

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



“SÍNTESIS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) A PARTIR DE LACTOSUERO Y
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE LA REGIÓN CENTRO DE
ARGENTINA”

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del Grado de Doctor en Ingeniería Química

Paula Carolina Garnero

DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

Directora: Dra. Verónica Viviana Nicolau

Codirectora: Dra. María Nélide Kneeteman

Miembros del Jurado:

Dr. Marcelo Armando VILLAR (Universidad Nacional del Sur)

Dr. Javier Ignacio AMALVY (Universidad Tecnológica Nacional)

Dra. Ana Griselda BINETTI VIZZO (Universidad Nacional del Litoral)



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
SANTA FE, ARGENTINA

Garnero, Paula Carolina



A la memoria de mis abuelos

A Patri



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
SANTA FE, ARGENTINA

Garnero, Paula Carolina



*“El amor al estudio es, de todas las pasiones, la que más contribuye
a nuestra felicidad”*

Émilie du Châtelet

(1706-1749)



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
SANTA FE, ARGENTINA

Garnero, Paula Carolina



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
SANTA FE, ARGENTINA

Garnero, Paula Carolina

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a los miembros del jurado la cortesía de participar en la evaluación del presente trabajo.

Agradezco también a mi Directora, Dra. Verónica Nicolau y a mi Codirectora, Dra. María Kneeteman, por su generosa colaboración, aportando su experiencia, conocimientos y disponibilidad en la conducción del presente trabajo.

Quisiera agradecer también, a todos los docentes de esta casa de estudios, quienes aportaron a mi formación con su apasionada vocación de docencia y enorme conocimiento, especialmente al Dr. Arturo Simonetta ya que sin su aporte no hubiera alcanzado los objetivos.

Mis agradecimientos van asimismo dirigidos a mis compañeros del grupo GPol de la UTN Facultad Regional San Francisco, así como también al Señor Decano de dicha Facultad, Ing. Esp. Alberto Toloza y su equipo de gestión, ya que, sin ellos, no sería posible hoy, aquí, mi presencia.

De la misma manera quiero hacer llegar mis agradecimientos a la Dra. Diana Estenoz y al personal de INTEC Santa Fe por permitirnos generosamente utilizar parte de su equipamiento e instalaciones.

Agradezco además especialmente al Ing. Ricardo Martini, quien me alentó a continuar con un estudio de posgrado, así como también a las Dras. Mariana Bernard y Andrea Caula, que recorrieron este camino conmigo y compartieron generosamente su conocimiento.



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
SANTA FE, ARGENTINA

Garnero, Paula Carolina



Resumen

En esta Tesis se presenta un paquete tecnológico que involucra básicamente una primera etapa de obtención de ácido láctico (AL), que emplea cepas nativas, no comerciales, y permeado de lactosuero como medio de fermentación; y una segunda etapa de polimerización a poli(ácido láctico) (PLA). Las condiciones de reacción determinarán las características del bioplástico y sus posibles aplicaciones. La investigación contribuye a la mejora del balance comercial del país a través de la sustitución de importaciones, ya que el total del AL y PLA que se consume en Argentina se importa.

En la Sección 1 de la presente Tesis, se presenta una introducción al problema y consideraciones generales. Se presenta una revisión bibliográfica relacionada a las propiedades y aplicaciones del AL y su polímero, la caracterización del AL y el PLA, la síntesis industrial de AL, el lactosuero como materia prima para la obtención de AL, las bacterias ácido lácticas (BAL) como inóculo, la fermentación a partir de lactosuero, la separación y purificación de AL, y la síntesis de PLA por apertura de anillo.

En la Sección 2 se presentan los materiales y métodos empleados durante el desarrollo de esta Tesis. La metodología es experimental e involucra: i) el aislamiento y selección de 25 cepas de BAL obtenidas de muestras de sueros frescos, 20 cepas de BAL de muestras de leche cruda y 3 cepas de BAL a partir de muestras de leche agria (búsqueda primaria); ii) la caracterización taxonómica de las 5 cepas que revelan mejor capacidad acidificante (búsqueda secundaria); iii) la síntesis de AL por fermentación de lactosuero empleando las cepas puras y consorcios potencialmente más competitivos; iv) la separación y concentración de la solución de AL empleando tecnología de membranas; v) la síntesis de PLA por apertura de anillo a partir del AL obtenido por fermentación de lactosuero en comparación a una solución de AL comercial; y vi) la caracterización espectroscópica, cromatográfica y térmica de los polímeros obtenidos.

En la Sección 3 se presenta una discusión de los resultados y en la Sección 4 las principales conclusiones y algunas sugerencias para trabajos futuros. Finalmente, en el Anexo se presentan las características de los aislados de BAL y las evoluciones temporales de acidez titulable y pH durante el ensayo de capacidad acidificante.



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
SANTA FE, ARGENTINA

Garnero, Paula Carolina



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
SANTA FE, ARGENTINA

Garnero, Paula Carolina

Índice

ÍNDICE DE TABLAS	xviii
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ABREVIATURAS	xxii
PRÓLOGO.....	xxv
1. Introducción y Objetivos	1
1.1. Antecedentes en la producción de PLA y oportunidad para el lactosuero.....	2
1.2. Propiedades y aplicaciones del AL y PLA	6
1.3. Caracterización de AL en solución, lactido y PLA.....	13
1.4. Síntesis química vs microbiológica del AL	14
1.5. El lactosuero como materia prima	19
1.6. BAL como inóculo.....	20
1.7. La fermentación a partir de lactosuero	23
1.8. Separación y purificación del AL	29
1.9. Síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido	33
1.10. Objetivos.....	38
2. Materiales y Métodos	40
2.1. Materiales empleados	41
2.1.1. Microorganismo testigo	41

2.1.2. Materiales y reactivos.....	41
2.1.3. Soluciones	42
2.2. Búsqueda de BAL.....	43
2.2.1. “Screening” primario	44
2.2.1.1. Identificación mediante pruebas sencillas	45
2.2.1.2. Conservación de las cepas aisladas.....	46
2.2.2. “Screening” secundario	46
2.2.2.1. Capacidad acidificante.....	46
2.2.2.2. Caracterización taxonómica.....	47
2.3. Obtención de AL por fermentación de lactosuero	48
2.3.1. Preparación del mosto	48
2.3.2. Reactivación de cepas y preparación del inóculo.....	49
2.3.3. Fermentación	49
2.3.3.1. Determinación de azúcares reductores totales - Método volumétrico de Fehling, Causse y Bonnans (FCB)	51
2.3.3.2. Cromatografía de Gases.....	52
2.3.3.3. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS).....	53
2.3.3.4. Cromatografía de Capa Delgada (CCD).....	53
2.3.4. Recuperación, purificación y concentración de AL obtenido por	

fermentación	54
2.4. Síntesis y caracterización de PLA	55
2.4.1. Síntesis del oligómero	55
2.4.1.1. Índice de Acidez	56
2.4.2. Síntesis de lactido	57
2.4.3. Síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido	57
2.4.4. Caracterización del lactido, oligómeros y polímero	59
2.4.4.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	59
2.4.4.2. Resonancia Magnética Nuclear de protones (¹ H RMN).....	59
2.4.4.3. Cromatografía Líquida de exclusión por tamaño (CLE)	59
2.4.4.4. Calorimetría Diferencial de barrido (DSC)	60
2.4.4.5. Análisis Termogravimétrico (TGA)	60
3. Resultados y Discusión	61
3.1. Aislamiento, e identificación de Bacterias Ácido Lácticas silvestres de la región Centro.....	62
3.2. Producción de Ácido Láctico a partir de lactosuero por fermentación empleando Bacterias Ácido Lácticas aisladas de la región Centro del país.....	70
3.2.1. Monitoreo de la fermentación por FCB: Rendimiento y Productividad.....	71
3.2.2. Monitoreo de la fermentación por CG y separación del AL.....	74

3.3. Síntesis y caracterización de PLA	78
3.3.1. Índice de Acidez.....	79
3.3.2. FT-IR.....	79
3.3.3. ¹ H RMN	82
3.3.4. CLE.....	84
3.3.5. Análisis térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA).....	86
4. Conclusiones y Trabajos a Futuro	90
Anexo	93
Referencias Bibliográficas	107

Índice de Tablas

Tabla 1. Microestructura y características moleculares de los distintos estereoisómeros del PLA.....	11
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del PLA.....	12
Tabla 3. Composición del suero lácteo dulce y ácido.....	19
Tabla 4. Clasificación de algunas especies de <i>Lactobacillus</i> de acuerdo a su metabolismo de fermentación	22
Tabla 5. Isómeros de AL producidos por las BAL.....	24
Tabla 6. Características de los aislados de BAL y de la cepa testigo (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>).....	63
Tabla 7. Procedencia e Identificación de los aislados.....	68
Tabla 8. AL a partir de permeado: Rendimiento y productividad.....	72
Tabla 9. Índice de Acidez (IA), PM medios (\bar{M}_n y \bar{M}_w) y polidispersidad (D_n) del AL, oligómeros, lactido y PLA.....	79
Tabla A.1. Características de los aislados de BAL	94

