido láctico y glucosa

Así mismo, los valores obtenidos para ácido láctico se muestran en la Tabla 8 y los valores obtenidos para glucosa en la Tabla 9. Ambos datos fueron calculados en base al área bajo la curva de cada pico presente en su respectivo cromatograma. El cálculo se realizó con ayuda de la ecuación normal de la recta obtenida en las curvas de calibración. La ecuación se muestra a continuación.

$$y = mx + b$$

Donde  $y$  es la variable dependiente,  $m$  es la pendiente,  $x$  es la variable independiente y  $b$  es la ordenada al origen. En este sentido, la ecuación obtenida en las curvas de calibración, nos proporciona los valores de  $m$  y  $b$ , mientras que el valor de  $y$  corresponde al área bajo la curva integrada en los cromatogramas, por lo que es posible despejar  $x$ , que sería la variable desconocida correspondiente a la

concentración tanto de ácido láctico como de glucosa. La ecuación quedaría de la siguiente manera.

$$x = \frac{y - b}{m}$$

**Tabla 8. Cuantificación ácido láctico**

<b>Experimento</b>	<b>Área</b>	<b>Ácido láctico (g/100 mL)</b>	<b>Ácido láctico (g/L)</b>
<b>BC-7050/100/SIN-PH</b>	382,234.00	3.95	<b>39.50</b>
<b>BC/100/SIN-PH</b>	364,699.60	3.76	<b>37.60</b>
<b>LC-393/100/SIN-PH</b>	469,494.70	4.90	<b>48.97</b>
<b>LR/100/SIN-PH</b>	452,628.80	4.71	<b>47.14</b>

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 9. Cuantificación glucosa**

<b>Experimento</b>	<b>Área</b>	<b>Glucosa (g/100 mL)</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>
<b>BC-7050/100/SIN-PH</b>	678821.6	4.03	<b>40.30</b>
<b>BC/100/SIN-PH</b>	635447.6	3.77	<b>37.68</b>
<b>LC-393/100/SIN-PH</b>	619182.5	3.67	<b>36.70</b>
<b>LR/100/SIN-PH</b>	691872.6	4.11	<b>41.09</b>

Fuente: Elaboración propia

Considerando los valores de ácido láctico producido mostrados en la Tabla 8 es posible concluir que los 4 microorganismos son capaces de producir una importante

concentración ácido láctico en sistemas modelo ricos en azúcares (glucosa). Estos resultados concuerdan con los reportados en estudios previos hechos por Singhvi et al., (2018), por lo que se pueden considerar buenos valores preliminares para poder definir un buen diseño de experimentos para las pruebas finales.

Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Feoli Bonilla et al., (1995) quien informa del uso del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* en la producción de ácido láctico a partir de monosacáridos en un medio compuesto por suero de sangre de res y sacarosa como sustrato. La mayor concentración de ácido láctico obtenida fue de 68.31 g/L empleando 2.5% (v/v) de inóculo con una concentración inicial de sustrato de 100 g/L de sacarosa a un pH de 5.5. De acuerdo con los datos reportados, el mayor rendimiento alcanzado es de 81.25% para una concentración de sacarosa de 60 g/L y un porcentaje de inóculo de 2.5, mientras que su mayor productividad fue de 0.57 g/L\*h a una concentración de sacarosa de 100 g/L y un porcentaje de inóculo de 2.5. Así mismo, el autor señala que a medida que aumenta el porcentaje de inóculo y se disminuye la concentración de sacarosa, aumenta la producción de la fermentación y viceversa, y esto se debe a que, si aumenta la presión osmótica del sustrato, se produce un efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo. Los resultados de esta investigación concuerdan también con las observaciones realizadas por Senedese et al., (2015) quien menciona el uso de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 para la producción de ácido L-láctico usando como medio de fermentación melaza de caña de azúcar cuyo componente mayoritario es la sacarosa, considerando una concentración de sacarosa de 27 g/L presente en la solución de melaza. Adicional a esto, la fermentación se realizó tipo batch y batch alimentado, con un porcentaje de inóculo del 14% (v/v). La fermentación batch duró solo 20 horas en las cuales se tuvo una producción de 14 g/L de ácido láctico, mientras que la de tipo batch alimentado duró 48 horas obteniendo una producción máxima de 22 g/L. Por lo tanto, considerando los resultados de la presente investigación realizada para la producción de ácido láctico utilizando diferentes microorganismos, sería conveniente variar la concentración de sustrato para ver el

efecto que generaría dependiendo de la composición del medio de fermentación y el tipo de microorganismo utilizado.

Por otra parte, los valores de glucosa obtenidos hacen referencia a la cantidad de glucosa restante en el medio, es decir, aquella que no fue consumida por los microorganismos, y considerando las cantidades se puede deducir que los cuatro microorganismos estudiados están fermentando una buena cantidad de sustrato, partiendo del hecho que la concentración inicial de glucosa fue de 100 g/L y en los medios están quedando en promedio 40 g/L de glucosa sin consumirse. Considerando esta información, se puede concluir que los valores obtenidos en las pruebas preliminares de este proyecto son consistentes y pueden ser competitivos respecto a los datos ya reportados (Abdel-Rahman et al., 2011; González-Leos et al., 2020; Küçükgoz et al., 2024).

- Tasa de transformación de glucosa ( $x_G$ ) y rendimiento de ácido láctico ( $Y_{AL/G}$ )

La tasa de transformación de glucosa y el rendimiento de ácido láctico son herramientas indispensables para el control y optimización de procesos fermentativos, y así evaluar la eficiencia del proceso biotecnológico. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 10. Como se puede observar todos los microorganismos tiene rendimientos superiores a 0.6 lo cual en procesos biotecnológicos es bueno, sin embargo, la tasa de transformación de glucosa está alrededor del 50%, parámetro se debería ser mejorado para un mejor aprovechamiento del sustrato, y eso se podría realizar aumentando la carga del inóculo inicial o reduciendo la concentración de azúcares. Con base en los resultados obtenidos, se eligieron la cepa de *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, para experimentos posteriores, considerando que estas tienen los mejores rendimientos de ácido láctico en cada género.

**Tabla 10.** Tasa de transformación de glucosa ( $x_G$ ) y rendimiento de ácido láctico ( $Y_{AL/G}$ )

<b>Experimento</b>	<b><math>Y_{AL/G}</math> (mol/mol)</b>	<b><math>x_G</math> (%)</b>
<b>BC-7050/100/SIN-PH</b>	0.66	59.7
<b>BC/100/SIN-PH</b>	0.60	62.32
<b>LC-393/100/SIN-PH</b>	0.80	58.91
<b>LR/100/SIN-PH</b>	0.77	63.3

Fuente: Elaboración propia

## 7.5 Diseño de experimentos

Se propuso un diseño de experimentos factorial  $2^n$ , para evaluar 3 variables de interés en los medios modelo, como es el tipo de microorganismo, variación de pH (con control y sin control) y la concentración de sustrato (glucosa). De esta manera, el diseño de experimentos factorial constaría con un total de 8 experimentos, de acuerdo con la ecuación:

$$Ne = 2^n = 2^3 = 8$$

Donde Ne es el número total de experimentos y n es el número de factores.

Como parámetros fijos se consideraron la temperatura de incubación (37 °C), agitación constante (200 rpm), volumen del matraz (150 ml), concentración del resto de componentes del medio de fermentación y tiempo de fermentación (96 horas).

Con base en la información obtenida en las pruebas preliminares, se decidió variar la concentración de sustrato en 60 g/L y 120 g/L, puntos cercanos a la concentración de 100 g/L utilizada con anterioridad, la cual mostró buenos resultados. Respecto a la elección del microorganismo, considerando que se disponían de dos cepas por género (*Bacillus* y *Lactobacillus*) se acordó seleccionar una cepa de cada

género, para realizar un comparativo respecto a su funcionamiento, y también se estableció variar la condición de pH, es decir, realizando y no realizando ajuste al medio modelo rico en azúcares. El diseño quedó compuesto como se muestra en la Tabla 11, tomando en cuenta que se haría un duplicado de un medio.

**Tabla 11. Diseño de experimentos**

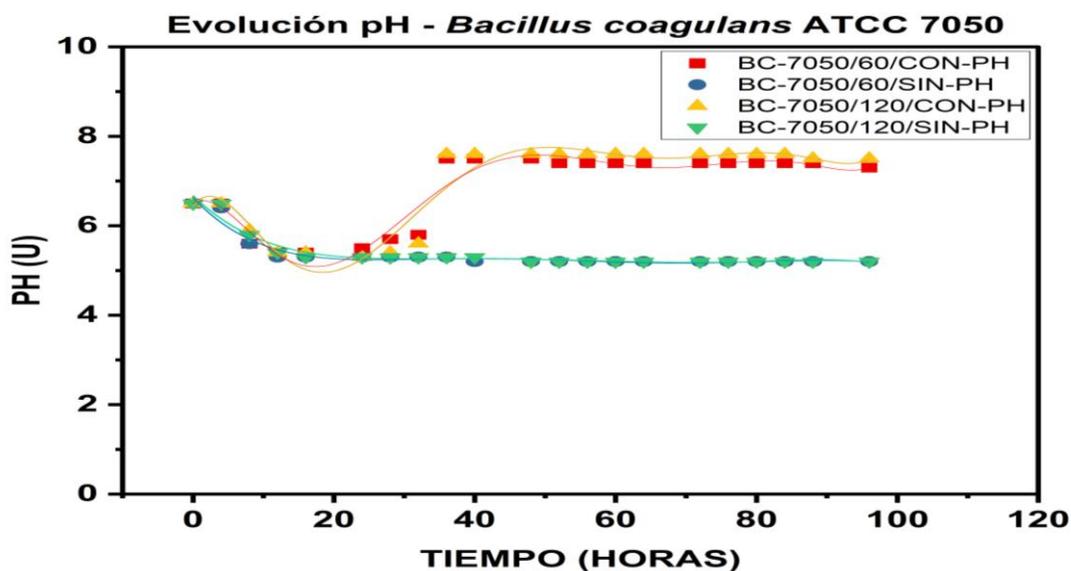
Sistema	Variables		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	60 g/L	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	Con control de pH
2	60 g/L	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	Sin control de pH
3	120 g/L	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	Con control de pH
4	120 g/L	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	Sin control de pH
5	60 g/L	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Con control de pH
6	60 g/L	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Sin control de pH
7	120 g/L	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Con control de pH
8*	120 g/L	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Sin control de pH

\* Experimento duplicado. Fuente: Elaboración propia

## 7.6 Pruebas finales de fermentación en sistemas modelo ricos en azúcares (diseño de experimentos) con cuantificación de ácido láctico

### - Evolución de pH

Se realizó un seguimiento a la evolución del pH en medio con y sin control, con concentraciones de 60 y 120 g/L de glucosa usando una cepa de *Bacillus coagulans* ATCC 7050. En la Figura 31 se puede evidenciar que los medios modelo ricos en azúcares a los cuales se les realizó un ajuste mediante la adición de NaOH, presentan un incremento importante en el valor de pH, alcanzando casi las 8 unidades. Este aumento de pH pudo provocar un estrés en el medio, razón por la cual las células pudieron ver afectado su crecimiento. Se considera que a partir del tiempo 20 aproximadamente fue cuando se generó el aumento. Por otro lado, los medios a los cuales no se les ajustó el pH presentaron una tendencia de decaimiento en las curvas, lo cual era esperado dado que al estar en el proceso de fermentación se crea una acidificación natural del medio. No obstante, el decaimiento no fue tan brusco, considerando que se inició en un pH cercano a 7 y terminó cercano a 5, indicando una disminución de 2 unidades de pH, especialmente fue notorio durante las primeras 20 horas.

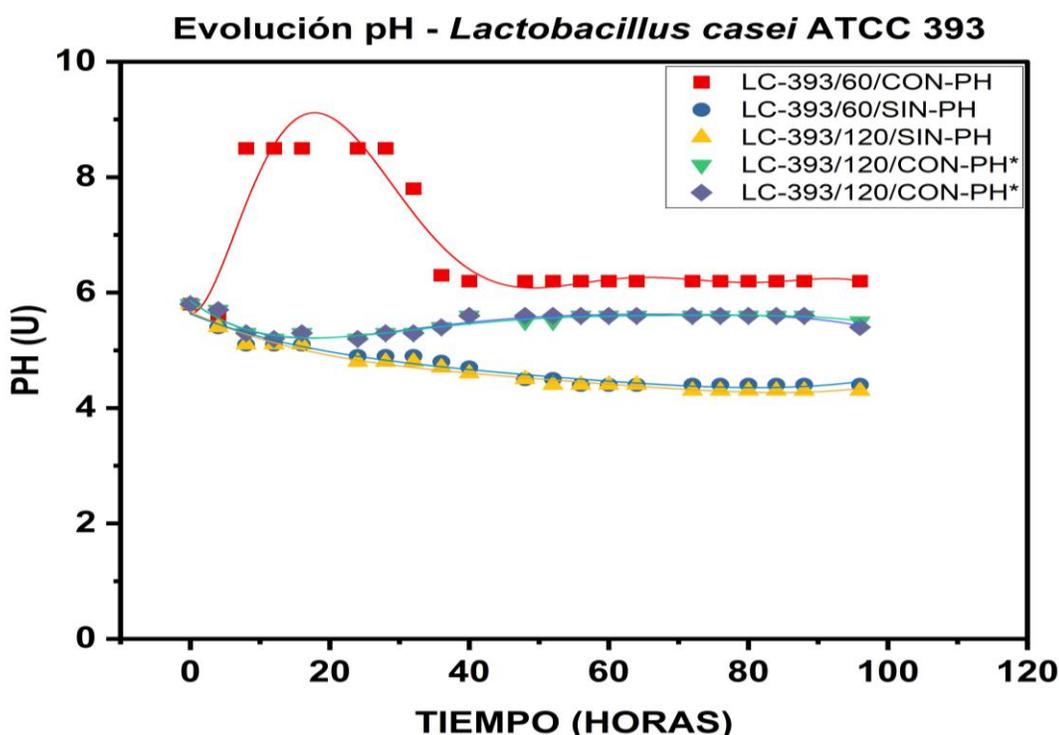


**Figura 31.** Evolución de pH en medio con y sin control, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando *B. coagulans* ATCC 7050

Lo observado en este trabajo coincide con información reportada por autores como Poudel et al., (2016) quienes mencionan un pH óptimo entre 5.0 y 9.0, para la producción de ácido láctico usando microorganismos del género *Bacillus*, dado que estos presentan alta sensibilidad tanto a valores ácido (<5.0) como a valores alcalinos (>9.0). Así mismo, autores como Cubas-Cano et al., (2020) mencionan que la mayoría de las bacterias lácticas son tolerantes al ácido y son capaces de crecer cuando el ácido láctico se acumula en el medio, sin embargo, una exposición prolongada a la forma protonada de este compuesto puede afectar a su metabolismo, resultado en algunos casos en la muerte celular. Por lo tanto, recomiendan el uso de agentes neutralizantes. Por ejemplo, autores como Abdel-Rahman et al., (2021) estudiaron el uso eficiente de azúcares mixtos derivados de biomasa para la producción de ácido láctico por *Bacillus coagulans* Azu-10, proponiendo trabajar bajo condiciones óptimas como un pH del medio ajustado a 7.0 usando una solución de HCl 5N y otra de NaOH 5N. Considerando lo reportado, las condiciones usadas en este trabajo se consideraron adecuadas ya que se trabajó a un pH de  $6.0 \pm 0.5$  ajustándolo con una solución de NaOH 2M.

Se realizó también el seguimiento a la evolución del pH en medio modelo rico en azúcares con y sin control, con concentraciones de 60 y 120 g/L de glucosa usando una cepa de *Lactobacillus casei* ATCC 393. En la Figura 32 se puede observar que los medios modelo a los cuales se les realizó un ajuste mediante la adición de NaOH, presentan un mínimo aumento en el valor de pH, manteniéndose entre 6 y 7 unidades. así mismo se puede observar un experimento el cual se encuentra fuera de los límites deseados, y esto ocurrió por una variación excesivamente brusca de pH al momento de la adición del agente neutralizante, sin embargo, se dejó seguir para comprobar al finalizar el proceso si es que pudo sobrevivir a condiciones tan extremas de alcalinidad. Por otro lado, los medios a los cuales no se les ajustó el pH presentaron una tendencia mínima de decaimiento en las curvas, lo cual era esperado dado que al estar en el proceso de fermentación se crea una acidificación natural del medio. No obstante, el decaimiento no fue muy sutil, considerando que se inició en un pH cercano a 6 y terminando cercano a 4.55, indicando una disminución de 1.5 unidades de pH

aproximadamente. El mayor cambio en pH se establece durante las primeras 20 horas del proceso.

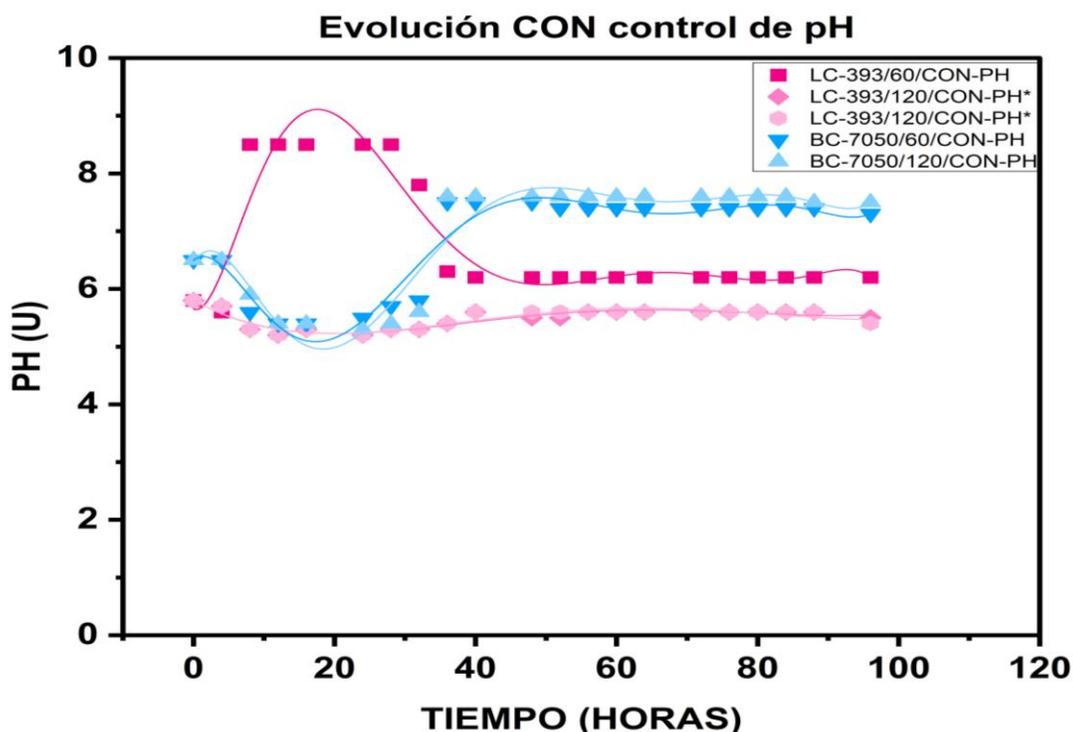


**Figura 32.** Evolución de pH en medio con y sin control, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando *B. coagulans* ATCC 7050

Autores como Gubelt et al., (2020) han reportado que una gran cantidad de bacterias del género *Lactobacillus* presentan una buena capacidad de resistencia a entornos ácidos, logrando trabajar hasta en un valor de pH de 5.0. En este sentido, el rendimiento del crecimiento microbiano a valores de pH de 4 y 6, es un parámetro importante para estudiar, considerando que la reducción de pH puede aumentar la cantidad de ácido láctico protonado, así como también puede afectar al crecimiento microbiano debido a los posibles efectos tóxicos de los protones presentes. Del mismo modo, los resultados de la investigación realizada presentan relación con los de Thakur et al., (2019) quienes mencionaron el uso de *Lactobacillus casei* en la producción de ácido L-láctico usando residuos agroindustriales económicos como fuente de nitrógeno. En su estudio buscaron controlar las condiciones de operación con el

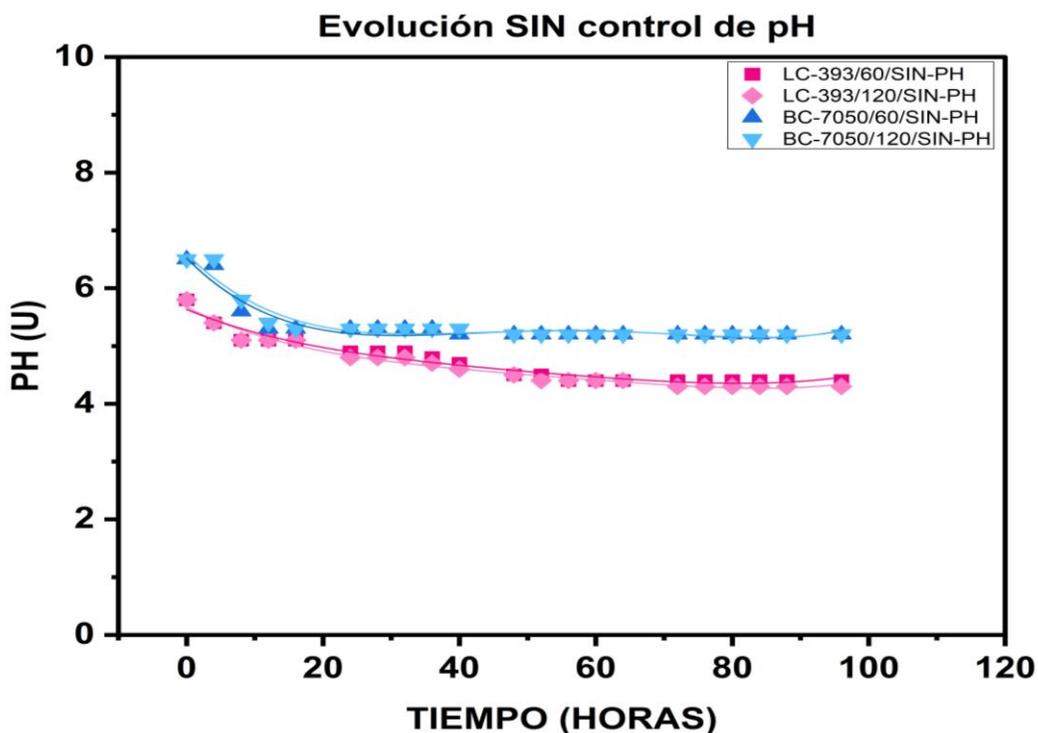
objetivo de tener las óptimas para un mejor rendimiento del ácido láctico, por lo tanto, las condiciones propuestas fueron pH de 7.0, incubación a 37 °C y agitación a 150 rpm. Considerando lo reportado, las condiciones usadas en este trabajo se consideraron adecuadas ya que se trabajó a un pH de  $6.0 \pm 0.5$  ajustándolo con una solución de NaOH 2M.

A continuación, la Figura 33 muestra la comparación de la evolución de pH para *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, en medios modelo ricos en azúcares con control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa. Se observa que la bacteria del género *Lactobacillus casei* ATCC 393 presentó un mejor ajuste de pH, puesto que muestra una mayor capacidad para mantener el pH del medio en condiciones óptimas para su metabolismo (5.5-6.5), a pesar de la acidificación propia del medio. Sin embargo, también se observa que un experimento con *Lactobacillus* fue el que más se basificó, esto por un error experimental, llevándolo hasta un pH de casi 9.0 unidades, aunque después de un periodo de adaptación y evolución de alrededor de 15 horas el microorganismo tuvo la capacidad de regresar a un pH óptimo de 6.0, lo cual indica que tiene una buena tolerancia a los cambios de pH, siendo esto un parámetro importante a considerar, pues abarca un intervalo más amplio de operación. Por otra parte, el ajuste en *Bacillus coagulans* ATCC 7050 no se desarrolló de la mejor manera, provocando un aumento considerable del pH deseado, es decir, se esperaba mantenerlo entre 5.5 y 6.5, y en este caso subió cercano a 8.0. lo cual indica una menor tolerancia a la acidificación, provocando una afectación en su metabolismo. También se observa que la concentración inicial de sustrato no afecta al pH, puesto que tanto para los medios con 60 g/L y 120 g/L de glucosa la evolución de pH es muy similar entre sí. Lo anterior refleja la relación entre la concentración de sustrato y pH donde al acumularse el ácido láctico producido en el medio se liberan protones lo que provoca una disminución del pH en el medio.



**Figura 33.** Comparación de la evolución de pH para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393, en medio con control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa

Por otra parte, en la Figura 34 muestra la comparación de la evolución de pH para *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, en medios modelo ricos en azúcares sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa. Se observa que tanto las bacterias del género *Lactobacillus* como las del género *Bacillus* tienen una curva de decaimiento muy similar, es decir, la acidificación propia del medio de desarrolla casi de igual manera, ya que también se observa que la mayor baja de pH se da entre las primeras 20 horas para ambos microorganismos. Para el *L. casei* 393 el valor de pH disminuye de aproximadamente 6 hasta 4.5 mientras que para *B. coagulans* ATCC 7050 va desde 6.5 hasta 4.5, es decir 1.5 y 2.0 unidades de pH respectivamente. Se observa que la concentración inicial de sustrato no presenta una relación directa con la disminución de pH, puesto que tanto para los medios con 60 g/L y 120 g/L de glucosa la evolución de pH es muy similar entre sí.



**Figura 34.** Comparación de la evolución de pH para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393, en medio sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa

- Cuantificación de carga microbiana de los inóculos y curvas de crecimiento

Para la cuantificación de la carga microbiana del inóculo, así como de las muestras para los puntos en las curvas de crecimiento, se empleó la técnica antes descrita de Miles & Misra. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las placas, se realizó el conteo usando un cuentacolonia, siguiendo los parámetros que indica la NOM-092-SSA1-1994 para elegir las diluciones y estimar una cantidad real de colonias por dilución. Para el inóculo, se esperaba una carga microbiana entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL, cifra recomendada en fermentaciones lácticas por autores como Nalawade et al., (2020). Los resultados de la cuantificación del inóculo son los mismos para cada género de bacterias (dado que se prepararon en un mismo momento para realizar a la par los experimento) como se observa en la Tabla 12, para *Bacillus coagulans* ATCC

7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393. Los valores se presentan en UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra) y en logaritmo base 10 (log).

**Tabla 12.** Carga microbiana inóculos microorganismos usados en pruebas final

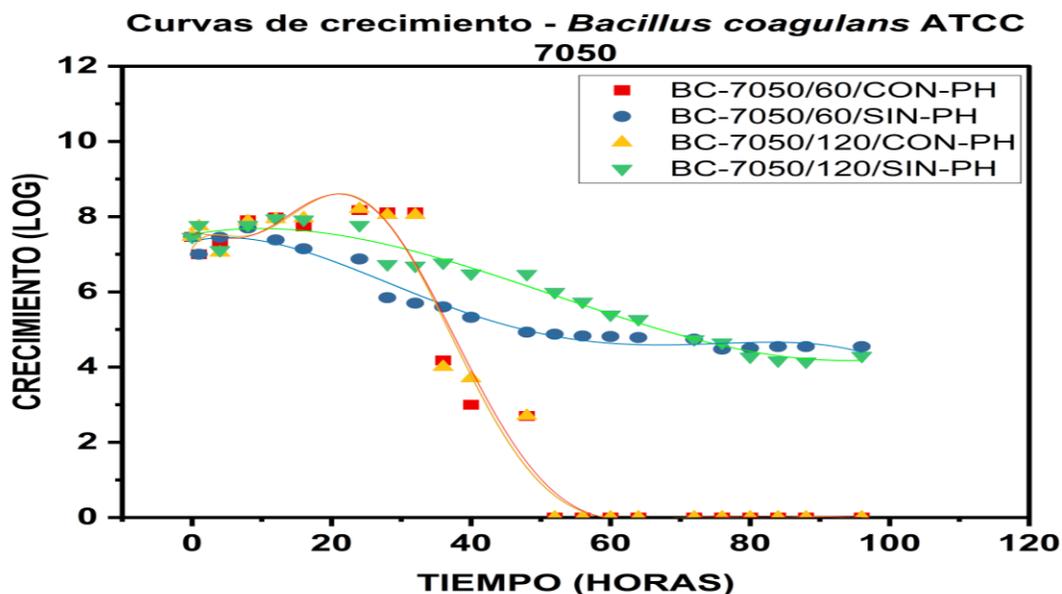
Microorganismo	Carga microbiana inóculo	
	UFC/mL	Log
<b>BC-7050/60/CON-PH</b>	29x10 <sup>6</sup>	7.46
<b>BC-7050/60/SIN-PH</b>	29x10 <sup>6</sup>	7.46
<b>BC-7050/120/CON-PH</b>	29x10 <sup>6</sup>	7.46
<b>BC-7050/120/SIN-PH</b>	29x10 <sup>6</sup>	7.46
<b>LC-393/60/CON-PH</b>	11x10 <sup>8</sup>	9.04
<b>LC-393/60/SIN-PH</b>	11x10 <sup>8</sup>	9.04
<b>LC-393/120/CON-PH*</b>	11x10 <sup>8</sup>	9.04
<b>LC-393/120/CON-PH*</b>	11x10 <sup>8</sup>	9.04
<b>LC-393/120/SIN-PH</b>	11x10 <sup>8</sup>	9.04

Fuente: Elaboración propia

Como se observa, la carga microbiana de los inóculos se encuentra dentro del intervalo óptimo para poder usarse en un proceso de fermentación, proporcionando un grado de seguridad respecto al funcionamiento del microorganismo en un medio de fermentación (Nalawade et al., 2020).