Índice de Figuras

Fig. 1. a) L (+) ácido láctico o (S)-ácido láctico, y b) D (-) ácido láctico o (R)-ácido láctico....	6
Fig. 2. Reacciones del AL en solución acuosa	7
Fig. 3. Diastereómeros del lactido (3,6-dimetil-1,4-dioxan-2,5-diona).....	9
Fig. 4. a) Producción de AL: a) Síntesis química, y b) Síntesis microbiónológica a partir de biomasa	15
Fig. 5. Síntesis de PLA vía prepolímero y lactido.....	33
Fig. 6. Mecanismo de crecimiento de cadena de coordinación-inserción utilizando Sn(Oct) ₂ como catalizador.....	36
Fig. 7. Metodología de obtención de los aislados de BAL.....	44
Fig. 8. Cultivo puro heterofermentante en tubo con agar MRS.	45
Fig. 9. Capacidad acidificante: frascos con 100 mL de leche estéril y 1 mL de inóculo.....	47
Fig. 10. Equipo SHIMADZU iD plus PERFORMANCE de espectrometría de masas MALDI-TOF.....	48
Fig. 11. Sistema de fermentación.....	50
Fig. 12. Sistema de reacción empleado para la oligomerización/depólimerización bajo vacío.....	56
Fig. 13. Síntesis de lactido: extracción mecánica de los cristales en forma de aguja.....	57
Fig. 14. Sistema de reacción para la síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido.....	58

Fig. 15. PLA recuperado por recristalización y secado en estufa de vacío.....	58
Fig. 16. Cepas de BAL seleccionadas: Evolución temporal de acidez titulable.....	65
Fig. 17. Cepas de BAL seleccionadas: Evolución temporal de pH.....	66
Fig. 18. Cepa testigo: a) Evolución temporal de acidez titulable, y b) Evolución temporal de pH.....	67
Fig.19. Fermentaciones 1-6.....	73
Fig. 20. Fermentaciones 7 y 8	74
Fig. 21. Fermentación 1: CG-FID. <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (Sc3).....	75
Fig. 22. GC-FID: Solución de AL luego del tratamiento de separación y concentración...	76
Fig. 23. GC-MS: a) señal (a), y b) señal (c) de la Fig. 21 para 33 h.....	77
Fig. 24. Exp. 1. Espectro FT-IR: a) Oligómero B, y b) PLA.	80
Fig. 25. Exp. 2. Espectro FT-IR correspondiente a PLA.....	81
Fig. 26. Exp. 1. Espectro ¹ H RMN: a) lactido, y b) PLA.....	82
Fig. 27. Exp. 2. Espectro ¹ H RMN: a) lactido, y b) PLA.....	83
Fig. 28. Exp. 1. Cromatogramas obtenidos por CLE.....	85
Fig. 29. Exp. 2. Cromatogramas obtenidos por CLE.....	85
Fig. 30. Exp. 1. Curva de DSC para el PLA.....	87
Fig. 31. Exp. 1. Curva de TGA para el PLA.....	88
Fig. 32. Exp. 1. Curva de DTGA para el PLA.....	88

Fig. A.1. Evoluciones temporales de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Tambo Zona Rural (San Francisco, Córdoba).....	97
Fig. A.2. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Capyc Cooperativa Agropecuaria Productores y Consumidores Ltda. (Devoto, Córdoba).....	98
Fig. A.3. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Lácteos HerBal (Porteña, Córdoba).....	99
Fig. A.4. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por La lecherita. Lácteos República de Entre Ríos SRL (Nogoyá, Entre Ríos).....	100
Fig. A.5. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Lácteos HerBal (Porteña, Córdoba).....	101
Fig. A.6. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Lácteos Don Silvano (Josefina, Santa Fe).....	102
Fig. A.7. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Manfrey Cooperativa de Tamberos Ltda. (Freyre, Córdoba).....	102
Fig. A.8. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Lácteos Ramolac (Ramona, Santa Fe).....	104
Fig. A.9. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por SanCor Cooperativas Unidas Ltda. (Devoto, Córdoba).....	105
Fig. A.10. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Lácteos Santa María SRL (San Francisco, Córdoba).....	106

Abreviaturas

AFM Microscopía de Fuerza Atómica

AL Ácido láctico

Al(OiPr)[(R)-(SalBinap)] Isopropóxido de Aluminio

PLA Poli(ácido Láctico)

ATCC American Type Culture Collection

ATP Adenosín Trifosfato

BAL Bacterias Ácido Lácticas

BuSnO₂H Hidróxido Óxido de n-butilestaño

CG Cromatografía Gaseosa

CLE Cromatografía Líquida de Exclusión por tamaño

DBO Demanda Biológica de Oxígeno

DMS Dimetil Sulfóxido

DQO Demanda Química de Oxígeno

DSC Calorimetría Diferencial de Barrido. Differential Scanning Calorimetry

EE.UU. Estados Unidos

FCB Fehling, Causse y Bonnans

FM Fase Móvil

FT-IR Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier. Fourier-Transform Infrared spectroscopy

GC/FID Cromatógrafo de Gases con Detector de Ionización de Flama. Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Presión. High Performance Liquid Chromatography

MALDI Desorción/ionización láser asistida por matriz. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MRS Man Rogosa Sharpe

OPE Óxido de Polietileno

PET Polietilentereftalato

pH Potencial de Hidrógeno

PS Poliestireno

PSS Inyectores Programables Split/Splitless

PVC Policloruro de Vinilo

^1H RMN Resonancia Magnética Nuclear de Protones

SEM Microscopía Electrónica de Barrido. Scanning Electron Microscopy

TGA Análisis Termogravimétrico. Thermogravimetric Analysis

THF Tetrahidrofurano

CCD Cromatografía de Capa Delgada

TOF Tiempo de vuelo. Time-Of-Flight

UFC Unidades Formadoras de Colonias



Prólogo

Uno de los desafíos más importantes a los que se enfrenta la sociedad moderna es la necesidad de evolucionar, desde una economía centrada en la utilización de recursos no renovables, como por ejemplo los combustibles fósiles, fuente no renovable de energía y materias primas, hacia un modelo basado en la bioeconomía. Este concepto implica conciliar los intereses públicos, privados y solidarios, intentando satisfacer de la mejor manera las necesidades humanas, empleando en forma eficiente y combinando eficazmente los recursos disponibles. El camino hacia la bioeconomía significa, entre otras cosas, una transición hacia modelos de producción más sostenibles desde el punto de vista humano, ambiental y económico.

En la actualidad, el poli(ácido láctico) se produce por fermentación de almidón (biomasa de primera generación) y la reducción de los costos de su producción es motivo de valiosos esfuerzos, así como la explotación de subproductos industriales como el lactosuero (biomasa de segunda generación) cuyo exceso causa contaminación ambiental.

El objetivo general de esta Tesis es desarrollar un proceso integrado y sustentable que permita aumentar el valor industrial/comercial del lactosuero (subproducto de las industrias lácteas) para su aplicación en una segunda cadena de valor agregado, promoviendo la obtención de nuevos materiales poliméricos con propiedades de uso final mejoradas y reducido impacto medioambiental.

Específicamente, en esta Tesis se considera al lactosuero, rico en lactosa, un sustrato adecuado para generar ácido láctico y poli(ácido láctico), mediante fermentación y posterior polimerización química, con la utilización de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de la región centro del país y empleando tecnología de membranas para la separación y purificación del ácido láctico. La tecnología de membranas permitirá eliminar los problemas asociados a la generación de sulfato de calcio de los procesos convencionales. Por otra parte, se espera disminuir los costos de producción mundial de poli(ácido láctico) y aumentar el uso de bioplásticos en reemplazo de polímeros sintéticos derivados del petróleo.



1. Introducción y Objetivos

1.1. Antecedentes en la producción de PLA y oportunidad para el lactosuero

Las condiciones macroeconómicas, la enorme competencia existente, y la rapidez con que cambia el mercado de los materiales impulsan al mejoramiento continuo de los procesos productivos y a la obtención de productos más baratos y de mayor calidad. Además, la creciente utilización de petróleo y de otras fuentes no renovables, como así también el uso de sustancias nocivas para el medio ambiente, han generado interés por desarrollar nuevos productos y nuevas tecnologías ambientalmente benignas, que empleen fuentes alternativas renovables y generen materiales biodegradables.

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster termoplástico de origen bacteriano que posee propiedades similares a los plásticos sintéticos derivados del petróleo (poliolefinas y poliestireno) y es biodegradable (Lasprilla *et al.*, 2012; Komesu *et al.*, 2017). Actualmente, Nature Works LLC en EE. UU., Corbion Purac en Holanda, y Mitsui Toatsu Chemicals en Japón producen PLA a partir de materiales renovables de primera generación tales como maíz, caña de azúcar, remolacha azucarera y yuca (Wee *et al.*, 2006; Nampoothiri *et al.*, 2010) pero su costo es aún elevado comparado con los plásticos sintéticos tradicionales.

Una de las estrategias utilizadas para abaratar los costos es emplear materiales renovables de segunda generación (no aptos para el consumo humano) tales como el bagazo, rastrojo de maíz, paja de trigo y virutas de madera, así como residuos o subproductos industriales como el lactosuero. La explotación de los desechos industriales es apreciada tanto por el cuidado del medioambiente como por el ahorro económico. Recientemente, Corbion Purac ha desarrollado con éxito una resina bioplástica de PLA a partir de materias primas lignocelulósicas de segunda generación optimizando su proceso tradicional para adaptarse a las características especiales de la biomasa. Sin embargo, las tecnologías basadas en lactosuero están aún en vías de desarrollo.

El lactosuero de quesería es el subproducto más abundante de las industrias lácteas. La industria lechera es uno de los sectores más importantes de la economía de países

industrializados y en vías de desarrollo. Aproximadamente el 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca del 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Parra Huertas, 2010). El lactosuero es de difícil aceptación en el mercado, ya que sus características no lo hacen apto para su comercialización directa como suero líquido (González Cáceres, 2012).