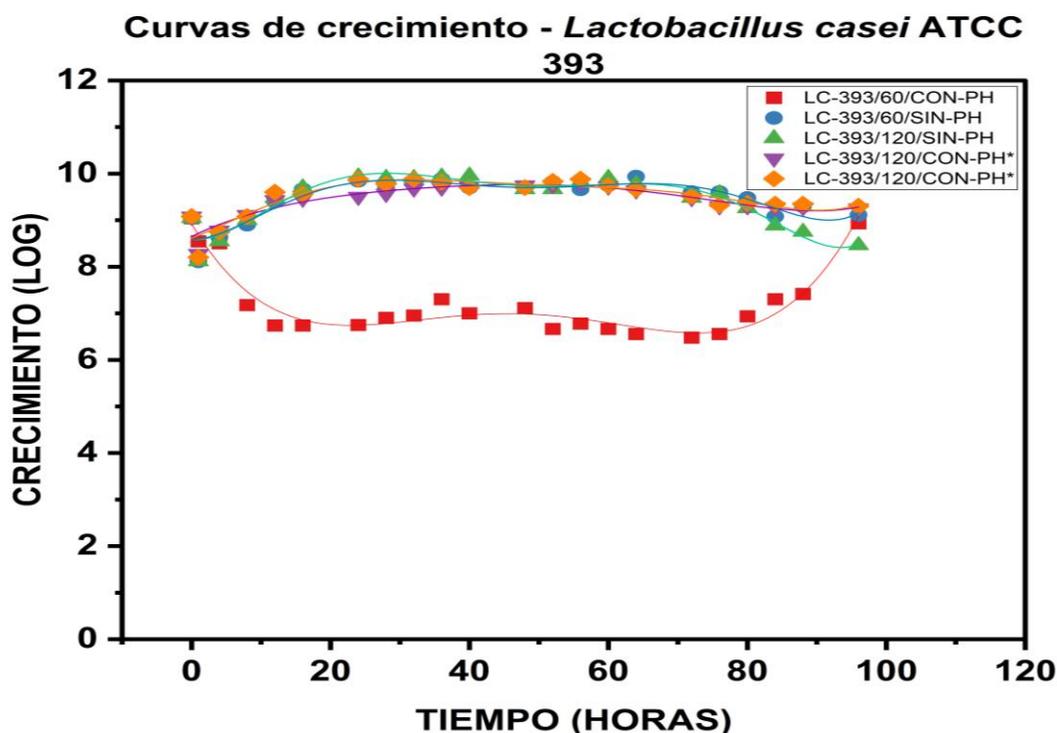
A continuación, se presentan las curvas de crecimiento para *Bacillus coagulans* ATCC 7050. En la Figura 35 se muestran las curvas de crecimiento en medio modelo con y sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa. Se observa que el comportamiento en las curvas es de decaimiento para los medios modelo con control de pH y son muy similares entre sí, sin embargo, presentan una fase de muerte muy temprana en el proceso, dado que es a partir de las 24 horas aproximadamente

cuando es evidente la fase de muerte. Esto puede relacionarse con el hecho de que se presentó un aumento considerable del pH deseado, es decir, se esperaba mantenerlo entre 5.5 y 6.5, y en este caso subió cercano a 8.0, hecho que se hizo evidente justo después del tiempo 20, por lo tanto, el aumento en el pH y la muerte celular se relacionan directamente, lo que enfatiza la cuestión de que el adecuado ajuste de pH es indispensable para poder mantener vivos a los microorganismos. En este sentido, el método óptimo de ajuste de pH es el automatizado en un biorreactor, no obstante, en esta investigación no se disponía de tal equipo lo que generó que el ajuste se hiciera de forma manual. Por otro lado, en los medios sin ajuste de pH se observa un comportamiento de ligero decaimiento en las curvas, lo cual es esperado considerando que el medio presenta una acidificación natural, así como la presencia del metabolito formado, lo que ocasiona estrés celular, el cual transcurrido el tiempo puede afectar a las células como lo mencionan Cubas-Cano et al., (2020). También fue evidente que la concentración de azúcares en el medio de fermentación para este estudio no tiene una influencia directa en el crecimiento de las células, pues independientemente de la concentración usada los datos mostraron comportamientos similares.



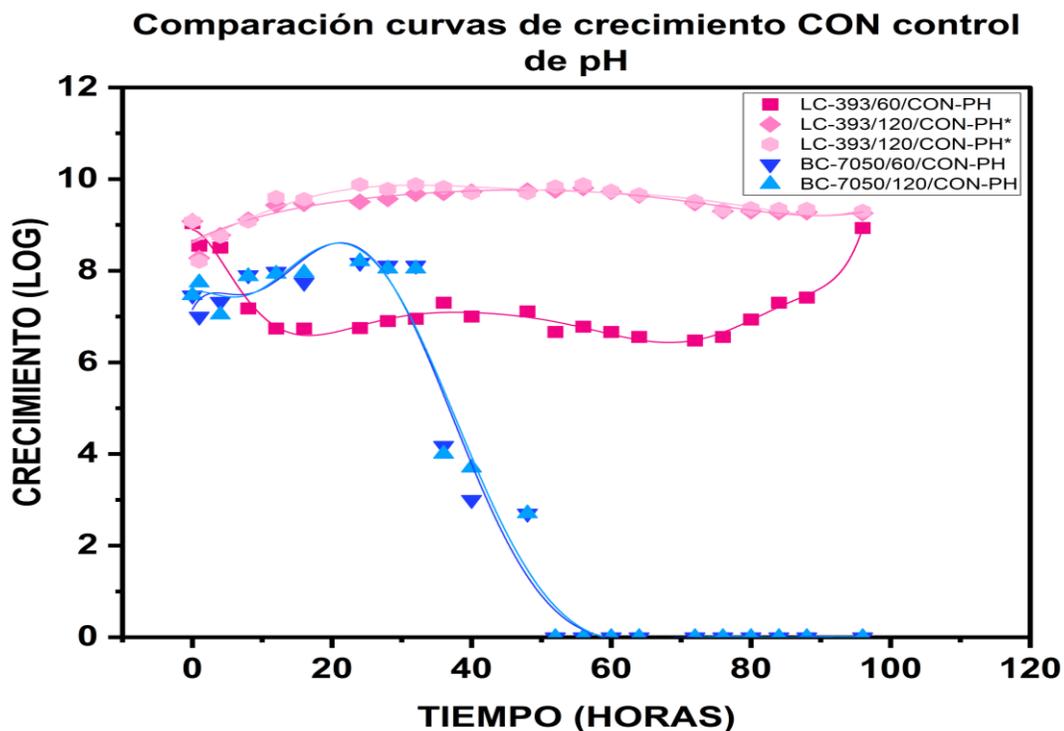
**Figura 35.** Curva de crecimiento en medio con y sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando *B. coagulans* ATCC 7050

De igual forma, se analizaron las curvas de crecimiento para *Lactobacillus casei* ATCC 393 en medios modelo ricos en azúcares con y sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa. Se observa en la Figura 36 que el comportamiento en las curvas es ligeramente exponencial con tendencia más hacia un comportamiento estacionario, con una fase de muerte apenas haciéndose visible. Durante las primeras 20 horas es cuando se logra observar un mínimo crecimiento celular para seguir con un estado de estacionario prolongado, el cual se hizo presente durante casi todo el proceso de fermentación. Se observa también que un experimento sale completamente de lo esperado, y ese experimento corresponde a los medios con control de pH, por lo tanto, esto se debió a un problema con dicho control lo que provocó un aumento en el pH del medio, generando un medio no apto para la supervivencia del microorganismo. Además, se puede observar que la concentración de sustrato en el medio de fermentación no es un factor que afecte directamente al crecimiento celular.



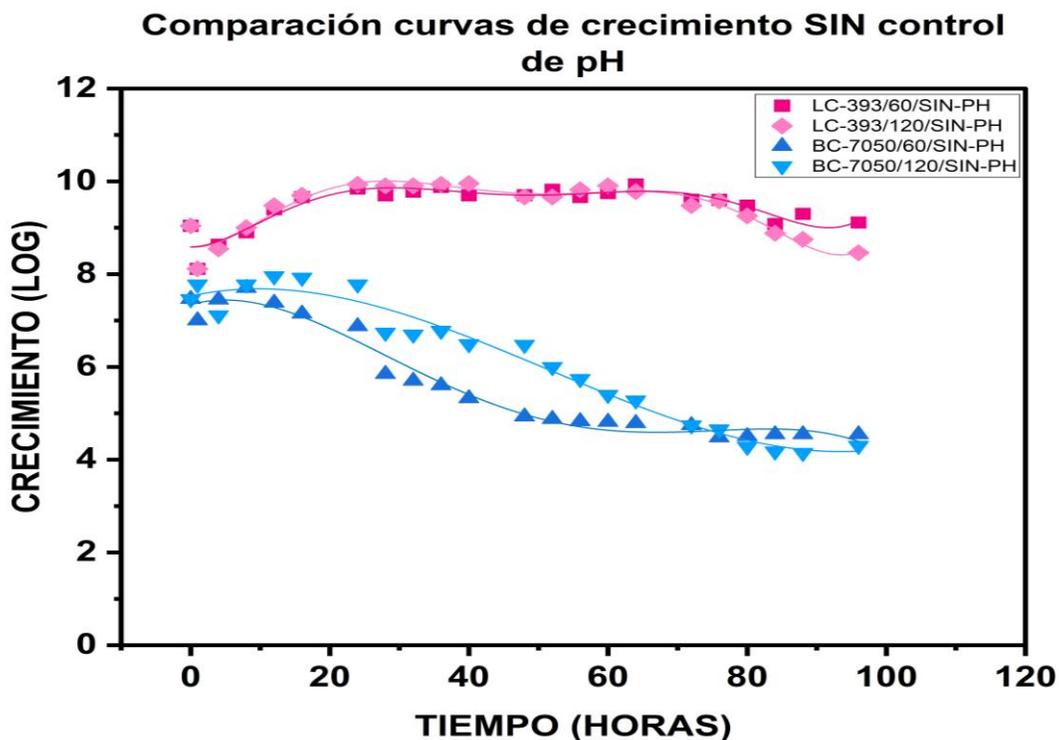
**Figura 36.** Curva de crecimiento en medio con y sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa, usando *L. casei* ATCC 393

A continuación, se presentan las gráficas de comparación del comportamiento de las curvas de crecimiento para *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, en medio con y sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa. La Figura 37 muestra la comparación en medios modelo ricos en azúcares con control de pH, donde se observa que *Lactobacillus* tuvo una mejor adaptación al medio permitiéndole mantenerse con células viables para el proceso de fermentación, lo que se relaciona al hecho que el ajuste de pH fue más favorable para este género. Contrariamente a esto, *Bacillus* demostró ser un género más sensible a los cambios de pH, así como una no tan sencilla adaptación al medio de fermentación, lo que provocó la muerte del microorganismo transcurridas solo pocas horas de iniciada la fermentación. Este decaimiento celular también puede estar relacionado con la carga inicial del inóculo, considerando que para *Bacillus* se tenía una concentración de  $10^6$  mientras para *Lactobacillus* fue  $10^8$ , lo cual representa dos ciclos logarítmicos menos. La relación de la carga microbiana inicial del inóculo y las curvas de crecimiento durante la fermentación se puede explicar tomando en cuenta que al tener una baja carga en el inóculo el tiempo de adaptación de la bacteria es mayor, y se puede propiciar un mal aprovechamiento del sustrato lo que a su vez puede generar que se autoinhiba el crecimiento microbiano.



**Figura 37.** Comparación de las curvas de crecimiento para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393, en medio con control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa

Un comportamiento casi idéntico al observado en las curvas comparativas en medios modelo ricos en azúcares con control se presentó en la comparación del comportamiento de las curvas de crecimiento en medios sin control de pH, como se muestra en la Figura 38. Lo anterior reafirma el hecho de que *Lactobacillus* tuvo una mejor adaptación al medio permitiéndole mantenerse con células viables para el proceso de fermentación, mientras que *Bacillus* demostró más dificultades para establecerse en el medio, no obstante, se observa que en los medios sin control *Bacillus* logra sobrevivir, aunque con una menor cantidad de células vivas, lo que indica que para el caso de este microorganismo lo más conveniente es mantenerlo con el pH natural del medio.



**Figura 38.** Comparación de las curvas de crecimiento para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393, en medio sin control de pH, con concentración de 60 y 120 g/L de glucosa

Estos resultados pueden ser verificados con información reportada por autores como Rawoof et al., (2021) quienes explican factores que pueden afectar la fermentación láctica y por ende la relación que existe con los microorganismos utilizados en el proceso. Dentro de los factores que destacan se encuentra primeramente el pH, el cual debe ser mantenido entre 5.0 y 7.0; la temperatura es también un aspecto importante para el crecimiento celular, y para microorganismos mesofílicos como las bacterias el intervalo ideal se encuentra entre 25 y 40 °C; así como el tamaño del inóculo que generalmente debe estar entre el 5 y 10% relación volumen; y otro factor a considerar son los nutrientes requeridos para cada tipo de microorganismos, como puede ser la adición de minerales y vitaminas. Por otra parte, existe una relación directa y crítica entre la falta de crecimiento de la biomasa, la viabilidad celular y la proporción de sustrato (fuente de carbono) y fuente de nitrógeno

en un medio de fermentación. Esta relación es fundamental para evaluar si hay limitaciones nutricionales que afecten el metabolismo microbiano, especialmente en fermentaciones con bacterias ácido-lácticas. En este sentido, si hay falta de crecimiento y baja viabilidad, se sospecha un ambiente tóxico o muy limitante, el cual puede deberse a una limitación de nutrientes, inhibición por acumulación de productos o estrés ambiental; mientras que la relación carbono:nitrógeno es clave para mantener el equilibrio entre biomasa y producción de metabolitos, pues ayuda a activar rutas metabólicas eficientes, dado que un exceso de carbono con poco nitrógeno puede disparar rutas fermentativas pero limitar el crecimiento celular. Por lo tanto, el nitrógeno es esencial para síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y cofactores enzimáticos, y un déficit de nitrógeno limita la capacidad de la célula para dividirse, aunque tenga energía (glucosa), mientras que en condiciones limitantes de nitrógeno, el carbono se canaliza a rutas fermentativas más que a la biosíntesis, lo cual puede aumentar producción de ácido láctico pero reducir biomasa, en cambio, si hay exceso de nitrógeno pero poco carbono, la célula no tiene energía suficiente para proliferar (Derman et al., 2024; Zhang et al., 2025).

De acuerdo con lo anterior, la relación átomo equivalente de carbono:nitrógeno (C:N) ideal en medios de fermentación con bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* y bacterias tipo *Bacillus* suele depender del objetivo (crecimiento celular vs. producción de metabolito) y de las fuentes de nutrientes, pero se puede estimar con base en la estequiometría celular general y composición de los medios. Para bacterias lácticas y *Bacillus*, el rango óptimo de relación molar C:N se sitúa entre 20:1 y 10:1 (átomos de carbono por átomo de nitrógeno), dependiendo del equilibrio entre producción de biomasa y producto (Barboza et al., 2025).

- Biomasa final

La determinación de la biomasa final en un medio de fermentación se realizó para estimar si los microorganismos presentaban crecimiento celular y, por tanto, evaluar el rendimiento y eficiencia del proceso. Sin embargo, al no haber realizado un

seguimiento continuo de la formación de biomasa durante la fermentación, solo se obtuvo el valor final de biomasa, por lo cual no fue posible realizar una evaluación completa del rendimiento y eficiencia del proceso. No obstante, los valores del peso seco final de biomasa presente en los medios, permitió realizar una estimación aproximada del comportamiento de crecimiento celular de los microorganismos.

De acuerdo con los datos de la Tabla 13 se puede observar que los pesos para el *Bacillus coagulans* ATCC 7050 se encuentran en un intervalo entre 0.59 y 0.6 gramos de biomasa por mililitro de medio, mientras que los pesos para el *Lactobacillus casei* ATCC 7050 se encuentran en un intervalo entre 0.44 y 0.64 gramos de biomasa por mililitro. Estos resultados pueden mostrar la presencia de una fase estacionaria de las células, sin necesariamente presentar una fase de crecimiento exponencial. Este comportamiento también podría ser entendido con el hecho que el inóculo fue crecido en un medio de cultivo propio para el microorganismo el cual le aportaba todos los nutrientes necesarios, mientras que el medio modelo era más simple, solo proporcionando una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno sin la adición de algunos nutrientes como vitaminas o sales. Aunado a esto, el comportamiento en peso seco de la biomasa también pudo verse afectado por la adición del NaOH a los medios modelo con control, ya que se puede observar en la tabla que aquellos medios controlados presentan una ligera disminución en peso de biomasa respecto de aquellos sin control, y tal comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que la solución alcalina podría ser agresiva para las células, impidiendo su correcto desarrollo.

**Tabla 13.** *Peso seco biomasa final en pruebas finales de fermentación*

<b>Sistema</b>	<b>Peso seco biomasa (g/mL)</b>
<b>BC-7050/60/CON-PH</b>	0.5954
<b>BC-7050/60/SIN-PH</b>	0.6636
<b>BC-7050/120/CON-PH</b>	0.6038
<b>BC-7050/120/SIN-PH</b>	0.6146
<b>LC-393/60/CON-PH</b>	0.6478
<b>LC-393/60/SIN-PH</b>	0.4936
<b>LC-393/120/CON-PH</b>	0.5512
<b>LC-393/120/SIN-PH</b>	0.5398
<b>LC-393/120/SIN-PH</b>	0.4498

Fuente: Elaboración propia

Por lo tanto, los resultados de esta investigación tienen relación con lo mencionado por Singhvi et al., (2018) quienes reportan que usualmente se requiere la adición de agentes neutralizante para mantener el pH del medio y proteger a las células microbiana. Convencionalmente, se añade  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o  $\text{CaCO}_3$  para neutralizar el medio de fermentación, sin embargo, la liberación del ácido láctico de su sal de calcio requiere un tratamiento ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), lo que genera sulfato de calcio como subproducto residual. Por lo tanto, se han planteado otras formas de neutralizar el medio y es mediante el uso de otros agentes neutralizantes, como  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_3\text{OH}$  y  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Sin embargo, afectan el crecimiento microbiano, dada la formación de lactato de amonio la causa estrés osmótico en las células microbianas, lo que disminuye los niveles de producción de ácido láctico y genera un gran impacto en el crecimiento celular. Con base en los resultados presentados y analizando la información reportada, se puede concluir que es posible que a los microorganismos les cuesta adaptarse al medio modelo de fermentación dada la falta de algunos nutrientes como fuente de nitrógeno,

pero más relevante, que la adición de NaOH aunado al hecho de que el medio tiene  $\text{CaCO}_3$ , puede ser nociva para las células bacterianas, generando condiciones de estrés donde no puedan crecer con facilidad, por lo que se podría trabajar es establecer la cantidad óptima de  $\text{CaCO}_3$  y NaOH si es que se decidiera a seguir utilizando estos compuestos como agentes estabilizantes de pH.

- Cuantificación de glucosa y ácido láctico

A continuación, se presentan las tablas con los valores obtenidos en la cuantificación de ácido láctico producido, y en la cuantificación de glucosa residual en medios de fermentación ricos en azúcares, es decir, la glucosa que no fue consumida en el medio de fermentación, valor que servirá para realizar cálculos posteriores de glucosa consumida, la cual corresponderá al valor de la glucosa inicial menos el valor de la glucosa residual cuantificada mediante HPLC. Respecto a la producción de ácido láctico, se observa en la Tabla 14 que el valor máximo obtenido fue de 36.02 g/L de ácido láctico con un rendimiento de 0.61 g/g usando *Bacillus coagulans* ATCC 7050, bajo condiciones de no control de pH y con una concentración de glucosa de 120 g/L, no obstante, existe otro valor de 33.96 g/L de ácido láctico con un rendimiento de 0.61 g/g producido por el mismo microorganismo, bajo la misma condición de no control de pH, pero con una concentración de glucosa de 60 g/L. Por lo tanto, es posible concluir que la concentración es un factor relevante para considerar, pues el incremento de la concentración de glucosa no va relacionado directamente con el rendimiento en producción de ácido láctico, dado que se puede ver que aun con el doble de concentración ambos medios de fermentación tuvieron una producción y rendimiento casi igual de ácido láctico. En términos de optimización, no sería rentable usar una gran cantidad de sustrato si el rendimiento no es el adecuado. De esta forma, se establecen las mejores condiciones de fermentación utilizando *Bacillus coagulans* ATCC 7050 en un medio de fermentación con 60 g/L de glucosa y sin ajuste de pH.

Por otra parte, la Tabla 14 señala un valor obtenido de producción de ácido láctico de 56.45 g/L de ácido láctico con un rendimiento de 0.99 g/g usando

*Lactobacillus casei* ATCC 393, bajo condiciones de no control de pH y con una concentración de glucosa de 60 g/L, no obstante, existe otro valor de 66.39 g/L de ácido láctico producido con un rendimiento de 0.58 g/g para el mismo microorganismo, bajo la condición de control de pH, pero con una concentración de glucosa de 120 g/L. Por lo tanto, es posible concluir que la concentración es un factor relevante para considerar, pues el incremento de la concentración de glucosa no va relacionado directamente con el rendimiento en producción de ácido láctico, dado que se puede ver que aun con el doble de concentración ambos medios de fermentación tuvieron una producción casi igual de ácido láctico. En términos de optimización, no sería rentable usar una gran cantidad de sustrato si el rendimiento no es el adecuado. De esta forma, se establecen las mejores condiciones de fermentación utilizando *Lactobacillus casei* ATCC 393 en un medio de fermentación con 60 g/L de glucosa y sin ajuste de pH. Los datos de rendimiento de ácido láctico se encuentran en la Tabla 16.

**Tabla 14.** Cuantificación de ácido láctico producido

<b>Sistema</b>	<b>Ácido láctico (g/L)</b>
<b>BC-7050/60/CON-PH</b>	16.4
<b>BC-7050/60/SIN-PH</b>	33.96
<b>BC-7050/120/CON-PH</b>	24.75
<b>BC-7050/120/SIN-PH</b>	36.02
<b>LC-393/60/CON-PH</b>	15.18
<b>LC-393/60/SIN-PH</b>	56.45
<b>LC-393/120/CON-PH</b>	56.65
<b>LC-393/120/SIN-PH</b>	66.39

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de esta investigación concuerdan también con los datos reportados por P. Xu et al., (2013) quienes realizaron una fermentación en lote para la producción de ácido L-láctico usando dos cepas, un *Bacillus coagulans* XZL4 DSM No. 23183 y otro *Bacillus coagulans* XZL9 DSM No. 2314, a diferentes concentraciones de glucosa, 55, 85 y 150 g/L, en un medio con glucosa, extracto de levadura y carbonato de calcio. Para *Bacillus coagulans* XZL4 DSM No. 23183 el mejor valor se obtuvo con una concentración de 85 g/L de glucosa, una producción de ácido láctico de 83 g/L y un rendimiento del 0.98 g/g. Así mismo, para *Bacillus coagulans* XZL4 DSM No. 23183 el mejor valor se obtuvo con la misma concentración, pero con una producción de ácido láctico de 81 g/L y un rendimiento del 0.95 g/g. Así mismo, los resultados obtenidos se compararon con los de Paniagua-García et al., (2024), quienes estudiaron la optimización de la producción de ácido láctico a partir de pulpa de manzana y tomate utilizando la bacteria *Heyndrickxia coagulans* DSM 2314 (previamente conocida como *Bacillus coagulans* DSM 2314). El medio estuvo compuesto por los hidrolizados más el extracto de levadura como fuente de nitrógeno, y manteniendo un pH de 7.0. Los resultados reportados fueron de 40.72 g/L de producción de ácido láctico con un rendimiento de 0.86 g/g. Por lo tanto, considerando los valores reportados se puede concluir que dado el hecho que en esta investigación se trabajó con medios modelo, la producción y rendimiento de ácido láctico es competitivo frente a información ya reportada.

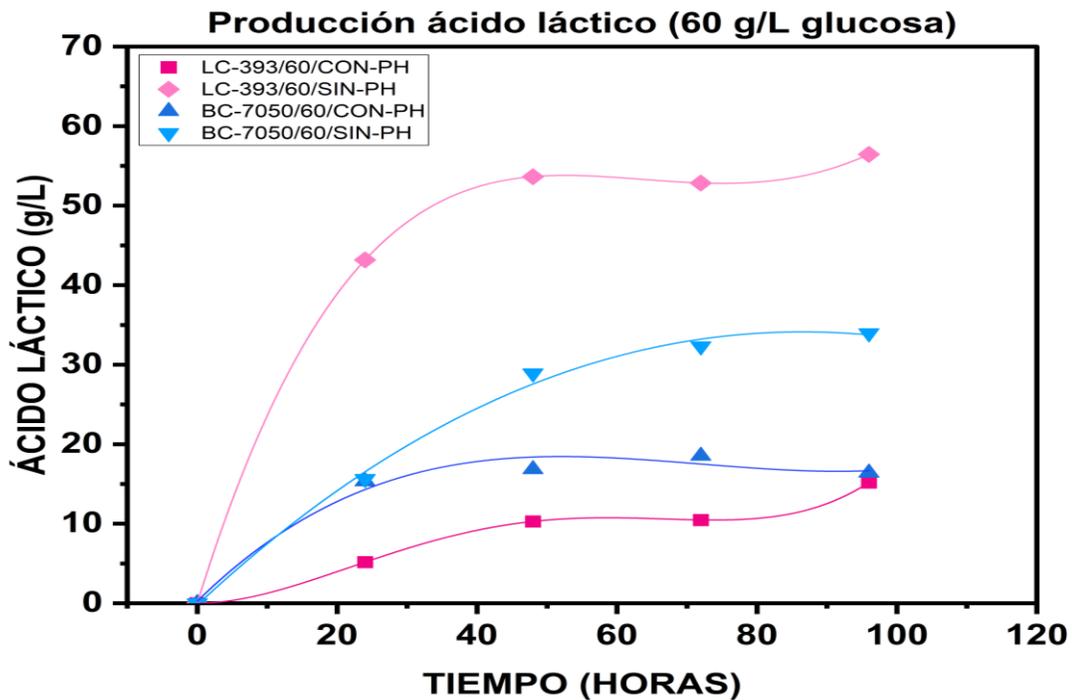
Como se expone en la Tabla 15 se observa la glucosa residual final presente en el medio de fermentación, haciendo evidente que, de manera general, los medios con *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Bacillus coagulans* ATCC 7070 presentan un comportamiento poco común pues es difícil establecer si la concentración de azúcares y el pH influye directamente en la tasa de transformación de glucosa. En algunos casos se observa que la cantidad de glucosa presente es mínima, lo que indica que casi toda se transforma como para el medio con *L. casei* ATCC 393 con 60 g/L de glucosa y sin ajuste de pH; casi similar con *B. coagulans* ATCC 7050 para las mismas condiciones. No obstante, se presentan casos donde la glucosa residual tiene un valor grande de 68.04, como el caso del medio con *B. coagulans*, 120 g/L de glucosa y control de pH.

**Tabla 15.** Cuantificación de la glucosa residual en el medio de fermentación

<b>Sistema</b>	<b>Glucosa residual (g/L)</b>
<b>BC-7050/60/CON-PH</b>	21.82
<b>BC-7050/60/SIN-PH</b>	6.09
<b>BC-7050/120/CON-PH</b>	68.04
<b>BC-7050/120/SIN-PH</b>	61.05
<b>LC-393/60/CON-PH</b>	30.81
<b>LC-393/60/SIN-PH</b>	2.76
<b>LC-393/120/CON-PH</b>	36.13
<b>LC-393/120/SIN-PH</b>	51.37

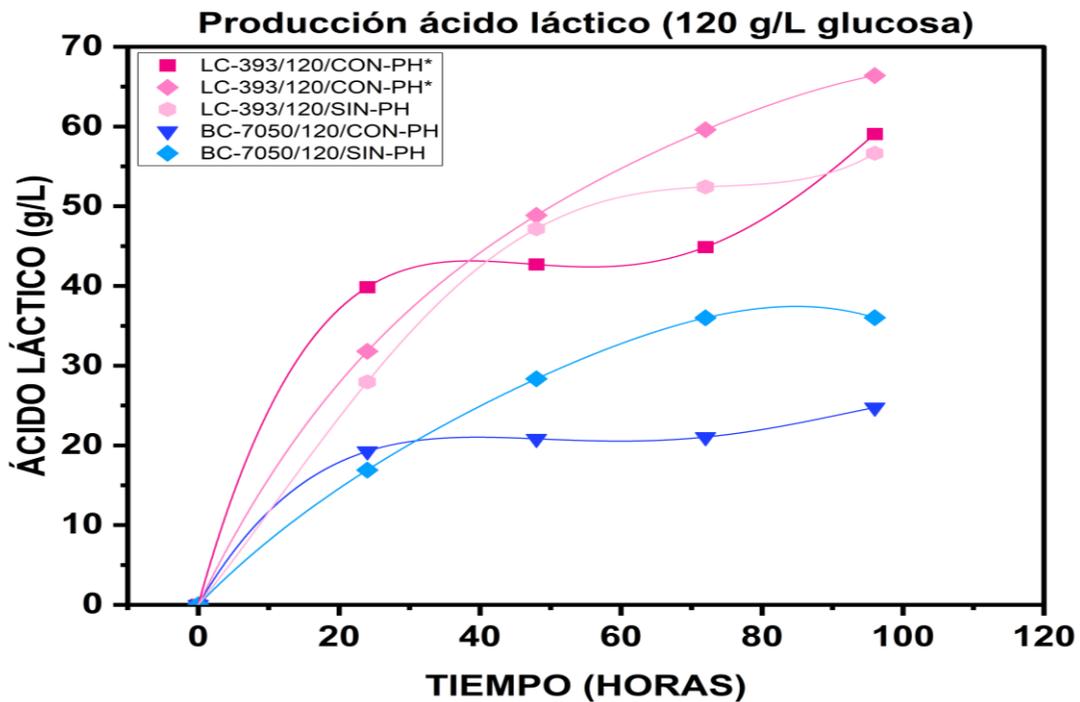
Fuente: Elaboración propia

Con el propósito de visualizar la evolución en la producción de ácido láctico, así como el consumo de glucosa, a continuación, se presentan los siguientes gráficos. En la Figura 39 se observa la evolución y una comparación de la producción de ácido láctico en medio modelo con 60 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393. La evolución en la producción de ácido láctico en los medios tiende a una forma casi exponencial, con una fase de crecimiento para luego tender a estabilizarse, lo cual es congruente con las formas típicas de curvas de crecimiento que presentan las bacterias presentes en la fermentación. Se observa que el medio con la evolución más notoria fue con *L.casei* ATCC 393 y sin ajuste de pH; mientras que para *B. coagulans* ATCC 7050 el medio con la mayor evolución fue también el que no tenía ajuste de pH. Sin embargo, realizando una comparación entre microorganismo resulta evidente que la mayor producción de ácido láctico se lleva a cabo con el *Lactobacillus*.



**Figura 39.** Evolución y comparación de la producción de ácido láctico en medio con 60 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393

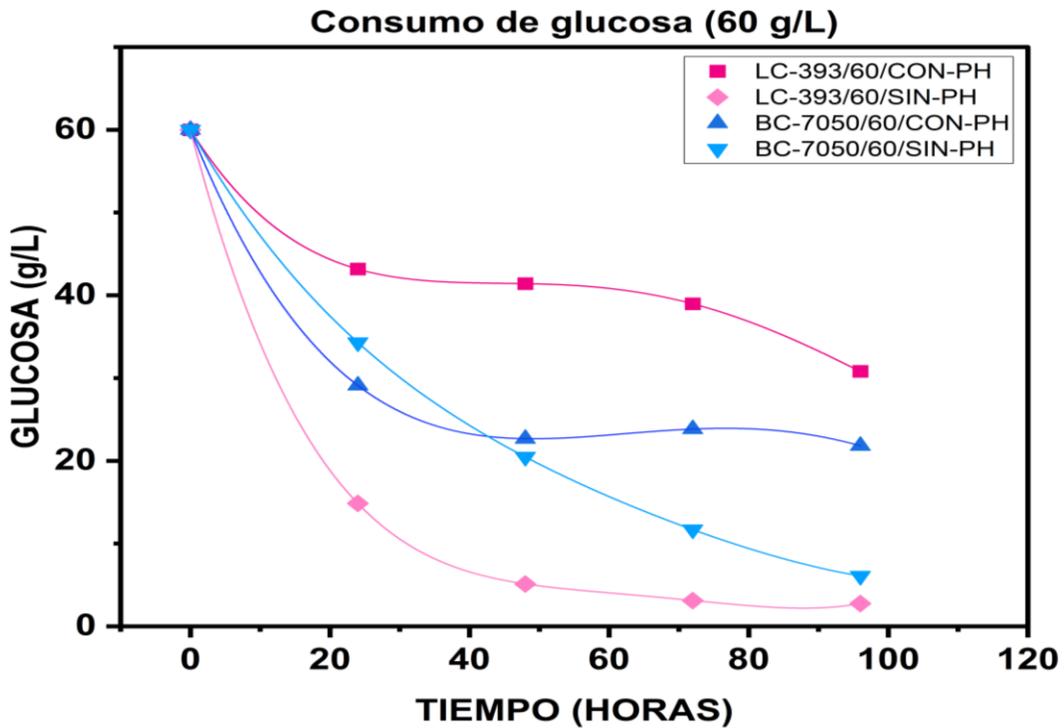
De igual manera, en la Figura 40 se observa una evolución muy similar a la descrita anteriormente, es decir, la producción de ácido láctico en los medios modelo tiende a una forma casi exponencial, con una fase de crecimiento para luego tender a estabilizarse. Sin embargo, en este caso se muestra la evolución una comparación de la producción de ácido láctico en medio con 120 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393. El medio con la mayor evolución usando *B. coagulans* ATCC 7050 fue con una concentración de glucosa de 120 g/L en medio sin control de pH, mientras que para *L. casei* ATCC 393 fue el medio con 120 g/L de glucosa y sin control de pH. Por lo tanto, haciendo una comparación entre microorganismos fue evidente una mayor evolución con el *Lactobacillus*.