Anualmente se producen 110 - 115 millones de toneladas métricas de lactosuero de quesería a nivel mundial de las cuales un 53% le corresponde a Europa, un 28% a América del Norte y América Central, un 6% a Asia, un 5% a África, un 4% a Oceanía, y un 4% a América del Sur (Parra Huertas, 2010; González Cáceres, 2012). A lo largo de los años se han realizado numerosos esfuerzos para transformar los grandes volúmenes de lactosuero en productos para uso alimenticio mediante técnicas que permitan la extracción de sus principales componentes. Se necesita una tecnología avanzada de proceso para fabricar productos como el concentrado de proteínas de suero y la lactosa en polvo, los cuales se utilizan en una amplia gama de productos alimenticios como la carne procesada, las salchichas, los alimentos saludables, las bebidas, alimentos para bebé y dulces (Parra Huertas, 2009). Las estadísticas indican que sólo el 55% de lactosuero producido en el mundo es tratado y transformado en productos alimenticios, de los cuales aproximadamente el 45% es usado directamente en forma líquida, el 30% en polvo, el 15% como lactosa y subproductos, y el resto como concentrado de proteínas (Panesar *et al.*, 2007; Parra Huertas, 2009). El 45% de la producción mundial de lactosuero se desecha en ríos, lagos y otros centros de aguas residuales, o en el suelo, ocasionando serios problemas de contaminación (Sánchez *et al.*, 2007). El lactosuero reduce la vida acuática en el agua al agotar el oxígeno disuelto y afecta física y químicamente la estructura del suelo conduciendo a una pérdida significativa de nutrientes que resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas (González Cáceres, 2012; Regino *et al.*, 2014).

En Argentina la producción de leche en 2018 fue de 11.527 millones de litros, presentando niveles relativamente estables en el último quinquenio, con una tasa de

crecimiento del 4.3% respecto del año anterior. En 2019 la producción creció un 0.18% (ocla.org.ar).

Aproximadamente el 93% de la producción primaria es entregada a la industria para su procesamiento, mientras que el 7% restante no recorre el circuito formal. De la producción de leche cruda, el 18.4% se consume como leches fluidas, mientras que un 74.6% se destina a la elaboración de productos. De este total de leche que se destina a la elaboración de productos, el mayor porcentaje es utilizado para la producción de quesos (55%), mientras que la elaboración de leche en polvo (entera y descremada) insume el 28%. Otros productos en importancia decreciente son manteca, yogur, dulce de leche y con menor participación postres, flanes, y leche condensada. De estos datos se desprende que la producción anual de lactosuero de quesería en Argentina es de aproximadamente 5.552 millones de litros.

En este sentido, el lactosuero es un subproducto abundante en nuestro país y en especial en la cuenca lechera central y su explotación como medio de formulación en procesos fermentativos resulta atractiva para la producción de ácido láctico (AL) y su posterior polimerización a PLA.

El mercado del AL superó los USD 1.25 mil millones en 2019 y se estima que crecerá en más del 11.5% entre 2020 y 2026. De modo similar, el mercado del PLA superó los USD 585 millones en 2019 y se estima que crecerá en más del 10% entre 2020 y 2026 (www.gminsights.com/industry-analysis/lactic-acid-and-polylactic-acid-market).

En 1954 Dupont obtuvo la patente para la producción de AL por vía química. La primera compañía en producir AL por síntesis química fue Monsanto (Texas, USA) en 1963. Desde 1990, el volumen mundial de producción de AL creció aproximadamente 40.000 toneladas métricas por año siendo los principales productores CCA Biochemin (Países Bajos) con filiales en Brasil y España, Sterling Chemicals en Texas (EE.UU.) y Musashino en Japón. Cargill comenzó a investigar la tecnología de producción de AL en 1987, y su producción en planta data de 1992 (Wee *et al.*, 2006). El esquema petroquímico de la producción de

monómeros fue prevalente hasta 1990, luego se desarrolló un enfoque de fermentación económica (Serna-Cock y Stouvenel, 2009; Lasprilla *et al.*, 2012). Actualmente, aproximadamente el 90% de la producción mundial de AL se obtiene por fermentación bacteriana y el resto por síntesis química. Los mayores fabricantes de AL fermentativo son Purac (Países Bajos), Galactic (Bélgica), Cargill (EE.UU.) y varias Empresas chinas tales como CCA (Changzhou), Biochemical Co. Ltd., Henan Jindan Lactic Acid Co. Ltd., y Mushashino Chemical Co. Ltd. y se obtiene principalmente por fermentación sumergida de maíz (Sin y Tuen, 2019; Komesu *et al.*, 2017).

Los principales inconvenientes asociados a la producción de AL por fermentación de lactosuero son su baja productividad y la dificultad en su separación y purificación.

El rendimiento de los microorganismos en la obtención de AL es limitante y hace necesario buscar nuevos microorganismos que posean buena capacidad acidificante y mayor resistencia a las condiciones de fermentación (Wang *et al.*, 2015). Además, la utilización de cultivos lácticos comerciales en sustitución de la microbiota autóctona podría llevar a la pérdida de las cepas nativas a largo plazo (González *et al.*, 2003).

Las operaciones de separación, purificación y concentración de AL son complejas por la alta afinidad del ácido por el agua y por su baja volatilidad. En la mayoría de los procesos, el AL es recuperado como lactato de calcio, y las operaciones posteriores dependen de la pureza deseada e incluyen: tratamiento con carbón activado, purificación con resinas de intercambio iónico (Cao *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2007), extracción con solventes (Sánchez *et al.*, 2007) o esterificación con metanol o etanol seguido por destilación e hidrólisis (Ohara *et al.*, 2003). Posteriormente, se desarrollaron otros métodos más sustentables de recuperación y purificación como la clarificación de medios de fermentación por nanofiltración y/o ósmosis inversa (Muñi *et al.*, 2005; González *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). También la electrodiálisis permite recuperar, purificar y concentrar el AL (Machado *et al.*, 2007). En la industria se emplea el método convencional donde se separan las células por filtración, se trata el mosto con carbonato de calcio o hidróxido de calcio y carbón

activado. Se evapora el agua y se acidifica con ácido sulfúrico para convertir el lactato de calcio en AL, luego el sulfato de calcio se remueve por filtración. Desde el punto de vista ambiental la generación de grandes cantidades de aguas residuales es la mayor desventaja ya que por cada tonelada de AL producido se desecha una tonelada de sulfato de calcio de baja calidad, lo que representa un serio problema en términos de tratamiento de desechos industriales y costos (Sin y Tueen, 2019).

1.2. Propiedades y aplicaciones del AL y PLA

El AL (ácido 2-hidroxipropanoico) fue descubierto por Scheele en 1780 cuando lo aisló de la leche ácida y en 1807 Berzelius demostró su presencia en el tejido muscular animal y humano (Badui, 2009). El AL posee un carbono asimétrico o quiral (Fig. 1) responsable de su actividad óptica, razón por la cual se pueden encontrar dos enantiómeros o isómeros ópticos, el (S)-ácido láctico [o L(+) ácido láctico] y el (R)-ácido láctico [o D(-) ácido láctico], y la mezcla racémica; la cual está constituida por fracciones equimolares de las formas S y R. Las configuraciones D/L están relacionadas con la posición del grupo —OH relativa al gliceraldehído. La configuración L(+) es metabolizada por el organismo humano mientras que la configuración D(-) puede producir acidosis y descalcificación (Wee *et al.*, 2006).

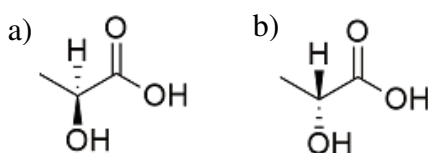


Fig. 1. a) L(+) ácido láctico o (S)-ácido láctico, y b) D(-) ácido láctico o (R)-ácido láctico.

La molécula de AL posee un grupo hidroxilo y un grupo ácido capaces de intervenir en diversas reacciones de esterificación inter e intramoleculares. Por reacción de esterificación intermolecular se obtiene el dímero lineal el cual puede ciclar con formación de lactido y eliminación de agua. Las sucesivas reacciones de condensación por

esterificación del dímero lineal dan lugar a la formación de oligómeros lineales que por depolimerización generan lactido (Fig. 2).

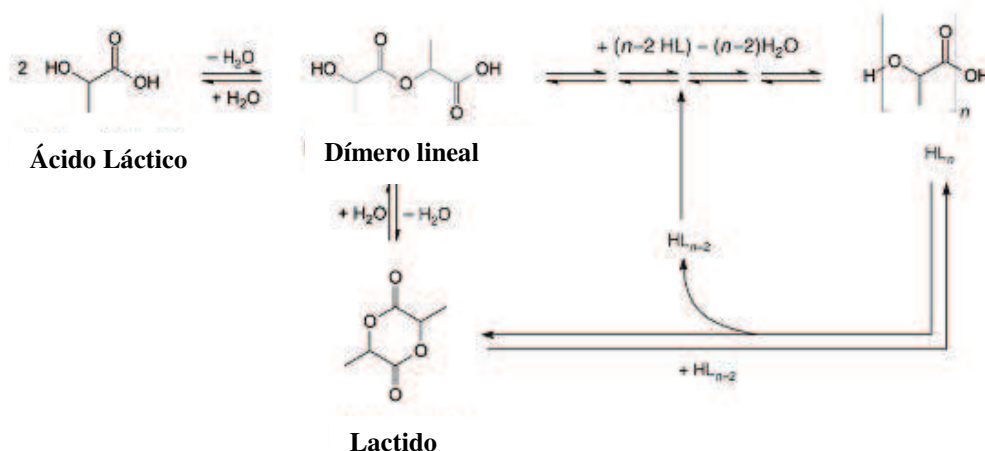


Fig. 2. Reacciones del AL en solución acuosa (Groot *et al.*, 2010).