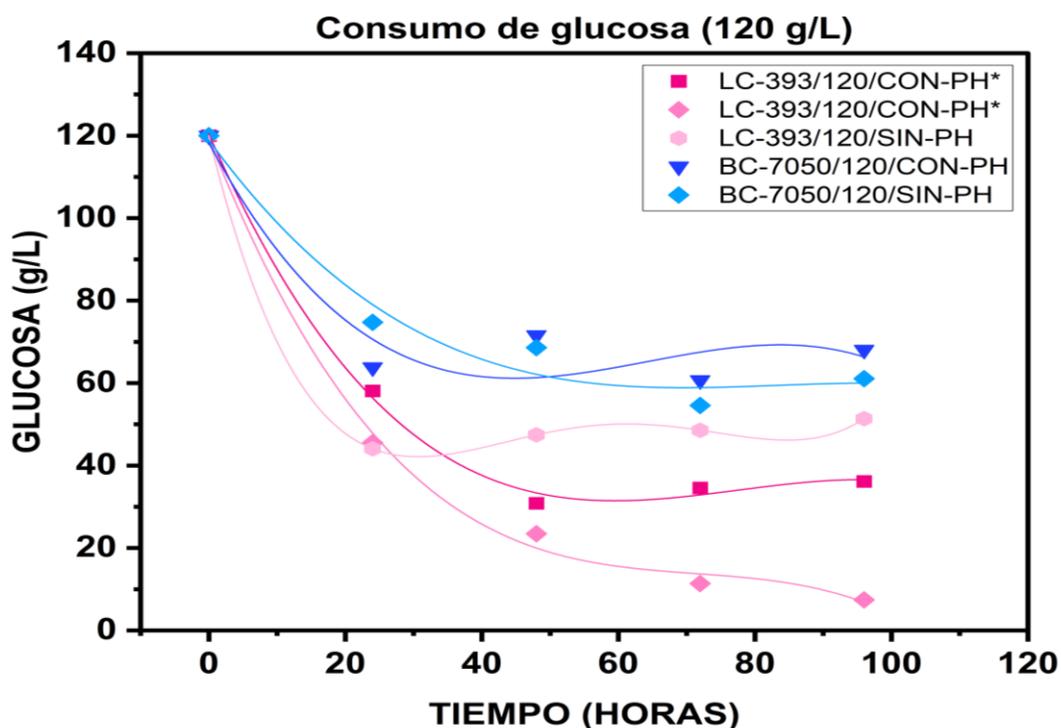
**Figura 40.** Evolución y comparación de la producción de ácido láctico en medio con 120 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393

No obstante, es importante señalar que ambas bacterias son homofermentativas, es decir, que convierten la glucosa principalmente en ácido láctico, con muy pocas cantidades de otros compuestos secundarios, dado que su vía principal es la Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). La EMP es la principal ruta utilizada por bacterias homofermentativas para transformar glucosa en ácido láctico a través de un proceso anaerobio llamado fermentación homoláctica, la cual inicia con el proceso de glucólisis donde la glucosa se transforma en 2 moléculas de piruvato y se generan simultáneamente ATP y NADH, para dar paso a la fermentación láctica donde cada molécula de piruvato se reduce a ácido láctico mediante la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), generando a su vez NAD<sup>+</sup> a partir de la reducción de NADH para completar el ciclo redox (Cubas-Cano et al., 2020).

Por otra parte, el consumo de glucosa durante la fermentación se muestra en la Figura 41 y Figura 42. El comportamiento se presenta en forma de decaimiento, lo cual es de esperarse dado que glucosa es la fuente de carbono del medio, la cual es esencial como alimento para las bacterias presentes. Todos los medios presentan el mismo comportamiento, siendo *Lactobacillus casei* ATCC 393 el microorganismo que consume más el sustrato independiente de un control o no de pH.



**Figura 41.** Evolución y comparación del consumo de glucosa (sustrato) en medio con 60 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393



**Figura 42.** Evolución y comparación del consumo de glucosa (sustrato) en medio con 120 g/L de glucosa, con y sin control de pH, para *B. coagulans* ATCC 7050 y *L. casei* ATCC 393

- Tasa de transformación de glucosa ( $x_G$ ) y rendimiento de ácido láctico ( $Y_{AL/G}$ )

La tasa de transformación de glucosa y el rendimiento de ácido láctico son parámetros indispensables para el control y optimización de procesos fermentativos, y así evaluar la eficiencia del proceso biotecnológico. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Tasa de transformación de glucosa ( $x_G$ ) y rendimiento de ácido láctico ( $Y_{AL/G}$ ) en pruebas finales

<b>Sistema</b>	<b><math>Y_{AL/G}</math> (mol/mol)</b>	<b><math>x_G</math> (%)</b>
<b>BC-7050/60/CON-PH</b>	0.43	63.63
<b>BC-7050/60/SIN-PH</b>	0.63	89.95
<b>BC-7050/120/CON-PH</b>	0.48	43.40
<b>BC-7050/120/SIN-PH</b>	0.61	49.12
<b>LC-393/60/CON-PH</b>	0.52	48.65
<b>LC-393/60/SIN-PH</b>	0.99	95.40
<b>LC-393/120/CON-PH</b>	0.68	93.81
<b>LC-393/120/SIN-PH</b>	0.97	57.19

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de rendimiento de ácido láctico y tasa de transformación de glucosa para los experimentos con *Bacillus coagulans* ATCC 7050 muestran que, en el caso de los medios con control de pH, los valores fueron de  $Y_{A/G} = 0.43$  gramos de ácido láctico producido por gramo de glucosa consumido con  $x_A = 63.63\%$ , esto en un medio con 60 g/L de glucosa, mientras que para el medio con 120 g/L de glucosa los valores fueron de  $Y_{A/G} = 0.47$  g/g y  $x_A = 43.4\%$ . Los valores obtenidos muestran que, ajustando el pH con NaOH, *Bacillus coagulans* ATCC 7050 puede tener rendimientos relativamente bajos independiente de la concentración de sustrato utilizado en el medio, mientras que la tasa de transformación de glucosa si difiere dependiendo de la cantidad de sustrato y esto se observa dado que a una concentración de 60 g/L la tasa de transformación es mayor respecto a utilizar una concentración más elevada de sustrato. Por otra parte, los valores obtenidos para los medios sin ajuste de pH usando

el mismo microorganismo, presentan ligeras mejoras respecto a los medios con ajuste de pH, y se presentan tanto en el rendimiento de ácido láctico como en la tasa de transformación de glucosa, con valores de  $Y_{A/G} = 0.62$  g/g con  $x_A = 89.95\%$  esto en un medio con 60 g/L de glucosa, mientras que para el medio con 120 g/L de glucosa los valores fueron de  $Y_{A/G} = 0.61$  y  $x_A = 49.12\%$ . Ambos valores muestran un comportamiento similar en el rendimiento de ácido láctico independiente de la concentración de sustrato, sin embargo, en la tasa de transformación de glucosa se presenta un comportamiento muy diferente, donde a una menor concentración de sustrato este se transforma casi todo, por el contrario, al aumentar la concentración de sustrato la tasa de transformación se reduce casi a la mitad, es decir, de 89% a 49%. De manera general, comparando todos los resultados para *Bacillus coagulans* ATCC 7050, se puede concluir que, respecto al rendimiento de ácido láctico, el pH presenta una ligera influencia, siendo mejor para este caso, un proceso donde no se controle el pH con el objetivo de obtener mejores rendimientos; mientras en el caso de la concentración de sustrato esta tampoco tiene una influencia significativa en el rendimiento final. Por el contrario, para el mismo microorganismo se puede concluir que respecto a la tasa de transformación de glucosa, la concentración de sustrato es un parámetro de relevancia, pues a menor concentración de sustrato mayor es la tasa de transformación, y viceversa, a mayor concentración de sustrato menor tasa de transformación; el pH no presentó una gran influencia, pues se demostró que la tasa de transformación de glucosa no variaba mucho con respecto al pH, sino más bien era dependiente de la concentración de sustrato independiente del valor de pH en el medio. Los resultados de esta investigación concuerdan también con las observaciones realizadas por Schroedter et al., (2021) quienes estudiaron la producción de ácido L-láctico utilizando dos sustratos, un hidrolizado de celulosa proveniente de paja de centeno; y otro un digestado fibroso de una planta de biogas anaeróbica operada con maíz energético. Respecto a la fracción de celulosa de la biomasa, se realizaron experimentos de hidrólisis enzimática y fermentación, comparando distintos enfoques de sacarificación y fermentación. Para ello, se utilizó una cepa de *B. coagulans* 14-300. Los resultados mostraron que la concentración

inicial de sustrato (glucosa y xilosa) fue de 39.0 y 3.1 g/L en el medio de fermentación, y después de 18 horas de fermentación el rendimiento de ácido láctico fue de 0.84 g/g, sin embargo, la máxima concentración de ácido láctico (21.1 g/L) fue medida después de 24 horas de fermentación, aunque con un rendimiento igual al mencionado. Así mismo, los resultados obtenidos se compararon con los de Chen et al., (2019) quienes reportaron el uso de *Bacillus coagulans* LA-15-2 para producir ácido L-láctico a partir de los azúcares obtenidos de la paja de arroz. Se realizaron procesos de hidrólisis enzimática para extraer los azúcares monómeros, obteniendo en concentración total de azúcares de 35g/L. La fermentación se llevó a cabo en lote y en lote alimentado, siendo mejor el proceso de lote alimentado, alcanzando una concentración de 92.5 g/L de ácido láctico después de 46 horas de fermentación, con un rendimiento de ácido láctico de 0.58 g/g. Analizando los datos reportados, se pudo concluir que, para el caso de la investigación aquí realizada, se tienen altos rendimientos de ácido láctico, dado que se obtuvo un valor de 0.62 g/g en uno de los experimentos realizados, el cual es competitivo respecto a lo reportado.

Los resultados de rendimiento de ácido láctico y tasa de transformación de glucosa para los experimentos con *Lactobacillus casei* ATCC 393 muestran que, en el caso de los medios con control de pH, los valores fueron de  $Y_{A/G} = 0.52$  gramos de ácido láctico producido por gramo de glucosa consumido con  $x_A = 48.65\%$ , esto en un medio con 60 g/L de glucosa, mientras que para el medio con 120 g/L de glucosa los valores fueron de  $Y_{A/G} = 0.59$  g/g y  $x_A = 93.81\%$ . Los valores obtenidos muestran que, ajustando el pH con NaOH, *Lactobacillus casei* ATCC 393 puede tener rendimientos aceptables independiente de la concentración de sustrato utilizado en el medio, mientras que la tasa de transformación de glucosa si difiere dependiendo de la cantidad sustrato y esto se puede observar puesto que a una concentración de 120 g/L la tasa de transformación es mayor respecto a utilizar una concentración más baja de sustrato. Por otra parte, los valores obtenidos para los medios sin ajuste de pH usando el mismo microorganismo, presentan mejoras muy considerables respecto a los medios con ajuste de pH, y se presentan tanto en el rendimiento de ácido láctico

como en la tasa de transformación de glucosa; con valores de  $Y_{A/G} = 0.99$  g/g con  $x_A = 95.40\%$  esto en un medio con 60 g/L de glucosa, mientras que para el medio con 120 g/L de glucosa los valores fueron de  $Y_{A/G} = 0.83$  y  $x_A = 57.19\%$ . Ambos valores muestran un comportamiento parecido en el rendimiento de ácido láctico independiente de la concentración de sustrato, así como también en la tasa de transformación de glucosa. De manera general, comparando todos los resultados para *Lactobacillus casei* ATCC 393, se puede resumir que, respecto al rendimiento de ácido láctico, el pH presenta una fuerte influencia sobre el proceso, siendo mucho mejor para este caso, un proceso donde no se controle el pH con el objetivo de obtener mejores rendimientos; mientras en el caso de la concentración de sustrato esta tampoco tiene una influencia significativa en el rendimiento final. Por el contrario, para el mismo microorganismo se puede concluir que respecto a la tasa de transformación de glucosa, la concentración de sustrato es un parámetro de relevancia, pues a menor concentración de sustrato mayor es la tasa de transformación, y viceversa, a mayor concentración de sustrato menor tasa de transformación; así mismo, el pH presentó una influencia importante, pues se demostró que la tasa de transformación de glucosa si variaba respecto a un control o no de pH, siendo mejor para este caso no realizar un control. Los resultados de esta investigación tienen relación con los de Thakur et al., (2019) quienes reportaron la producción de ácido L-láctico utilizando licor de maceración de maíz como fuente de nitrógeno y melazas como sustrato, en una fermentación tipo lote mediante el uso de *Lactobacillus casei* MTCC1423 inmovilizado. El contenido del medio de fermentación constaba de 175 g/L de azúcar y se complementó con el licor de maíz además de tener carbonato de calcio. Los resultados arrojaron una producción máxima de ácido láctico de 128 g/L de ácido láctico y un rendimiento de 0.92 g/g tras 72 horas de incubación a una temperatura de 37 °C y un pH de 7.0. Resultados similares han sido reportados por Costa et al., (2024) quienes trabajaron en la optimización de la producción de ácido láctico a partir de dos medios, un medio de fermentación el cual contenía residuos de frutas, y otro medio compuesto de suero de queso, ambos suplementados con licor de maceración de maíz como fuente de nitrógeno. Se utilizó una cepa *Lactobacillus casei* DSMZ 20001. La

fermentación se realizó tipo batch durante 96 horas realizando cinco siglos seguidos para optimizar el uso de los residuos, y los resultados mostraron una concentración máxima de ácido láctico de 180.56 g/L después de todos los ciclos, con un rendimiento de 0.88 g/g. De esta manera, una vez analizados los datos se pudo concluir que, para el caso de la investigación aquí realizada, se tienen buenos rendimientos de ácido láctico, dado que se obtuvo un valor de 0.99 g/g en uno de los experimentos realizados, el cual es competitivo respecto a lo reportado, aunque es importante considerar que en este caso son medios más simples.

Considerando los resultados anteriores, a continuación, en la Tabla 17 se muestra la matriz del diseño experimental con las respuestas obtenidas, es decir, el rendimiento de ácido láctico ( $Y_1$ ) y la tasa de transformación de glucosa ( $Y_2$ ).