Las soluciones comerciales de AL son soluciones acuosas con concentraciones entre el 40% y 90% de L-ácido láctico, D-ácido láctico o AL racémico y consisten en una mezcla en equilibrio del monómero (AL), dímeros (lineal y cíclico) y oligómeros. Por ejemplo, una solución de AL 90.1% contiene 59.3% de AL monomérico, 27.3% de dímero (lineal y cíclico) y oligómeros (Groot *et al.*, 2010). El grado de condensación depende del pH, la temperatura y la concentración (Inkinen *et al.*, 2011). Por otra parte, la presencia de oligómeros en una solución concentrada en equilibrio de (S)-ácido láctico da como resultado una rotación óptica global negativa. Es por ello, que Groot *et al.* (2010) recomiendan utilizar la notación estructural R/S o la notación D/L y evitar los signos + y - .

Las propiedades del AL determinan su uso en numerosas aplicaciones. Las principales industrias que emplean AL son: la industria alimenticia (como conservante, acidulante, potenciador de sabor y regulador de pH), la industria cosmética (como regulador de pH, humectante, hidratante, anti acné, rejuvenecedor y aclarante de la piel), la industria farmacéutica (en soluciones de diálisis y parenterales) y la industria química (como

descalcificante, regulador de pH, neutralizante, intermediario quirál, agente de limpieza y acomplejante) (Altiok *et al.*, 2006; Wee *et al.*, 2006; Nampoothiri *et al.*, 2010).

Por otro lado, el AL puede someterse a una amplia variedad de conversiones químicas debido a la presencia de dos grupos funcionales reactivos. El AL se emplea en la síntesis de solventes verdes como los lactatos de etilo, propilo y butilo (vía esterificación con los correspondientes alcoholes), óxido de propileno (vía hidrogenación), acetaldehído (vía descarboxilación), ácido propanoico (vía reducción), 2,3-pentanodiona (vía condensación), propilenglicol (vía desoxidación), ácido acrílico (vía deshidratación) y lactido (vía esterificación intramolecular) (Wee *et al.*, 2006; Dusselier *et al.*, 2013). Todos estos compuestos tienen amplia aplicación en numerosas industrias químicas. Por ejemplo, la industria plástica emplea grandes volúmenes de ácido acrílico en la obtención de resinas acrílicas y propilenglicol para la síntesis de resinas poliéster. Una de las aplicaciones más recientes es el empleo de AL en la obtención de termoplásticos como el PLA (Wee *et al.*, 2006).

El PLA puede sintetizarse a través de una policondensación convencional con la cual se obtienen polímeros de peso molecular medio en peso (\overline{M}_w) entre 2000 y 10000 g/mol (Lunt, 1998) y polidispersidades elevadas ($\overline{M}_w / \overline{M}_n > 2$, siendo \overline{M}_n el peso molecular medio en número). Las elevadas polidispersidades conducen a una baja resistencia mecánica (Fuentes *et al.*, 2006; Lasprilla *et al.*, 2012; Sin y Tueen, 2019). A fin de mejorar el rendimiento de la reacción es necesario eliminar el agua de condensación y desplazar el equilibrio hacia productos (principio de *Le Châtelier*).

Una de las potenciales aplicaciones del PLA de bajo peso molecular es en la síntesis de micro- y nanopartículas para la encapsulación de drogas o herbicidas en procesos de liberación controlada (Zhao *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005; Efthimiadou *et al.*, 2012).

Para aplicaciones que requieren PLA de elevado peso molecular ($\overline{M}_w > 100000$ g/mol) existen básicamente tres alternativas (Lunt, 1998): a) emplear solventes orgánicos que

mediante una destilación azeotrópica permitan eliminar el agua de condensación (Dutkiewicz y Grochowska-Iapienis 2003), b) usar extendedores de cadena (compuestos de bajo peso molecular bifuncionales) como agentes entrecruzantes de los polímeros de condensación (Kylmä *et al.*, 2001; Garlotta, 2001; Corre *et al.*, 2011), y c) obtener el polímero por apertura de anillo del dímero lactido (Idage *et al.*, 2010; Inkinen *et al.*, 2011; Upare *et al.*, 2012; Sin y Tueen, 2019). El método de síntesis de PLA por apertura de anillo permite además obtener polímeros con baja polidispersidad.

Fuentes *et al.* (2006) obtuvieron PLA ($\overline{M}_w = 16000$ g/mol) por policondensación directa de una solución de AL en atmósfera inerte sin uso de catalizadores. Esta vía de síntesis resulta atractiva para aplicaciones farmacéuticas donde el contenido de metales pesados es crítico.

En la industria, el PLA se obtiene por apertura de anillo del dímero lactido ya que este proceso permite obtener polímeros con propiedades uniformes y pesos moleculares (PM) muy definidos tal como se describe en la sección 1.8 de esta Tesis.

El lactido se obtiene por oligomerización del AL y posterior depolimerización controlada del oligómero. Debido a la presencia de dos carbonos asimétricos el lactido presenta 3 diastereómeros (Fig. 3) y el racemato de D,L-lactido (mezcla 50:50 de D-lactido y L-lactido).

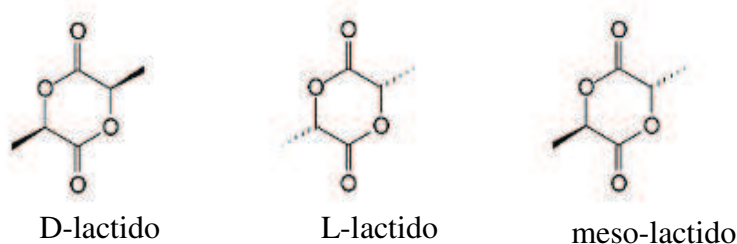


Fig. 3. Diastereómeros del lactido (3,6-dimetil-1,4-dioxan-2,5-diona).

El D,L-lactido tiene un punto de fusión más alto (116 - 119 °C) que el D-lactido y L-lactido (94 - 96 °C) y que el meso-lactido (43 – 47 °C) (Inkinen *et al.*, 2011).

Las impurezas enantioméricas presentes en el lactido, que afectan directamente las propiedades físicas del PLA, pueden derivarse del AL o pueden formarse en la oligomerización o durante la depolimerización del oligómero y depende de factores tales como las condiciones de reacción (temperatura y presión) y el tipo de catalizador utilizado en la degradación térmica del oligómero (Inkinen *et al.*, 2011; Wee *et al.*, 2006).

Todas las formas isoméricas del lactido (Fig. 3) pueden ser polimerizadas a PLA. La macroestructura y microestructura del PLA determinará sus propiedades mecánicas y térmicas finales. La macroestructura o estructura intramolecular está básicamente asociada a los PM mientras que la microestructura o estructura intermolecular se refiere a la estructura u ordenamiento espacial de la molécula y determina la estereoregularidad o tacticidad del polímero (Porter, 2006; Inkinen *et al.*, 2011).

En la Tabla 1 se muestran las principales características moleculares de los distintos estereoisómeros del PLA (Porter, 2006; Xiao *et al.*, 2012). El PLA puede ser: 1) isotáctico, posee una única configuración de centro quiral en todo el polímero (D-PLA y L-PLA), 2) sindiotáctico, posee las configuraciones de centros quirales R y S alternadas consecutivamente, y 3) atáctico, o centros quirales R y S distribuidos aleatoriamente a lo largo de la cadena polimérica (Henton *et al.*, 2005; Porter, 2006).

La regularidad molecular y el isomerismo estereoquímico quedan determinados durante el proceso de polimerización según como se vayan adicionando los sucesivos monómeros al extremo reactivo de la cadena creciente. A mayor estereoregularidad le corresponden mayores porcentajes de cristalinidad. La formación de meso-lactido no puede ser evitada durante la polimerización por fusión de anillos lactido y afecta notablemente la cristalinidad del homopolímero. El L-PLA posee un elevado grado de cristalinidad (mayor a 37%). La velocidad de cristalización del L-PLA disminuye a la mitad en presencia de 3% de

Tabla 1. Microestructura y características moleculares de los distintos estereoisómeros del PLA.

	D-PLA	L-PLA	meso-PLA	
Microestructura*	RRRRRR	SSSSSS	RSRSRS	RRRSRSSH SRSRSR
<i>Características moleculares:</i>				
Tacticidad	Isotáctico	Isotáctico	Sindiotáctico	Atáctico
Morfología	Semicristalino	Semicristalino	Amorfo	Amorfo

*estructura de una repetición de 6 unidades monoméricas.

meso-lactido, y se tienen velocidades 10 veces menores al correspondiente homopolímero con un 6% de meso-lactido (Groot *et al.*, 2010). Cuando la pureza óptica cae por debajo del 78% el polímero es amorfo (Henton *et al.*, 2005). La estabilidad térmica y propiedades de tracción del PLA pueden variar ampliamente dependiendo de su grado de cristalinidad (Ahmed *et al.*, 2009; Inkinen *et al.*, 2011). La temperatura de degradación térmica del PLA está comprendida entre los 250 °C y 356 °C dependiendo de la composición estereoisomérica del polímero y del contenido de impurezas (Inkinen *et al.*, 2011; Julien *et al.*, 2012).

El PLA se comercializa en pellets. Los pellets de PLA semicristalino son opacos y los amorfos son transparentes. Los polímeros amorfos se ablandan rápidamente en un rango de temperatura que se denomina temperatura de transición vítrea (T_g). Los polímeros semicristalinos poseen además temperatura de fusión (T_f) de los cristales. Ambas temperaturas de transición, T_g y T_f, se ven fuertemente afectadas por la estereoquímica, la historia térmica, la estructura y el peso molecular del material (Henton *et al.*, 2005). En la Tabla 2 se muestran algunas propiedades finales de los distintos PLA.

Las propiedades físicas del PLA (brillo, transparencia, imprimibilidad, termosellabilidad, resistencia a las grasas y aceites, barrera de olores y sabores) son

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del PLA.

Propiedades	D-PLA	L-PLA	meso-PLA
Tf (°C)	≅ 180	≅ 180	— ^a
Tg (°C)	50 - 60	55 - 60	-6 a 50 °C
Elongación (%)	20 - 30	20 - 30	— ^b
Resistencia a la rotura (g/dm ²)	4.0 - 5.0	5.0 - 6.0	— ^b
Vida media a 37 °C en solución salina (meses)	4 - 6	4 - 6	2 - 3

^a no posee, ^b depende de la relación D/L.

comparables o superiores a los plásticos convencionales derivados del petróleo como el poliestireno (PS) y el poli(etilentereftalo) (PET) (Lunt, 1998).

Una de las principales aplicaciones del meso-PLA es en la elaboración de empaques para la industria de alimentos ya que ofrece una barrera protectora contra la luz, grasas, humedad y gases. Su transparencia, brillo y facilidad de procesado en la extrusión y el termoconformado, lo hacen adecuado para la elaboración de piezas rígidas. Su rigidez permite además utilizar paredes más delgadas, disminuyendo el peso de las piezas frente a las mismas hechas en PET (Tejeda Benítez *et al.*, 2007). De la misma manera, el meso-PLA, presenta baja Tg y una elevada velocidad de degradación que lo hace muy atractivo en la microencapsulación y nanoencapsulación de medicamentos de liberación lenta como insulina, antiinflamatorios, ganciclovir, ciprofloxacina, eritromicina (Zhao *et al.*, 2003). De modo similar, el meso-PLA se ha usado en la fabricación de vasos, platos y similares descartables, así como en ámbitos de la telefonía o tarjetas inteligentes sustituyendo materiales como el poli(cloruro de vinilo) (PVC) (Tejeda Benítez *et al.*, 2007).

Por otra parte, el L-PLA resulta muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar una carga como las suturas, fijaciones ortopédicas como implantes, tornillos, broches, placas, en cirugía estética y reconstructiva (Tejeda Benítez *et al.*, 2007). Además,

el L-PLA es utilizado en la creación de matrices para la regeneración de tejidos como piel, cartílagos, huesos, estructuras cardiovasculares, intestino, tejido urinario, entre otros (Komesu *et al.*, 2017).

El PLA semicristalino tiene excelentes propiedades mecánicas pero su velocidad de degradación es baja, mientras que el amorfo, que presenta buena velocidad de degradación es quebradizo. Para disminuir la cristalinidad del polímero quiral y acelerar el proceso de degradación pueden prepararse copolímeros de L-PLA y meso-PLA (Martin y Avérous 2001; Ahmed *et al.*, 2009; Inkinen *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2012).

1.3. Caracterización de AL en solución, lactido y PLA

Una solución de AL libre de impurezas, tales como carbohidratos y proteínas, es estable térmicamente y no se oscurece luego de su calentamiento. Un simple ensayo de calentamiento seguido de una evaluación visual de color (empleando patrones del Sistema APHA) permite determinar la aptitud de la solución para ser empleada como materia prima en la obtención de plásticos (Inkinen *et al.*, 2011). Por otra parte, el contenido de agua de una solución de AL puede determinarse por titulación de Karl Fischer o por cromatografía gaseosa (CG) y el grado de dimerización u oligomerización mediante el empleo de técnicas cromatográficas como CG-masa, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o métodos más sencillos como los volumétricos (indirectos) donde se determina el número de acidez y el número de grupos hidroxilo. Además, para determinar la pureza del AL puede utilizarse, también, cromatografía en capa delgada (CCD) mientras que para el lactido se utiliza resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) (Inkinen *et al.*, 2011).

La pureza óptica o enantiomérica del AL, el lactido y el PLA puede determinarse por polarimetría. El ángulo de rotación reportado para el L-PLA y para el D-PLA enantioméricamente puros es de 140° y 156° , respectivamente (Inkinen *et al.*, 2011). De modo similar, pueden emplearse técnicas cromatográficas como HPLC quiral o CG para la separación de enantiómeros del AL y lactido (Feng *et al.*, 2012).

En relación al PLA, las propiedades conformacionales se estudian a menudo por ^1H RMN, espectroscopía Raman, y espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FT-IR). Por otra parte, para la medición de las distribuciones de PM y PM medios se emplea la cromatografía líquida de exclusión por tamaño (CLE). Para la caracterización morfológica se usa la microscopía electrónica de barrido (SEM), y la microscopía de fuerza atómica (AFM) en materiales compuestos. Para la caracterización térmica se emplea calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis térmico (TGA); y para la caracterización mecánica ensayos como tracción, flexión en tres puntos y compresión, entre otros (Inkinen *et al.*, 2011).

1.4. Síntesis química vs microbiológica del AL

El AL puede obtenerse tanto por síntesis química como biotecnológica (Fig. 4). En la síntesis química se emplean materias primas derivadas del petróleo y se obtiene el par racémico ópticamente inactivo (Gil-Horán *et al.*, 2008; Serna-Cock y Stouvenel 2009). Siguiendo la vía biotecnológica se pueden obtener estereoisómeros del AL ópticamente puros por fermentación microbiana de recursos renovables (Ghaffar *et al.*, 2014; Komesu *et al.*, 2017).

Existen numerosas rutas para la producción de AL por síntesis química entre las cuales se destacan las siguientes: i) hidrólisis de azúcares en medio alcalino, ii) oxidación de propilenglicol, iii) hidrólisis de ácido cloropropiónico, iv) oxidación del propileno con ácido nítrico (utilizada por Monsanto Chemical Company en 1963), v) reacción entre acetaldehído, monóxido de carbono y agua a altas temperaturas y presiones, y vi) hidrólisis ácida del lactonitrilo. Sin embargo, sólo la última vía es técnica y económicamente factible (Vaidya *et al.*, 2005; Komesu *et al.*, 2017). La empresa Monsanto Chemical Company obtiene el lactonitrilo (CH_3CHOHCN) por reacción entre el acetaldehído (CH_3CHO) y el ácido cianhídrico (HCN) empleando una base como catalizador a altas presiones [ec. (1)]:



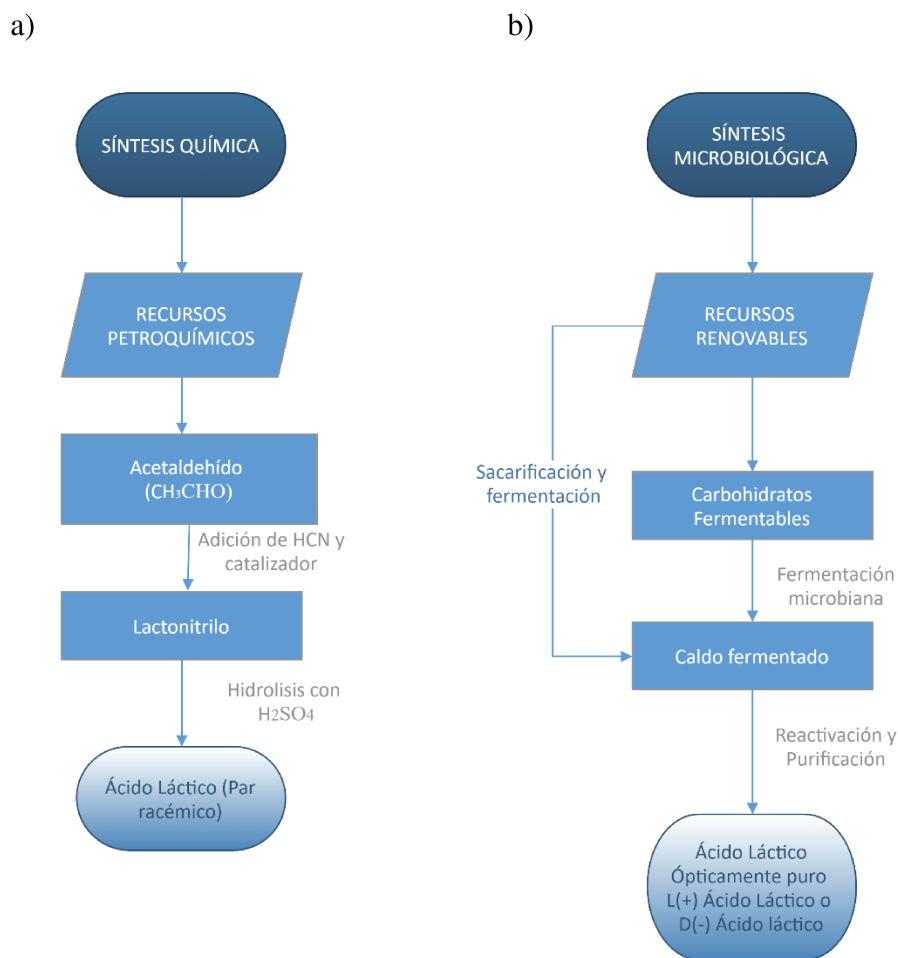
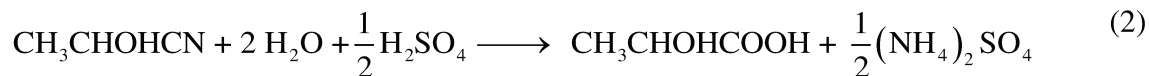


Fig. 4. Producción de AL: a) Síntesis química, y b) Síntesis microbiológica a partir de biomasa.

Luego, el lactonitrilo es separado por destilación y en presencia de H_2SO_4 se hidroliza a AL ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) y sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [ec. (2)]:



El AL es purificado por esterificación con metanol (CH_3OH) [ec. (3)]:



y el lactato de metilo ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOCH}_3$) generado es separado fácilmente por destilación y recuperado como AL por hidrólisis [ec. (4)]:



Por otra parte, los procesos biotecnológicos han recibido un interés significativo, en términos de su menor impacto medioambiental (disminución de la dependencia de materias primas a base de fósiles, reducción de las emisiones de CO_2 , y el uso de biocatalizadores), bajo costo de producción (empleo de sustratos renovables) y la alta estereoespecificidad del producto (Komesu *et al.*, 2017). En este sentido, la producción de AL por procesos de fermentación ha incrementado su demanda de mercado, particularmente en industrias alimentarias, dada la preferencia de productos de origen natural por parte de los consumidores, así como también en la industria de polímeros, debido a las perspectivas de respeto al medio ambiente y por el uso de fuentes renovables en lugar de petroquímicos (Sin y Tueen, 2019).