**Tabla 17. Matriz del diseño experimental**

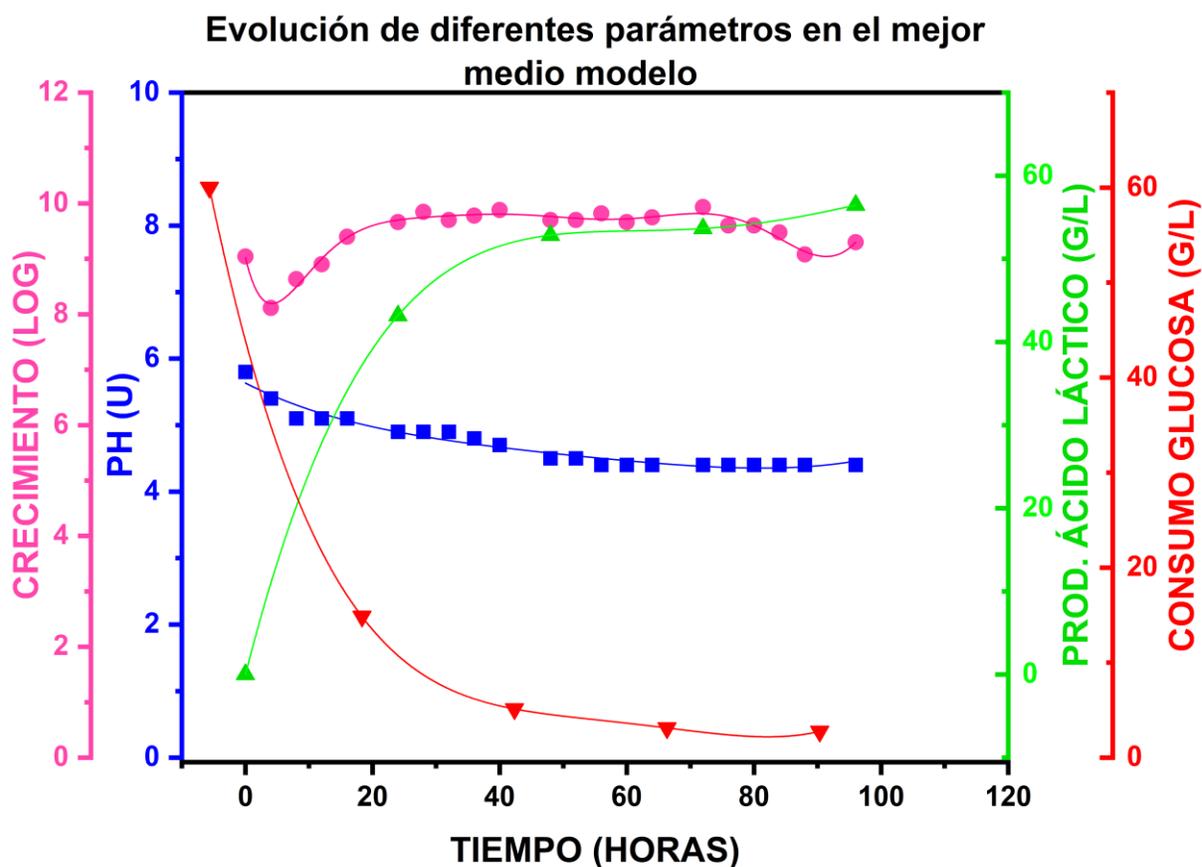
Experimento	Variables			Respuestas	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
1	60 g/L	<i>Bacillus</i>	Con	0.43	63.63
		<i>coagulans</i> ATCC 7050	control de pH		
2	60 g/L	<i>Bacillus</i>	Sin	0.63	89.95
		<i>coagulans</i> ATCC 7050	control de pH		
3	120 g/L	<i>Bacillus</i>	Con	0.48	43.40
		<i>coagulans</i> ATCC 7050	control de pH		
4	120 g/L	<i>Bacillus</i>	Sin	0.61	49.12
		<i>coagulans</i> ATCC 7050	control de pH		
5	60 g/L	<i>Lactobacillus</i>	Con	0.52	48.65
		<i>casei</i> ATCC 393	control de pH		
6	60 g/L	<i>Lactobacillus</i>	Sin	0.99	95.40
		<i>casei</i> ATCC 393	control de pH		
7	120 g/L	<i>Lactobacillus</i>	Con	0.68	93.81
		<i>casei</i> ATCC 393	control de pH		
8	120 g/L	<i>Lactobacillus</i>	Sin	0.97	57.19
		<i>casei</i> ATCC 393	control de pH		

Fuente: Elaboración propia

Considerando los datos obtenidos a partir de los experimentos realizados de acuerdo con el diseño de experimentos, se analizó el experimento con los mejores resultados para las variables de respuesta (rendimiento de ácido láctico y tasa de transformación de glucosa). El sistema con los mejores resultados fue utilizando una concentración inicial de glucosa de 60 g/L con ausencia de control de pH y con una cepa de *Lactobacillus casei* ATCC 7050, el cual mostró un rendimiento de ácido láctico  $Y_{AL/G}$  de 0.99 moles de ácido láctico producido por cada mol de glucosa consumido, así como una tasa de transformación de glucosa del 95.40%. En este sentido, en la Figura 43 se muestra la evolución respecto al tiempo de cuatro parámetros clave durante la fermentación láctica, el crecimiento microbiano, el pH del medio, la producción de ácido láctico y el consumo de glucosa, en un sistema modelo rico en azúcares. En el eje x se representa el tiempo en horas, durante un periodo de 96 horas, permitiendo observar la evolución dinámica del proceso fermentativo. En el eje y izquierdo secundario (rosa claro) se muestra el crecimiento microbiano, expresado en concentración celular (LOG). La curva correspondiente indica un crecimiento moderado durante las primeras 10 horas, seguido de una fase estacionaria prolongada que se mantiene relativamente estable hasta las 90 horas. Esto sugiere que la biomasa alcanza su máximo en etapas tempranas del proceso y se estabiliza, posiblemente debido a limitaciones de nutrientes, acumulación de productos inhibitorios o condiciones del medio. Así mismo, el eje y izquierdo principal (azul) representa el pH del medio. La curva de pH correspondiente muestra una caída pronunciada de aproximadamente 6.0 a 4.5 en las primeras 24 horas, seguida de una disminución más lenta que tiende a estabilizarse cerca de 4.0. Esta caída es típica en fermentaciones lácticas, donde se produce ácido láctico como metabolito principal, acidificando el medio. Por otra parte, en el eje y derecho primario (verde) se indica la producción de ácido láctico en gramos por litro (g/L). La curva correspondiente muestra un aumento constante durante las primeras 40 horas, alcanzando un valor cercano a los 60 g/L, tras lo cual la producción se estabiliza. Esta tendencia muestra relación con el patrón de consumo de glucosa y la estabilización del crecimiento celular. Por último, el eje y derecho secundario (rojo) representa el consumo de glucosa, también en g/L, con una

curva correspondiente que desciende desde un valor inicial (60 g/L) hasta casi cero en las primeras 40 horas. Este patrón indica una utilización eficiente del sustrato durante la fase de crecimiento activo y producción metabólica.

Con base en lo anterior, la figura evidencia que la existencia de una relación inversa entre el pH del medio y la producción de ácido láctico, es decir, a medida que aumenta la concentración de ácido láctico el pH disminuye, durante las primeras 40 horas de la fermentación. Aunado a lo anterior, se evidencia que el consumo de glucosa está directamente relacionado con la producción de ácido láctico y el crecimiento microbiano en las primeras 24 horas, y esto sugiere un metabolismo activo en el que la glucosa es convertida principalmente en ácido láctico, propio de un proceso homofermentativo. así mismo, la fase estacionaria del crecimiento ocurre cuando la glucosa se ha casi agotado, el pH es bajo y la producción de ácido láctico ha alcanzado un punto máximo, lo cual puede indicar una condición de inhibición por producto o por pH. En conclusión, la figura muestra un proceso fermentativo eficiente en cuanto al aprovechamiento de glucosa y la producción de ácido láctico, con un patrón típico de fermentación láctica: crecimiento microbiano inicial, acidificación del medio, y posterior estabilización de los parámetros una vez agotado el sustrato. Esta información es fundamental para optimizar las condiciones del medio y el control del proceso en fermentaciones.



**Figura 43.** Evolución de pH, crecimiento microbiano, producción de ácido láctico y consumo de glucosa para un sistema modelo rico en azúcares con 60 g/L de glucosa, sin control de pH con *Lactobacillus casei* ATCC 393.

### 7.7 Análisis estadístico para pruebas finales de fermentación en medios modelo

Con las mediciones de las variables y las respuestas obtenidas al ejecutar el diseño de experimentos, se planteó realizar un análisis estadístico a través de una varianza (ANOVA), con el objetivo de analizar la influencia de las variables independientes consideradas en el experimento. Para el análisis estadístico se utilizó el software Modde Versión 7.0 Umetrics.

En este sentido, se realizó un diseño factorial completo con tres variables ( $x_1, x_2, x_3$ ). Este modelo se utilizó para hacer un análisis estadístico en función del rendimiento de ácido láctico ( $Y_{a/g}$ ). Al no observarse influencia significativa de  $x_1$ , sobre la respuesta  $Y_{a/g}$ , se propuso un modelo reducido, el cual se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y = a_0 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{23}x_2x_3$$

Esto es una práctica común en modelos factoriales cuando una variable no muestra efecto significativo: se simplifica el modelo para enfocarse en los factores que realmente contribuyen.

En la Tabla 18 se muestran los datos obtenidos del análisis del modelo de respuesta  $Y_{a/g}$ . A partir del ANOVA se puede observar que F de regresión es igual a 12.36, con un p-valor = 0.009, lo cual indica que el modelo en conjunto es significativo. En lo que respecta a la falta de ajuste (Lack of fit) el p-valor = 0.627 no es significativo ( $p > 0.05$ ), lo que indica que el modelo no tiene errores sistemáticos y es adecuado para describir los datos. El bajo valor de la desviación estándar residual (RSD = 0.0776) refleja un error pequeño en la escala de  $Y_{a/g}$ . Además, los resultados de  $R^2 = 0.881$  y  $R^2$  ajustado = 0.810 indican que el modelo explica el 88.1% de la variabilidad en la respuesta y confirman el buen ajuste del modelo. Finalmente, el  $Q^2 = 0.638$  indica una aceptable capacidad predictiva del modelo ( $Q^2 > 0.5$  es considerado bueno en contextos experimentales).

Así mismo, en la Tabla 19 se muestra el análisis de factores, donde se presenta una lista con los valores de los coeficientes del modelo propuesto. El análisis de los coeficientes y su significancia indica que el efecto del tipo de microorganismo ( $a_2 = \pm 0.112$ ) es estadísticamente significativo ( $p = 0.0079$ ), al igual que el control del pH ( $a_3 = \pm 0.1179$ ,  $p = 0.0064$ ). Asimismo, la interacción  $x_2x_3$  no es estadísticamente significativa ( $p \approx 0.235$ ), lo cual indica una independencia en la influencia de estas variables sobre la respuesta.

Complementando lo anterior, en la Figura 44 de coeficientes se representan visualmente los efectos estimados de cada factor o interacción sobre la variable de respuesta (rendimiento de ácido láctico). Como se observa, el eje x muestra los factores y términos de interacción del modelo, mientras que el eje y indica el valor del coeficiente estimado (efecto) en la variable de respuesta. Por ejemplo, Tip(*L. casei*) y Tip(*B. coagulans*) se refiere al tipo de cepa, C\_g se refiere a la concentración de glucosa, CON(Con) y CON(Sin) se refiere a la presencia o ausencia de control de pH, mientras que a partir de estos factores se presentan las interacciones del modelo, por ejemplo, la interacción entre el tipo de microorganismo y la concentración de glucosa (Tip\*C\_g), la interacción entre el tipo de microorganismo y el control o no de pH (Tip\*Con), y la interacción entre la concentración de glucosa y el control o no de pH (C\_g\*Con). En este sentido, las barras verdes muestran el valor estimado del coeficiente y las líneas verticales (líneas de error) presentan el intervalo de confianza, además, si la barra de error cruza el cero, indica que el efecto no es estadísticamente significativo mientras que si la barra de error no cruza el cero el efecto es significativo respecto al nivel de confianza. Considerando lo anterior, se puede establecer que el valor del coeficiente para el tipo de microorganismo muestra que este tiene un efecto estadísticamente significativo en la variable de respuesta, así como la presencia o ausencia de control de pH, mientras que la concentración de glucosa indica que no es estadísticamente significativa respecto a la variable de respuesta. así mismo, las interacciones probadas muestran que no tienen un efecto estadísticamente significativo en la variable de respuesta. En conclusión, el modelo es estadísticamente significativo y bien ajustado. Las variables  $x_2$  (tipo de bacteria) y  $x_3$  (presencia o ausencia de control de pH) tienen efectos claros sobre la respuesta  $Y_{a/g}$ . La interacción entre ambas no es significativa. Por lo tanto, un efecto estadísticamente significativo implica un impacto verdadero del factor o interacción evaluado, a su vez, un efecto no significativo sugiere que no se detectó una influencia real del factor sobre la variable de respuesta.

**Tabla 18.** Resultados del ANOVA correspondientes al análisis de diseño de experimentos propuesto

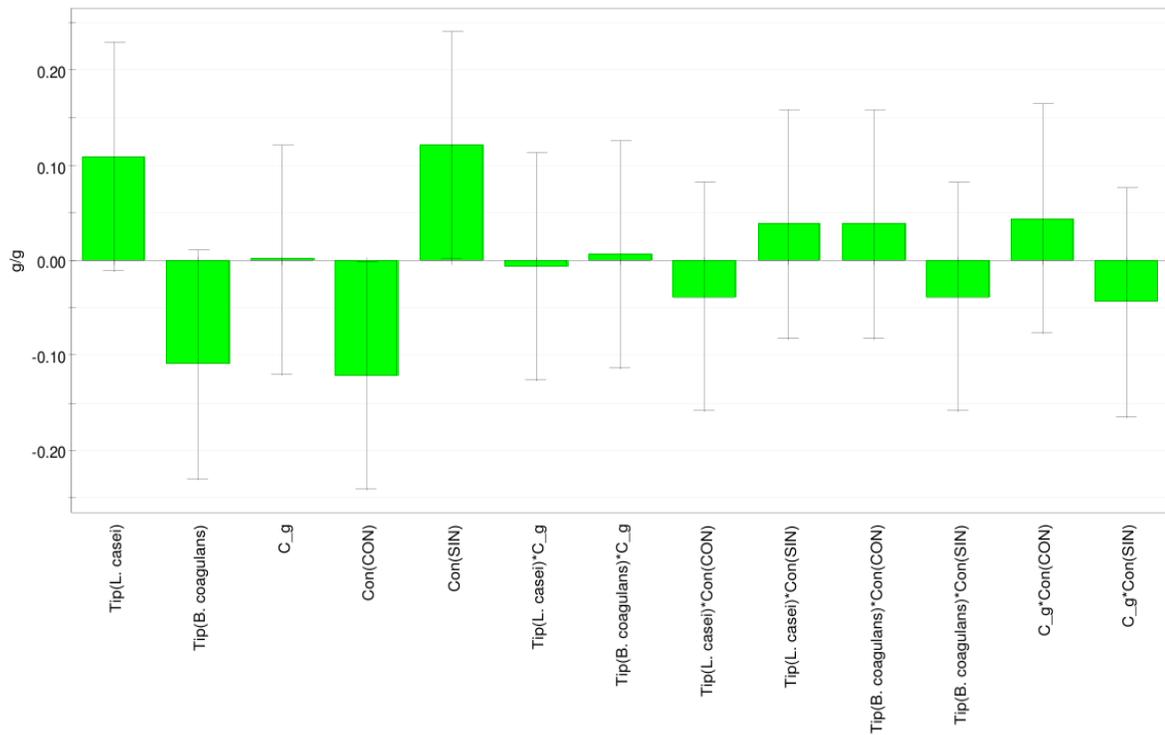
$Y_{a/g}$	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
<b>Total</b>	9	3.9398	0.437756			
<b>Constant</b>	1	3.6864	3.6864			
<b>Total Corrected</b>	8	0.253399	0.0316749			0.177974
<b>Regression</b>	3	0.223283	0.0744276	12.3565	0.009	0.272824
<b>Residual</b>	5	0.0301167	0.00602333			0.0776101
<b>Lack of Fit (Model Error)</b>	4	0.0240667	0.00601667	0.99449	0.627	0.0775672
<b>Pure Error (Replicate Error)</b>	1	0.00605	0.00605			0.0777818
N = 9			Q2 = 0.638			Cond. No. = 1.2247
DF = 5			R2 = 0.881			Y-miss = 0
			R2 Adj = 0.810			RSD = 0.0776

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 19. Lista de coeficientes del modelo propuesto**

$Y_{a/g}$	Coeff. SC	Std. Err	P	Conf. Int (±)
<b>Constant</b>	0.644583	0.0262712	2.09704e- 006	0.0675323
<b>Tip</b>	DF = 1			
<b>Tip (L. casei)</b>	0.112083	0.0262712	0.00796605	0.0675323
<b>Tip (B. coagulans)</b>	-0.112083	0.0262712	0.00796605	0.0675323
<b>Con</b>	DF = 1			
<b>Con (CON)</b>	-0.117917	0.0262712	0.00646807	0.0675323
<b>Con (SIN)</b>	0.117917	0.0262712	0.00646807	0.0675323
<b>Tip*Con</b>	DF = 1			
<b>Tip (L. casei)*Con (CON)</b>	-0.0354167	0.0262712	0.235471	0.0675323
<b>Tip (L. casei)*Con (SIN)</b>	0.0354167	0.0262712	0.235471	0.0675323
<b>Tip (B. coagulans)*Con (CON)</b>	0.0354167	0.0262712	0.235471	0.0675323
<b>Tip (B. coagulans)*Con (SIN)</b>	-0.0354167	0.0262712	0.235471	0.0675323
N = 9	Q2 = 0.638		Cond. No = 1.2247	
DF = 5	R2 = 0.881		Y-miss = 0	
	R2 ADJ = 0.810		RSD = 0.0776	
			Conf. Lev = 0.95	

Fuente: Elaboración propia



**Figura 44.** Efecto de los factores analizados para el modelo planteado en el diseño de experimentos. Tip se refiere a tipo de microorganismo utilizado (*L. casei* o *B. coagulans*); C\_g se refiere a concentración de glucosa; CON se refiere a medio con control y sin control de pH.