La producción biotecnológica consiste en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos y depende del tipo de microorganismo (bacterias u hongos), la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el sistema de fermentación empleado y la formación de subproductos (Lasprilla *et al.*, 2012; Sin y Tueen, 2019).

Los sustratos empleados como materia prima en la producción de AL deben poseer bajos niveles de contaminantes, elevada velocidad de transformación y rendimiento, formación de subproductos despreciable y disponibilidad durante todo el año. El contenido de nutrientes en el medio de cultivo es fundamental para el crecimiento de la biomasa y por consiguiente para alcanzar buenos rendimientos de AL (Wee *et al.*, 2006).

El costo de la materia prima es uno de los principales factores económicos en la producción de AL. A pesar de la elevada pureza de los productos obtenidos a partir de sustratos puros como la sacarosa, su costo hace inviable su uso (Komesu *et al.*, 2017).

La biomasa azucarada (como melazas y remolacha azucarera) y la biomasa amilácea (como trigo, maíz, mandioca, patata, arroz, centeno y cebada) son materias primas prometedoras en la producción de AL (Wang *et al.*, 2015; Komesu *et al.*, 2017). Aproximadamente el 90% de AL disponible comercialmente se produce por fermentación sumergida de dextrosa procedente de almidón hidrolizado (Wang *et al.*, 2015).

Sin embargo, el costo de la biomasa azucarada y amilácea es aún elevado y la tendencia es buscar nuevos sustratos más económicos para la producción de AL. La biomasa lignocelulósica es la fuente de biomasa más abundante del mundo. Por otra parte, las microalgas representan otra fuente de materia prima potencial por su fácil y rápido crecimiento y la ausencia de lignina que simplifica la conversión del sustrato (Komesu *et al.*, 2017).

Una alternativa aún más económica en materia prima y medioambientalmente más benigna es la explotación de residuos alimenticios y agrícolas (biomasa lignocelulósica residual) y subproductos industriales tales como glicerol proveniente de la industria de biodiesel, y lactosuero de la industria lechera (Komesu *et al.*, 2017; Sin y Tueen, 2019).

Las materias primas deben acondicionarse antes de ser empleadas en la formulación del mosto de fermentación. Estos pretratamientos suelen ser costosos y en muchas ocasiones hacen económicamente inviable el proceso a pesar de que la materia prima sea económica.

Por otra parte, la elección del microorganismo se hace en función del isómero que se quiera obtener y de la fuente de carbono a fermentar (Wee *et al.*, 2006). En este sentido, si los microorganismos no poseen las enzimas necesarias para la hidrólisis de la materia prima se realiza un pretratamiento con ácidos o enzimas hasta la obtención de azúcares fermentables conocido como sacarificación (Serna-Cock y Stouvenel, 2009).

Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de AL son las bacterias ácido lácticas (BAL). El AL además puede ser producido por bacterias que no suelen incluirse en el grupo de las BAL, tal es el caso de algunas especies de *Bifidobacterium*, *Bacillus* y *Clostridium* (Serna-Cock y Stouvenel, 2009).

De las BAL, la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es la más utilizada para la producción a gran escala de AL, ya que tiene la ventaja de ser homofermentante, producir uno de los isómeros de AL, consumir eficientemente glucosa y ser un microorganismo termófilo con temperatura óptima de crecimiento 41.5 °C, lo que reduce costos de enfriamiento y esterilización, así como riesgos de contaminación microbiológica en el fermentador. Este microorganismo crece bien a un pH entre 5.5 y 6.5 por lo que el ácido producido debe ser continuamente neutralizado (Serna-Cock y Stouvenel, 2009).

Por otra parte, los hongos utilizados en la producción de AL pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas* y *Saccharomyces*. *R. oryzae* y *R. arrhizus* tienen actividad enzimática amilolítica y convierten el almidón directamente a L-ácido láctico. *R. oryzae* requiere solo un medio simple (no requiere fuente de nitrógeno orgánico) y es fácilmente separado del medio de fermentación en el proceso de recuperación y purificación. Sin embargo, la mayor dificultad en el empleo de hongos filamentosos es el gran tamaño de los micelios o sus agregados que provocan aumento en la viscosidad del medio de fermentación con alto incremento en la demanda de oxígeno y resistencia a la transferencia de masa. En este sentido, la fermentación requiere aireación vigorosa porque a diferencia de las BAL los hongos son aerobios estrictos (Gil-Horán *et al.*, 2008).

La técnica de fermentación difiere según el tipo de AL requerido: a) industrial o bruto, b) alimenticio, y c) para síntesis química (industria plástica) o para análisis.

1.5. El lactosuero como materia prima

El lactosuero o suero lácteo es definido como la solución acuosa de la leche, la cual se obtiene por separación de la cuajada resultante de la coagulación de la caseína en la elaboración de quesos; y contiene aproximadamente el 55% de los nutrientes presentes en la leche (Parra Huertas, 2009). Se estima que por cada kilogramo de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85 - 90% del volumen de la leche (Liu *et al.*, 2005).

Existen dos tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la forma de coagular la caseína: a) suero dulce, obtenido por coagulación con renina (quimosina) a pH 6.5; y b) suero ácido, resulta del proceso de fermentación de cultivos iniciadores o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos (Jelen, 2011). La Tabla 3 resume la composición nutricional de los sueros lácteos, observándose un mayor contenido de lactosa en el suero dulce (Panesar *et al.*, 2007; Jelen, 2011).

Tabla 3. Composición del suero lácteo dulce y ácido.

	Dulce (g/L)	Ácido (g/L)
Sólidos totales	63 - 70	63 - 70
Lactosa	46 - 52	44 - 46
Proteína	6 - 10	6 - 8
Calcio	0.4 - 0.6	1.2 - 1.6
Fosfatos	1 - 3	2 - 4.5
Lactato	2	6.4
Cloruros	1.1	1.1

El lactosuero cuenta también con vitaminas del grupo B (ej., tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido cítrico y acético (Carvalho *et al.*, 2013).

El gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 3.5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6.8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero líquido, siendo la lactosa, el principal componente de sólidos (Parra Huertas, 2009; Carvalho *et al.*, 2013).

La disponibilidad de lactosa como reserva de carbohidratos en el lactosuero y la presencia de otros nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos hacen del suero una materia prima particularmente importante para su utilización como sustrato en procesos de fermentación para la producción de AL (Büyükkileci y Harsa, 2004).

Por otra parte, el permeado de lactosuero, también denominado lactosuero desproteinizado, es un producto rico en lactosa derivado de la producción de concentrado de proteína de lactosuero y aislado de proteína de lactosuero.

1.6. BAL como inóculo

Las BAL son un grupo de bacterias con forma de coco o de bastón, son Gram positivas, catalasa negativas, desprovistas de citocromos, no esporuladas y por lo general inmóviles. Las BAL son anaerobias facultativas, con un metabolismo estrictamente fermentativo en el que se produce AL como producto principal de la fermentación de azúcares. La mayoría de las especies tienen elevada tolerancia a la acidez a pH por debajo de 5 que le otorgan ventajas competitivas sobre otras bacterias (Panesar *et al.*, 2007).

Las BAL se pueden agrupar según las temperaturas óptimas de desarrollo y producción de AL (37 °C y 42 °C). Sin embargo, la velocidad de formación de producto es muy similar en el rango de temperatura entre 32 °C y 42 °C. La temperatura óptima de

crecimiento varía según el género y está comprendida en un rango entre 20 °C a 45 °C (Hujanen y Linko, 1996; Büyükkileci y Harsa, 2004; Holzapfel y Wood, 2014).

En relación a las exigencias nutricionales, las BAL requieren nutrientes complejos ricos en vitaminas (especialmente vitamina B) y nitrógeno (aminoácidos, purinas y pirimidinas) debido a su limitada habilidad para sintetizarlos. Por lo tanto, las BAL se encuentran en la naturaleza en ambientes nutricionalmente ricos (Arellano Arriaga, 2013).

La principal característica del metabolismo de las BAL es la fermentación eficiente de carbohidratos junto con la fosforilación a nivel sustrato, necesaria para la obtención de energía, ya que las BAL no son capaces de generar energía a través de la actividad respiratoria. Por lo tanto, las BAL obtienen principalmente energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) en las reacciones que se producen durante la glicólisis. Esta energía es empleada para realizar funciones específicas de mantenimiento como el transporte de nutrientes, entre otras (Arellano Arriaga, 2013).

Las BAL comprenden principalmente los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lacticasei*, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. De los cuales el género *Lactobacillus* es el predominante, y actualmente son reconocidas más de 151 especies y subespecies (Panesar *et al.*, 2007; Holzapfel y Wood, 2014).

Básicamente las BAL presentan un metabolismo homofermentante o heterofermentante. Por ejemplo, todas las especies del género *Leuconostoc* son heterofermentantes. Sin embargo, el género *Lactobacillus* es dividido en tres grupos según sus características de fermentación (Tabla 4).

Las BAL homofermentantes poseen la enzima aldolasa y producen AL como producto final de la fermentación de la glucosa siguiendo la ruta glicolítica de Embden-

Meyerhof. Estas bacterias no fermentan pentosas. Las BAL con metabolismo

Tabla 4. Clasificación de especies de *Lactobacillus* de acuerdo a su metabolismo de fermentación (Panesar *et al.*, 2007).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus Heterofermentantes</i>		
	<i>Homofermentantes</i>	<i>Facultativas</i>	<i>Obligadas</i>
<i>L. acidophilus</i>		<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>		<i>L. coryneformis</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>L. curvatus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		<i>L. casei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>Lactococcus lactis</i>		<i>L. paracasei</i>	<i>Leuconostoc sp.</i>
<i>S. thermophilus</i>			

homofermentante producen 2 moles de AL y una ganancia neta de 2 moles de ATP por mol de glucosa.



Por otro lado las especies de BAL heterofermentantes obligadas carecen de la enzima aldolasa y siguen la vía de la 6-fosfogluconato-fosfocetolasa para metabolizar las hexosas con producción de un mol de AL y/o un mol de ácido acético, un mol etanol, un mol de dióxido de carbono y una ganancia neta de 1 ATP por cada mol de glucosa consumido (Panesar *et al.*, 2007).



Las especies de BAL heterofermentantes facultativas en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis metabolizan hexosas siguiendo la ruta glucolítica de Embden-Meyerhof y pentosas mediante la vía de la 6-fosfogluconato-fosfoacetolasa, y en condiciones aeróbicas forman además de AL, ácido acético, etanol y peróxido de hidrógeno (Villegas y Gilliland, 2006; Waldir *et al.*, 2007).

Algunas BAL, como *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, y *L. acidophilus*, sólo metabolizan la glucosa después de la escisión de la lactosa por parte de la enzima β -D-galactosidasa, mientras que la galactosa se excreta en el medio. La excreción de la galactosa se atribuye a una baja actividad de la galactoquinasa. Otras BAL metabolizan la glucosa por las vías mencionadas anteriormente y la D-galactosa a través de la ruta Tagatosa 6-fosfato o vía Leloir (Panesar *et al.*, 2007).

La mayoría de las BAL producen únicamente una forma isomérica de AL debido a que las formas isoméricas de la enzima lactato deshidrogenasa determinan el isómero de AL producido. En el caso de producirse el par racémico, el isómero predominante depende, también, de cambios de aireación, cantidad de NaCl, tipo de fermentación, incrementos en el pH y concentración de sustrato (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000; Holzapfel y Wood, 2014). En la Tabla 5 se muestran los isómeros de AL producidos por algunas BAL, según su género y especie (Panesar *et al.*, 2007).

1.7. La fermentación a partir de lactosuero

En la producción de AL industrial o bruto se adopta generalmente el sistema de fermentación espontánea, tratando solamente de favorecer la actividad de las BAL naturalmente presentes en el suero mediante el ajuste de la temperatura y del pH. El producto contiene además de AL, pequeñas cantidades de ácido butírico, acético y propiónico, que le confiere un cierto olor. El color es amarillo a marrón oscuro. El contenido de cenizas es relativamente elevado.

En la fabricación de AL para la industria alimentaria o para síntesis química, es importante usar suero fresco, con poca acidez, es decir que no haya sufrido una fermentación espontánea. Caso contrario se obtendrá un AL cuyo olor no es agradable, por la presencia de ácido butírico. Es importante también que la fermentación sea lo más completa posible, es

Tabla 5. Isómeros de AL producidos por las BAL (Panesar *et al.*, 2007).

Género y Especie	Configuración de AL	Metabolismo Homofermentante	Metabolismo Heterofermentante
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. delbrueckii</i>	L	+	-
<i>L. lactis</i>	D	+	-
<i>L. bulgaricus</i>	D	+	-
<i>L. curvatus</i>	DL	+	-
<i>Levilactobacillus</i>			
<i>L. brevis</i>	DL	-	+
<i>Limosilactobacillus</i>			
<i>L. fermentum</i>	DL	-	+
<i>Lactiplantibacillus</i>			
<i>L. plantarum</i>	DL	+	-
<i>Lacticaseibacillus</i>			
<i>L. casei</i>	L	+	-
<i>Sporolactobacillus</i>			
<i>S. inulinus</i>	D	+	-
<i>Streptococcus</i>			

<i>S. cremoris</i>	L	+	-
<i>S. lactis</i>	L	+	-
<i>Leuconostoc</i>			
<i>L. mesenteroides</i>	D	-	+

decir que quede menos de 0.1% de azúcar en el medio, ya que, de otra manera, se obtiene un producto de calidad inferior por los compuestos que se forman a partir del azúcar durante la concentración.

La fermentación se lleva a cabo en un rango de pH entre 5.5 - 5.8 y en un rango de temperatura entre 35 - 40 °C durante 24 - 48 h. La concentración de iones hidrógeno es un parámetro importante que tiene un fuerte efecto en la producción de ácidos orgánicos formados durante los procesos de fermentación debido a que cuando se acumulan en gran cantidad en el caldo de fermentación inhiben el crecimiento del microorganismo. A los microorganismos se les dificulta producir AL para valores de pH cercanos al valor de pKa del AL y la fermentación cesa para valores de pH menores a 5 (Carlson y Peters, 2002; Büyükkileci y Harsa, 2004; Holzapfel y Wood, 2014).

Estos iones hidrógeno acumulados en el medio se pueden controlar utilizando bases fuertes como el hidróxido de sodio (NaOH) o calcio [Ca(OH)₂], bases más débiles como el hidróxido de amonio (NH₄OH), o sales como el carbonato de sodio (Na₂CO₃) que actúan como buffer (Ríos Castro, 2011). Al final de la fermentación se obtienen los correspondientes lactatos de sodio (NaCHOHCOOCH₃), calcio (CaCHOHCOOCH₃) o amonio (NH₄CHOHCOOCH₃). La principal desventaja de utilizar bases fuertes es la acción corrosiva, por lo tanto, el material de la instalación debe ser altamente resistente. El proceso de producción utilizado por NatureWorks emplea Ca(OH)₂ (Vink *et al.*, 2007). El NH₄OH tiene la ventaja de proporcionar una fuente de nutriente nitrogenado a las bacterias observándose un crecimiento mejorado en comparación con el NaOH (Norddhal, 2001).

Las tecnologías que emplean lactosuero como medio de fermentación están en vías de desarrollo debido a la baja productividad (2.2 g/L.h) de los procesos fermentativos que limitan su aplicación industrial (Panesar *et al.*, 2007).

Son numerosos los autores que han estudiado el efecto de distintas variables (microorganismo, suplementación del medio, desproteínización del lactosuero, cantidad de inóculo, sistema de fermentación, empleo de células libres e inmovilizadas) sobre la productividad del proceso (Panesar *et al.*, 2007).

Cui *et al.* (2012) obtuvieron L-ácido láctico con un rendimiento del 93% empleando la especie *Lacticaseibacillus rhamnosus* como inóculo. De modo similar, Büyükkileci *et al.* (2004), Panesar *et al.* (2010), García *et al.* (2013), Arellano Arriaga (2013) y Regino *et al.* (2014) emplearon la especie *Lacticaseibacillus casei* como inóculo obteniendo rendimientos de L-ácido láctico de hasta 95%, superiores al 85 - 90% obtenido con la especie *Lactobacillus delbrueckii*. Urribarrí *et al.* (2004) y Schepeers *et al.* (2006) obtuvieron rendimientos del 75% en la obtención de AL racémico empleando la especie *Lactobacillus helveticus* como inóculo.

Los consorcios microbianos son asociaciones naturales de dos o más especies que actúan como una comunidad, beneficiándose cada uno de ellos de la actividad de los demás. El empleo de consorcios en las fermentaciones favorece la sinergia entre los microorganismos confiriéndoles mayor robustez o resistencia a las condiciones adversas y a la invasión de otras especies evitando la contaminación (Rawlings y Johnson, 2007). Rojas *et al.* (2016) emplearon las especies *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (consorcio empleado en la elaboración industrial de yogurt) como inóculo en la fermentación de lactosuero con rendimientos de 94.6%, superiores a los obtenidos con *Lactobacillus delbrueckii*. De manera similar Cuervo Garcés y Echeverry Vargas (2016) obtuvieron AL por fermentación de lactosuero empleando un consorcio de 3 especies (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y una especie perteneciente al género *Bifidobacterium*) con rendimientos del 93%.

La producción de AL incrementa con el aumento de hasta el 2% (v/v) del tamaño del inóculo (Chiarini *et al.*, 1992; Panesar *et al.*, 2010). Sin embargo, porcentajes más altos (10%, v/v) no mostraron mayor consumo de lactosa (Chiarini *et al.*, 1992; Panesar *et al.*, 2010).

La suplementación del medio de cultivo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno es uno de los factores clave para mejorar la productividad de la fermentación (Cui *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016). Sin embargo, el costo elevado del extracto de levadura limita su uso en las fermentaciones y la concentración de extracto de levadura en los procesos industriales es, en la mayoría de los casos, subóptima (Fitzpatrick *et al.*, 2000). Con el fin de disminuir costos, Urribarrí *et al.* (2004) emplearon triptona como fuente de nitrógeno y los efectos fueron similares en comparación al extracto de levadura.

Por otra parte, la desproteínización del lactosuero mejora notablemente la productividad del proceso ya que la presencia de proteínas interfiere en la fermentación. Urribarrí *et al.* (2004), Panesar *et al.* (2010), Arellano Arriaga (2013), García *et al.* (2013), Regino *et al.* (2014), Rojas *et al.* (2016), Cuichán Guanoluisa (2015) y Cuervo Garcés y Echeverry Vargas (2016) emplearon vapor a presión para la desproteínización del lactosuero mientras que Li *et al.* (2008) y Cui *et al.* (2012) emplearon ultrafiltración. En todos los casos se observó un incremento en el rendimiento y la productividad de la fermentación.