## 8 CONCLUSIONES

El presente trabajo logró establecer un proceso preliminar de fermentación microbiana para la producción de ácido láctico, empleando bacterias ácido-lácticas (BAL) en sistemas modelo ricos en azúcares, como base técnica para la futura valorización del bagazo de *Agave salmiana*. Se cumplieron los tres objetivos específicos planteados: la selección de cepas eficientes, la evaluación de parámetros operativos, y la validación de la viabilidad del sistema como aproximación al uso de residuos lignocelulósicos.

En primer lugar, se evaluaron cuatro cepas de BAL, seleccionando a *Bacillus coagulans* ATCC 7050 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 como las más prometedoras por su capacidad de producción de ácido láctico en sistemas modelo. La selección se basó en estudios de morfología, crecimiento, y capacidad fermentativa. En condiciones preliminares, *L. casei* ATCC 393 alcanzó una producción de 48.97 g/L con un rendimiento de 0.80 g/g, mientras que *B. coagulans* ATCC 7050 logró 39.50 g/L con un rendimiento de 0.66 g/g.

Posteriormente, mediante un diseño experimental factorial, se evaluaron los efectos del tipo de microorganismo, la concentración inicial de glucosa (60 y 120 g/L) y el control del pH (con y sin ajuste con NaOH). Los resultados indicaron que las condiciones más eficientes correspondieron a fermentaciones con *L. casei* ATCC 393, sin control de pH, y con una concentración de 60 g/L de glucosa, alcanzando una producción máxima de 56.45 g/L de ácido láctico, un rendimiento de 0.99 g/g y una tasa de conversión de glucosa del 95.40%

El análisis estadístico validó estos hallazgos, mostrando que el tipo de microorganismo ( $p = 0.0079$ ) y el control de pH ( $p = 0.0064$ ) son factores significativos en el rendimiento, con un modelo ajustado ( $R^2 = 0.881$ ).

Asimismo, se evidenció que mayores concentraciones de glucosa no implican necesariamente mayores rendimientos, lo que demuestra la importancia de optimizar la cantidad de sustrato para evitar un uso ineficiente de recursos. Por ejemplo, a 120

g/L de glucosa y control de pH, *L. casei* produjo 66.39 g/L de ácido láctico, pero con un menor rendimiento de 0.58 g/g.

En conjunto, estos resultados confirman la viabilidad técnica de utilizar sistemas modelo ricos en azúcares para simular procesos de fermentación a partir de hidrolizados de *Agave salmiana*. Las condiciones óptimas identificadas permiten sentar una base sólida para escalar el proceso hacia la valorización de residuos agroindustriales, con potencial de integración en estrategias de economía circular.

Finalmente, se concluye que este estudio constituye un avance importante en el diseño de bioprocesos sostenibles para la producción de ácido láctico, abriendo la posibilidad de reemplazar parcialmente fuentes fósiles por residuos lignocelulósicos de alto volumen, como el bagazo de agave. La continuidad de este trabajo deberá considerar ensayos con hidrolizados reales y análisis de escalabilidad.

## 9 PERSPECTIVAS

Los experimentos realizados en este trabajo de tesis corresponden a la primera etapa de un proyecto experimental amplio, el cual tiene como objetivo final la valorización de residuos agroalimentarios, en especial el bagazo de *Agave salmiana*, utilizándolo como sustrato en fermentaciones microbianas con bacterias ácido-lácticas para la producción de ácido láctico. Esta primera etapa del proyecto se enfocó en la producción de ácido láctico a partir de sistemas modelo ricos en azúcares mediante la fermentación con bacterias ácido-lácticas de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus*. En esta primera parte se han completados las fases preliminares de selección y evaluación de cepas de bacterias ácido-lácticas junto con su capacidad de producción de ácido láctico, así como la evaluación de la influencia de los parámetros de operación (pH, temperatura, tiempo y concentración inicial de sustrato) sobre la fermentación de sistemas modelo ricos en azúcares, para demostrar la viabilidad de condiciones de fermentación en sistemas modelo ricos en azúcares como base para la futura aplicación con hidrolizados de bagazo de *Agave salmiana*. Los resultados preliminares indican una alta eficiencia en el consumo de sustrato y producción de ácido láctico, con valores de rendimiento cercanos a los reportados en la literatura para medios sintéticos. No obstante, se ha identificado una posible limitación relacionada con el control del pH y la viabilidad celular en etapas prolongadas de fermentación, lo cual podría estar vinculado a la relación molar carbono:nitrógeno del medio o a la acumulación de productos inhibitorios. Este hallazgo sugiere la necesidad de realizar ajustes finos en la formulación del medio o incorporar estrategias de control automático de pH. Desde una perspectiva técnica, el proyecto se encuentra en una fase inicial con resultados sólidos que permiten avanzar hacia la optimización del proceso y validación en condiciones ampliadas.

Por lo tanto, se plantea una segunda etapa en la cual se puedan realizar ensayos adicionales con modificaciones en la fuente de nitrógeno, evaluar la cinética de crecimiento y realizar balances de masa para cuantificar el rendimiento global. Así mismo, se propone el uso de sistemas modelo con relaciones de azúcares similares a

las reportadas para los hidrolizados del bagazo de agave, esto con el objetivo de estudiar los sistemas lo más cercano a la realidad posible, considerando que los hidrolizados presentan una mezcla de distintos azúcares en diferentes proporciones, así como la presencia de otros compuestos los cuales pueden interferir en el proceso de fermentación. También se sugiere que en esta etapa se verifique el rendimiento de ácido láctico y la tasa de transformación de glucosa, para buscar las condiciones más ideales para obtener altos rendimientos. Estos pasos permitirán consolidar la base experimental y generar propuestas para el uso de los hidrolizados de bagazo de agave.

En este sentido, se plantea una tercera etapa en la cual, con base en los resultados obtenidos en las etapas previas, se puedan establecer las condiciones ideales para fermentaciones lácticas utilizando hidrolizados de bagazo de *Agave salmiana*, buscando proponer un proceso biotecnológico eficiente con altos rendimientos de producción de ácido láctico, a la vez que se realizan estudios técnicos y económicos para validar el proceso a escala laboratorio y piloto.

## 10 REFERENCIAS

- Abd Alsaheb, R. A., Aladdin, A., Zalina Othman, N., & Abd Malek, R. (2015). Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(10), 729–735. <https://www.jocpr.com/articles/lactic-acid-applications-in-pharmaceutical-and-cosmeceutical-industries.pdf>
- Abdel-Rahman, M. A., Hassan, S. E. D., Alrefaey, H. M. A., & Elsakhawy, T. (2021). Efficient co-utilization of biomass-derived mixed sugars for lactic acid production by *Bacillus coagulans* azu-10. *Fermentation*, 7(1), 28. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010028>
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 286–301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>
- 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). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Abolore, R. S., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2024). Green and sustainable pretreatment methods for cellulose extraction from lignocellulosic biomass and its applications: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 7(8). <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100396>
- Adewuyi, A. (2022). Underutilized Lignocellulosic Waste as Sources of Feedstock for Biofuel Production in Developing Countries. *Frontiers in Energy Research*, 10. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2022.741570>
- Álvarez-Chávez, J., Villamiel, M., Santos-Zea, L., & Ramírez-Jiménez, A. K. (2021). Agave By-Products: An Overview of Their Nutraceutical Value, Current

- Applications, and Processing Methods. *Polysaccharides* 2(3), 720–743. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030044>
- Alves de Oliveira, R., Schneider, R., Vaz Rossell, C. E., Maciel Filho, R., & Venus, J. (2019). Polymer grade l-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. *Bioresource Technology Reports*, 6, 26–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.02.003>
- Ameh, V. I., Ayeleru, O. O., Nomngongo, P. N., & Ramatsa, I. M. (2024). Bio-oil production from waste plant seeds biomass as pyrolytic lignocellulosic feedstock and its improvement for energy potential: A review. *Waste Management Bulletin*, 2(2), 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.03.002>
- Barboza, G., dos Santos, E. C., Teles, G. H., & Ribeiro, E. (2025). Effects of sodium acetate and carbon/nitrogen ratio on the physiology and metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 during lactic acid production. *Bioresource Technology Reports*, 31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2025.102212>
- Bautista-Espinoza, P. I., Falciano, A., Reynoso-Camacho, R., Mares-Mares, E., Amaya-Llamo, S. L., Regalado-González, C., & Di Pierro, P. (2025). Use of Agave Bagasse and *Lactococcus lactis* in Sourdough Production: Drying Effects on Bioactive Compounds. *Foods*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/foods14101748>
- Bichot, A., Lerosty, M., Radoiu, M., Méchin, V., Bernet, N., Delgenès, J. P., & García-Bernet, D. (2020). Decoupling thermal and non-thermal effects of the microwaves for lignocellulosic biomass pretreatment. *Energy Conversion and Management*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112220>
- Boonpan, A., Pivsa-Art, S., Pongswat, S., Areesirisuk, A., & Sirisangsawang, P. (2013). Separation of D, L-lactic acid by filtration process. *Energy Procedia*, 34, 898–904. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.827>
- Bothast, R. J., Nichols, N. N., & Dien, B. S. (1999). Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnology Progress*, 15(5), 867–875. <https://doi.org/10.1021/bp990087w>

- Calasso, M., & Gobbetti, M. (2011). Lactic Acid Bacteria - Lactobacillus spp.: Other Species. *Elsevier*, 3, 1507–1511. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00265-X>
- Calvo-Saad, M. J., Solís-Chaves, J. S., & Murillo-Arango, W. (2023). Suitable municipalities for biomass energy use in Colombia based on a multicriteria analysis from a sustainable development perspective. *Heliyon*, 9(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19874>
- 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 and Technology*, 30(1), 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112175>
- Chen, H., Huo, W., Wang, B., Wang, Y., Wen, H., Cai, D., Zhang, C., Wu, Y., & Qin, P. (2019). L-lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of dilute ethylenediamine pre-treated rice straw. *Industrial Crops and Products*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111749>
- Coelho, L. F., Beitel, S. M., & Contiero, J. (2019). Technological challenges and advances: From lactic acid to polylactate and copolymers. *Materials for Biomedical Engineering: Hydrogels and Polymer-based Scaffolds* (pp. 117–153). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816901-8.00005-5>
- Collard, F. X., & Blin, J. (2014). A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 594–608. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.06.013>
- Costa, S., Summa, D., Radice, M., Vertuani, S., Manfredini, S., & Tamburini, E. (2024). Lactic acid production by Lactobacillus casei using a sequence of seasonally

- available fruit wastes as sustainable carbon sources. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1447278>
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., & Tomás-Pejó, E. (2018). Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2), 290–303. <https://doi.org/10.1002/bbb.1852>
- Cubas-Cano, E., Venus, J., González-Fernández, C., & Tomás-Pejó, E. (2020). Assessment of different *Bacillus coagulans* strains for L-lactic acid production from defined media and gardening hydrolysates: Effect of lignocellulosic inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 323, 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.017>
- Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S., & Weidtmann, A. (2019). Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *GCB Bioenergy*, 11(1), 107–117. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12586>
- Datta, R., & Henry, M. (2006). Lactic acid: Recent advances in products, processes and technologies - A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(7), 1119–1129. <https://doi.org/10.1002/jctb.1486>
- Datta, R., Tsai, S.-P., Bonsignore, P., Moon, S.-H., & Frank, J. R. (1995). Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(1-2), 221–231. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)00055-4](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)00055-4)
- de França, J. O. C., da Silva Valadares, D., Paiva, M. F., Dias, S. C. L., & Dias, J. A. (2022). Polymers Based on PLA from Synthesis Using D,L-Lactic Acid (or Racemic Lactide) and Some Biomedical Applications: A Short Review. *Polymers*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/polym14122317>
- de Oliveira, P. Z., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2023). Lactic Acid Production Using Sugarcane Juice as an Alternative Substrate and Purification through Ion-Exchange Resins. *Fermentation*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/fermentation9100879>

- Deng, W., Feng, Y., Fu, J., Guo, H., Guo, Y., Han, B., Jiang, Z., Kong, L., Li, C., Liu, H., Nguyen, P. T. T., Ren, P., Wang, F., Wang, S., Wang, Y., Wang, Y., Wong, S. S., Yan, K., Yan, N., ... Zhou, H. (2023). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels. *Green Energy and Environment*, 8(1), 10–114. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2022.07.003>
- Derman, Ü. C., Erdem, A., Alemdar, F., & Türker, M. (2024). Kinetics of fermentative production of propionic acid on a range of carbon and nitrogen sources using *Acidipropionibacterium acidipropionici*. *Food Bioscience*, 57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103507>
- Díaz-Orozco, L., Moscosa Santillán, M., Delgado Portales, R. E., Rosales-Colunga, L. M., Leyva-Porras, C., & Saavedra-Leos, Z. (2025). Advances in L-Lactic Acid Production from Lignocellulose Using Genetically Modified Microbial Systems. *Polymers*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/polym17030322>
- Dusselier, M., Van Wouwe, P., Dewaele, A., Makshina, E., & Sels, B. F. (2013). Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: The role of chemocatalysis. *Energy and Environmental Science*, 6(5), 1415–1442. <https://doi.org/10.1039/c3ee00069a>
- Erdiwansyah, Gani, A., Mamat, R., Bahagia, Nizar, M., Yana, S., Mat Yasin, M. H., Muhibbuddin, & Rosdi, S. M. (2024). Prospects for renewable energy sources from biomass waste in Indonesia. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100880>
- Estrada Maya, A., & Weber, B. (2022). Biogás y bioetanol a partir de bagazo de agave sometido a explosión de vapor e hidrólisis enzimática. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 23(2), 1–10. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2022.23.2.009>
- Ewaschuk, J. B., Zello, G. A., Naylor, J. M., & Brocks, D. R. (2002). Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers. *Journal of Chromatography B*, 781(1-2), 39–56. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00500-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00500-7)

- Feoli Bonilla, M., Escobar Guarín, C., & Marín Mahecha, R. (1995). Obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 23, 18–24.
- Fonseca, F., Béal, C., & Corrieu, G. (2001). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, 43(3), 189–198. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2343>
- Fonseca, F., Marin, M., & Morris, G. J. (2006). Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6474–6482. <https://doi.org/10.1128/AEM.00998-06>
- Goldberg, R. N., Schliesser, J., Mittal, A., Decker, S. R., Santos, A. F. L. O. M., Freitas, V. L. S., Urbas, A., Lang, B. E., Heiss, C., Ribeiro Da Silva, M. D. M. C., Woodfield, B. F., Katahira, R., Wang, W., & Johnson, D. K. (2015). A thermodynamic investigation of the cellulose allomorphs: Cellulose(am), cellulose I $\beta$ (cr), cellulose II(cr), and cellulose III(cr). *Journal of Chemical Thermodynamics*, 81, 184–226. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2014.09.006>
- González-Leos, A., Bustos-Vázquez, M. G., Rodríguez-Castillejos, G. C., Vázquez-Nava, F., González-Pérez, A. L., Del Ángel-Del Ángel, A., & Rodríguez-Durán, N. (2020). *Fermentación de Lactobacillus pentosus para la producción de ácido láctico*. 5, 683–688. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume5/5/10/134.pdf>
- Gonzalez-Vara, A., Pinelli, D., Rossi, M., Fajner, D., Magelli, F., & Matteuzzi, D. (1996). Production of L(-) and D(-) Lactic Acid Isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004 in Continuous Fermentation. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*, 81(6), 548–552. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)81478-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)81478-4)
- Granget, C., Manikandan, N. A., Amulya, K., Dabros, M., Fahy, S., Kelleher, S. M., Rochfort, K. D., Gaughran, J., & Freeland, B. (2024). Brewer's spent grain as a self-sufficient feedstock for homofermentative production of optically pure L-lactic

- acid using *Lactobacillus rhamnosus*. *Environmental Technology and Innovation*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103582>
- Gubelt, A., Blaschke, L., Hahn, T., Rupp, S., Hirth, T., & Zibek, S. (2020). Comparison of Different Lactobacilli Regarding Substrate Utilization and Their Tolerance Towards Lignocellulose Degradation Products. *Current Microbiology*, 77(10), 3136–3146. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02131-y>
- Haokok, C., Lunprom, S., Reungsang, A., & Salakkam, A. (2023). Efficient production of lactic acid from cellulose and xylan in sugarcane bagasse by newly isolated *Lactiplantibacillus plantarum* and *Levilactobacillus brevis* through simultaneous saccharification and co-fermentation process. *Heliyon*, 9(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17935>
- He, X., Lu, W., Sun, C., Khalesi, H., Mata, A., Andaleeb, R., & Fang, Y. (2021). Cellulose and cellulose derivatives: Different colloidal states and food-related applications. *Carbohydrate Polymers*, 255. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117334>
- Honorato-Salazar, J. A., Aburto, J., & Amezcua-Allieri, M. A. (2021). Agave and opuntia species as sustainable feedstocks for bioenergy and byproducts. *Sustainability (Switzerland)*, 13 (21). <https://doi.org/10.3390/su132112263>
- Ibrahim, S. A. (2016). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. *Reference Module in Food Science* (p. 17). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00857-x>
- Jim Jem, K., van der Pol, J. F., & de Vos, S. (2010). Microbial Lactic Acid, Its Polymer Poly(lactic acid), and Their Industrial Applications. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, 14, 323–346. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_13)
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 524–534. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>

- Kadam, S. R., Patil, S. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gokhale, D. V. (2006). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.007>
- Khan, R., Jolly, R., Fatima, T., & Shakir, M. (2022). Extraction processes for deriving cellulose: A comprehensive review on green approaches. *Polymers for Advanced Technologies*, 33(7), 2069–2090. <https://doi.org/10.1002/pat.5678>
- Kienberger, M., Weinzettl, C., Leitner, V., Egermeier, M., & Demmelmayr, P. (2023). (Selective) Isolation of acetic acid and lactic acid from heterogeneous fermentation of xylose and glucose. *Chemical Engineering Journal Advances*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.100552>
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., & Dorris, A. (2011). Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(24), 5438–5466. <https://doi.org/10.1002/anie.201001273>
- Komesu, A., Allan Rocha de Oliveira, J., Helena da Silva Martins, L., Regina Wolf Maciel, M., & Maciel Filho, R. (2017). Lactic acid production to purification: A review. *BioResources* 12(2), 4364-4383. [https://bioresources.cnr.ncsu.edu/wp-content/uploads/2017/04/BioRes\\_12\\_2\\_4364\\_REVIEW\\_Komesu\\_OMF\\_Lactic-Acid\\_Production\\_Purification\\_10509.pdf](https://bioresources.cnr.ncsu.edu/wp-content/uploads/2017/04/BioRes_12_2_4364_REVIEW_Komesu_OMF_Lactic-Acid_Production_Purification_10509.pdf)
- Konstantinavičienė, J., & Vitunskienė, V. (2023). Definition and Classification of Potential of Forest Wood Biomass in Terms of Sustainable Development: A Review. *Sustainability (Switzerland)*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/su15129311>
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez Garcia, I., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587–2627. <https://doi.org/10.1039/c3cs60293a>
- Küçükgöz, K., Franczak, A., Borysewicz, W., Kamińska, K., Salman, M., Mosiej, W., Kruk, M., Kołożyn-Krajewska, D., & Trzaskowska, M. (2024). Impact of Lactic Acid

- Fermentation on the Organic Acids and Sugars of Developed Oat and Buckwheat Beverages. *Fermentation*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/fermentation10070373>
- Kumar, A., & Ram, C. (2021). Agave biomass: a potential resource for production of value-added products. *Environmental Sustainability*, 4(2), 245–259. <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00172-y>
- Lara-Topete, G. O., Castanier-Rivas, J. D., Gradilla-Hernández, M. S., & González-López, M. E. (2024). Life cycle assessment of agave bagasse management strategies: PLA biocomposites versus conventional waste disposal practices. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101435>
- Lazaro-Romero, A., Contreras-Ramos, S. M., Dehonor-Gómez, M., Rojas-García, J. M., & Amaya-Delgado, L. (2024). Optimizing cellulose fraction for enhanced utility: Comparative pre-treatment of Agave tequilana Weber var. blue bagasse fiber for sustainable applications. *Heliyon*, 10(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29149>
- Li, Z., Waghmare, P. R., Dijkhuizen, L., Meng, X., & Liu, W. (2024). Research advances on the consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass. *Engineering Microbiology*, 4(2). <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2024.100139>
- Manandhar, A., & Shah, A. (2023). Techno-Economic Analysis of the Production of Lactic Acid from Lignocellulosic Biomass. *Fermentation*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/fermentation9070641>
- Minervini, F., & Calasso, M. (2022). Lactobacillus casei group. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition* (Vol. 4, pp. 275–286). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00853-2>
- Nalawade, K., Baral, P., Patil, S., Pundir, A., Kurmi, A. K., Konde, K., Patil, S., & Agrawal, D. (2020). Evaluation of alternative strategies for generating fermentable sugars from high-solids alkali pretreated sugarcane bagasse and successive valorization to L (+) lactic acid. *Renewable Energy*, 157, 708–717. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.089>

- Nwamba, M. C., Sun, F., Mukasekuru, M. R., Song, G., Harindintwali, J. D., Boyi, S. A., & Sun, H. (2021). Trends and hassles in the microbial production of lactic acid from lignocellulosic biomass. *Environmental Technology and Innovation*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101337>
- Ojo, A. O., & de Smidt, O. (2023). Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification. *Processes*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/pr11030688>
- Oyewole, O. A., Yakubu, J. G., Kalu, J., Abdulfatah, M. T., Abioye, O. P., Adeniyi, O. D., & Egwim, E. C. (2023). Microbial conversion of agro-wastes for lactic acid production. *Scientific African*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01915>
- Palacios Hinstroza, H., Hernández Diaz, J. A., Esquivel Alfaro, M., Toriz, G., Rojas, O. J., & Sulbarán-Rangel, B. C. (2019). Isolation and Characterization of Nanofibrillar Cellulose from Agave tequilana Weber Bagasse. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1342547>
- Paniagua-García, A. I., Garita-Cambronero, J., González-Rojo, S., & Díez-Antolínez, R. (2024). Optimization of lactic acid production from apple and tomato pomaces by thermotolerant bacteria. *Journal of Environmental Management*, 366, 121806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121806>
- Parra-Huertas, R. A. (2010). BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&tlng=es)
- Patel, M. A., Ou, M. S., Harbrucker, R., Aldrich, H. C., Buszko, M. L., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2006). Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3228–3235. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3228-3235.2006>
- Patel, M. A., Ou, M. S., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2005). Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermotolerant acidophilic

- Bacillus sp. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1453–1460.  
<https://doi.org/10.1021/bp0400339>
- Payot, T., Chemaly, Z., & Fick, M. (1998). *Lactic acid production by Bacillus coagulans- Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(1-2), 191-199.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00098-2)
- Pilo, P., & Frey, J. (2011). Bacillus anthracis: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(6), 1218–1224). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.013>
- Pontes, R., Romaní, A., Michelin, M., Domingues, L., Teixeira, J., & Nunes, J. (2021). L-lactic acid production from multi-supply autohydrolyzed economically unexploited lignocellulosic biomass. *Industrial Crops and Products*, 170.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113775>
- 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>
- 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>
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., & Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnology Advances*, 26(1), 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.004>
- Roy, R., Rahman, M. S., & Raynie, D. E. (2020). Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100035>
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1).  
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>

- Sapouna, I., Alexakis, A. E., Malmström, E., & McKee, L. S. (2023). Structure-property relationship of native-like lignin nanoparticles from softwood and hardwood. *Industrial Crops and Products*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117660>
- Schroedter, L., Streffer, F., Streffer, K., Unger, P., & Venus, J. (2021). Biorefinery concept employing bacillus coagulans: Lx-lignin and l-(+)-lactic acid from lignocellulose. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091810>
- SEMARNAT. (2003). *Ley General para la Prevención y Gestión Integral de Residuos* (Primera, Vol. 1). <https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGPGIR.pdf>
- Senedese, A. L. C., Maclel Filho, R., & Maclel, M. R. W. (2015). L-Lactic acid production by lactobacillus rhamnosus ATCC 10863. *Scientific World Journal*, 15(50). <https://doi.org/10.1155/2015/501029>
- Serrano-Martínez, V. M., Pérez-Aguilar, H., Carbonell-Blasco, M. P., Arán-Ais, F., & Orgilés-Calpena, E. (2024). Steam Explosion-Based Method for the Extraction of Cellulose and Lignin from Rice Straw Waste. *Applied Sciences (Switzerland)*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/app14052059>
- Sharma, H. K., Xu, C., & Qin, W. (2019). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 235–251. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>
- 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>
- Sionek, B., Szydłowska, A., Küçükğöz, K., & Kołożyn-Krajewska, D. (2023). Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of Food. *Fermentation*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/fermentation9121019>
- Subba Rao, C., Prakasham, R. S., Bhaskar Rao, A., & Yadav, J. S. (2008). Production of L (+) lactic acid by Lactobacillus delbrueckii immobilized in functionalized alginate matrices. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1411–1415. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9623-0>

- Tanis, M. H., Wallberg, O., Galbe, M., & Al-Rudainy, B. (2024). Lignin Extraction by Using Two-Step Fractionation: A Review. *Molecules*, 29(1). <https://doi.org/10.3390/molecules29010098>
- Tavares, D., Cavali, M., Tanobe, V. de O. A., Torres, L. A. Z., Rozendo, A. S., Zandoná Filho, A., Soccol, C. R., & Woiciechowski, A. L. (2022). Lignin from Residual Sawdust of Eucalyptus spp.—Isolation, Characterization, and Evaluation of the Antioxidant Properties. *Biomass (Switzerland)*, 2(3), 195–208. <https://doi.org/10.3390/biomass2030013>
- Thakur, A., Panesar, P. S., & Saini, M. S. (2019). I(+)-Lactic Acid Production by Immobilized Lactobacillus casei Using Low Cost Agro-Industrial Waste as Carbon and Nitrogen Sources. *Waste and Biomass Valorization*, 10(5), 1119–1129. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0129-1>
- Thygesen, A., Tsapekos, P., Alvarado-Morales, M., & Angelidaki, I. (2021). Valorization of municipal organic waste into purified lactic acid. *Bioresource Technology*, 342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125933>
- Tirloni, L., Heidrich, D., & de Souza, C. F. V. (2023). Adaptive Laboratory Evolution to obtain lactic acid bacteria strains of industrial interest – a review. *Brazilian Journal of Food Technology*, 26. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.05323>
- Umer, M., Brandoni, C., Tretsiakova, S., Hewitt, N., Dunlop, P., Mokim, M. D., Zhang, K., & Huang, Y. (2024). Hydrogen production through polyoxometalate catalysed electrolysis from biomass components and food waste. *Results in Engineering*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.102803>
- Upadhyaya, B. P., DeVeaux, L. C., & Christopher, L. P. (2014). Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends in Biotechnology*, 32(12), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.005>
- Vink, E. T. H., Rábago, K. R., Glassner, D. A., & Gruber, P. R. (2003). Applications of life cycle assessment to NatureWorks™ polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*, 80(3), 403–419. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00372-5](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00372-5)

- Wang, K., Remón, J., Jiang, Z., & Ding, W. (2024). Recent Advances in the Preparation and Application of Biochar Derived from Lignocellulosic Biomass: A Mini Review. *Polymers*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/polym16060851>
- Wang, Y., Chen, C., Cai, D., Wang, Z., Qin, P., & Tan, T. (2016). The optimization of L-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. *Bioresource Technology*, 218, 1098–1105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.069>
- Wan-Mohtar, W. A. A. Q. I., Khalid, N. I., Rahim, M. H. A., Luthfi, A. A. I., Zaini, N. S. M., Din, N. A. S., & Mohd Zaini, N. A. (2023). Underutilized Malaysian Agro-Industrial Wastes as Sustainable Carbon Sources for Lactic Acid Production. *Fermentation*, 9. <https://doi.org/10.3390/fermentation>
- Weiss, N., Schillinger, U., & Kandler, O. (1983). *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, Subjective Synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and Description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(4), 552–557. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80012-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80012-5)
- Xu, P., Wang, L., Zhao, B., Ma, C., Su, F., Tao, F., W, R. H., A, M. L., & Jong, de. (2013). BACILLUS COAGULANS STRAINS AND THEIR APPLICATIONS IN L-LACTIC ACID PRODUCTION (Patent US-8,492,127 B2). In *Appl Microbiol Biotechnol* (US-8,492,127 B2). US PATENT DOCUMENTS.
- Xu, R., Doskaliuk, N., Pang, B., Xu, J., Xu, W., Xu, C., Antonietti, M., & Filonenko, S. (2025). Hemicellulose from mild extraction of biomass: Revealing structural insights and advancing potential value. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 10, 100843. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carpta.2025.100843>
- Zhang, F., Zhang, W., Cao, Q., Lian, T., Yin, F., & Dong, H. (2025). Enhancing the productivity of medium-chain carboxylic acids from fermentation broth of swine manure and apple waste – Optimizing molar ratio of electron donors to electron

acceptors. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(2), 115819.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.115819>

Zoghlami, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

## 11 RESEÑA DEL ARTÍCULO



*polymers*

an Open Access Journal by MDPI



### Advances in L-Lactic Acid Production from Lignocellulose Using Genetically Modified Microbial Systems

Lucila Díaz-Orozco; Mario Moscosa Santillán; Rosa Elena Delgado Portales; Luis Manuel Rosales-Colunga; César Leyva-Porras; Zenaida Saavedra-Leos

*Polymers* 2025, Volume 17, Issue 3, 322