En relación a los sistemas de fermentación, Büyükkileci y Harsa (2004) fermentaron lactosuero sin desproteínizar enriquecido con extracto de malta, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso empleando la especie *Lactocaseibacillus casei* como inóculo en un fermentador discontinuo a distintos pHs (5.0, 5.5, 6.0, y 6.5) y temperaturas (27 °C, 32 °C, 37 °C, 42 °C) durante 24 h. La mayor productividad de AL (3.97 g/L.h) se alcanzó a 37 °C y pH 5.5.

Los sistemas de fermentación discontinuos con recirculación del mosto y separación del AL permiten la disminución de los efectos inhibitorios del AL. En estos sistemas el pH del permeado se ajusta a pH 5.5 - 6.0 al inicio de la fermentación y se mantiene este valor

como resultado de la separación del ácido (Muñi *et al.*, 2005; González *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

La producción de AL por fermentación convencional batch presenta un largo período lag, requiriendo mayor capacidad de fermentador y mayores costos operativos. Además, las concentraciones de sustrato superiores al nivel crítico provocan inhibición en las cepas, lisis celular y fase lag prolongada, lo que genera una disminución en la tasa de fermentación y la utilización de azúcar. Para reducir la inhibición del sustrato, se utiliza la fermentación fed-batch que permite mantener la concentración de sustrato a un nivel bajo mediante la alimentación de nutrientes al medio (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

En los últimos años, los métodos de inmovilización de células han adquirido gran importancia en los bioprocesos ya que permiten mayores densidades celulares en los biorreactores, mejoran la estabilidad del proceso de fermentación, permiten la reutilización y el funcionamiento continuo, y excluyen la necesidad de separar las células de los productos después del procesamiento (Kazemi y Baniardalan, 2001). En busca de opciones económicas para soportes de inmovilización se han utilizado astillas de madera, partículas de ladrillo, vidrio poroso y cáscara de huevo para *Lactocaseibacillus casei*. Las astillas de madera mostraron mayor adsorción (Kazemi y Baniardalan, 2001; Senthuran *et al.*, 1999). Sin embargo, el método de inmovilización de células más empleado es el de encapsulación de las bacterias en perlas de gel de polisacáridos naturales (Audet *et al.*, 1991; Roukas y Kotzekidou, 1991; Champagne *et al.*, 1992; Lamboley *et al.*, 1997). Uno de los principales problemas de los procesos continuos de una sola etapa con células inmovilizadas es la conversión incompleta del azúcar. En este sentido, Schepers *et al.* (2006) emplearon una cepa de *Lactobacillus helveticus* inmovilizada en perlas de polisacárido y un sistema de fermentación continuo de dos etapas (dos biorreactores en serie) alcanzando productividades de AL entre 19 - 22 g/L.h con bajo contenido de azúcar residual.

Al final de toda fermentación, el caldo contiene impurezas tales como ácidos orgánicos (glicérico, succínico, fórmico, fumárico, pirúvico, acético), alcoholes (metanol,

etanol, butanol), aminoácidos (alanina, serina, glutamina, glicina), fragmentos proteicos que derivan de la célula, cuerpos de color, nutrientes residuales, intermediarios metabólicos, y subproductos de fermentación.

1.8. Separación y purificación de AL

El mayor desafío en la producción de AL a partir de sustratos complejos está asociado a su recuperación y purificación. Aproximadamente del 40% al 70% de los costos operativos y de capital están asociados con los pasos de separación. Por lo cual, en los últimos años se han estudiado diversos métodos y combinaciones de métodos para su recuperación de los caldos de fermentación de modo de garantizar la viabilidad económica del proceso (Li *et al.*, 2008; Gil-Horán *et al.*, 2008).

El proceso de destilación directa del caldo de fermentación a temperatura y presión normal, no ha sido aceptado debido a la baja volatilidad del AL (122 °C a 1661.73 Pa), su afinidad por el agua, y su tendencia a polimerizar (Sun *et al.*, 2006; Komesu *et al.*, 2017). Se han empleado procesos de destilación al vacío a fin de evitar degradaciones y oligomerizaciones indeseadas (Henton *et al.*, 2005; Sin y Tueen, 2019).

En el proceso convencional se obtiene lactato de calcio como producto de la fermentación y para su separación como AL se lleva a cabo una acidificación con H₂SO₄. Este proceso genera AL con elevado contenido de impurezas y grandes cantidades de CaSO₄ insoluble que es separado por filtración. El filtrado se concentra al vacío hasta un 40 - 80% de AL. En la obtención de AL alimenticio se usa carbón activado como clarificante antes de la concentración y posterior desdoblamiento del lactato a ácido. Para obtener AL sin impurezas el ácido concentrado se esterifica con metanol empleando H₂SO₄ como catalizador. Los ésteres son más volátiles que el AL. El lactato de metilo se destila y es hidrolizado con agua caliente o con vapor. Se obtiene así AL puro y se recupera el metanol. La toxicidad y el costo elevado del metanol han hecho que la producción a gran escala por

esta vía convencional sea económicamente y ecológicamente poco atractiva (Groot *et al.*, 2010; Sin y Tueen, 2019).

En las fermentaciones cuyo producto de fermentación es el lactato de amonio el método de recuperación de AL por acidificación con H_2SO_4 es prácticamente inviable debido a la alta solubilidad del sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$ (Sun *et al.*, 2006; Kwak *et al.*, 2012; Upare *et al.*, 2012). El lactato de amonio se esterifica con alcohol (metanol, etanol o butanol) y se separa por destilación. Luego, el éster es hidrolizado a AL (Sun *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009). Ohara *et al.* (2003) separaron el lactato de amonio de un mosto de fermentación de glucosa mediante esterificaciones con etanol y butanol seguidas de destilación y posterior hidrólisis. El rendimiento de AL resultó superior para el lactato de etilo. Por otra parte, Kwak *et al.* (2012) separaron el lactato de amonio por acidificación con H_2SO_4 y adición de metanol a temperatura ambiente. De esta manera se disminuye la solubilidad del $(NH_4)_2SO_4$ el cual puede ser separado de la solución por filtración mientras que el lactato de metilo es separado por destilación. Por otra parte, el $(NH_4)_2SO_4$ puede ser utilizado para la producción de H_2SO_4 y amoníaco (NH_3).

En general, en las reacciones de purificación de AL por esterificación e hidrólisis se utilizan catalizadores homogéneos tales como H_2SO_4 y ácido clorhídrico (HCl). Sin embargo, estos catalizadores causan problemas de corrosión de los equipos, son difíciles de eliminar de la mezcla de reacción y ocasionan reacciones secundarias. Es por ello, que se prefiere el uso de catalizadores heterogéneos como son las resinas ácidas de intercambio catiónico (Choi y Hong, 1999). Estas resinas tienen la ventaja de ser sólidos de fácil recuperación y más amigables con el ambiente que los ácidos inorgánicos. Delgado *et al.*, (2007) y Toor *et al.*, (2011) estudiaron la cinética de esterificación del AL con iso-propanol $[CH_3CH(OH)CH_3]$ y etanol, respectivamente; empleando una resina de intercambio catiónica como catalizador.

Por otra parte, los procesos de recuperación de AL puro mediante esterificación, destilación e hidrólisis son complejos y el costo de capital en equipamiento es muy elevado. En este sentido, la destilación reactiva, tecnología que integra la reacción y la separación en

un mismo equipo, permite una reducción en la inversión de capital, mejoras en la conversión de los reactivos y en la selectividad de los productos, así como ahorro en el uso de energía y reactivos entre otros (Choi y Hong, 1999). La conversión de la reacción está condicionada por el equilibrio y puede aumentarse sustancialmente mediante la eliminación continua de productos de la mezcla de reacción (principio de *Le Châtelier*). Cardona Alzate *et al.* (2004) separaron AL por destilación reactiva de lactato de metilo. Para recuperar el AL mediante dos reacciones (esterificación e hidrólisis) y una destilación, se debe emplear un sistema de destilación con dos columnas. Sin embargo, este sistema es complejo y requiere del uso de solventes tales como metanol o butanol (Seo *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2006). Choi y Hong (1999) y posteriormente Kumar *et al.* (2006) estudiaron un nuevo sistema de destilación discontinuo reactivo que permite recuperar AL puro con rendimientos elevados. Las reacciones de esterificación, destilación e hidrólisis se llevan a cabo en una única unidad que posee una columna de destilación.

Además de los métodos de esterificación-hidrólisis, existen otras alternativas para la recuperación y purificación de AL como la extracción reactiva, las resinas de intercambio, y la tecnología de membranas. Sin embargo, la mayoría de estos métodos, a excepción de la tecnología de membranas, son limitados y costosos.

En la extracción reactiva la fermentación se lleva a cabo en presencia de solventes orgánicos inmiscibles con el agua tales como hexano, heptano, iso-octano y compuestos que favorecen la separación de fases tales como aminas terciarias, amonios cuaternarios y compuestos organofosforados (Sánchez *et al.*, 2007; Sin y Tueen, 2019). Sánchez *et al.* (2007) obtuvieron los mejores rendimientos con hexano en comparación con otros solventes como heptano e iso-octano realizando el proceso de separación *in situ*. Sin embargo, los solventes orgánicos son tóxicos tanto para los microorganismos como para el medioambiente y el pH óptimo de la extracción y de la fermentación no coinciden.

El intercambio de iones con resinas es ampliamente utilizado en bioseparaciones, y diferentes procesos para la recuperación de AL. Vaccari *et al.* (1993) y Cao *et al.* (2002)

estudiaron la separación de L-ácido láctico de mostos clarificados empleando columnas rellenas con resinas de intercambio aniónicas que retienen al lactato. Por otra parte, González *et al.* (2008) recuperaron el AL por remoción de los aniones presentes en el mosto clarificado. Primero el mosto se hizo pasar por una columna de intercambio catiónica a fin de separar el lactato como AL, y luego por una columna aniónica que retiene los aniones quedando el AL en solución.

Hasta el momento la tecnología de membranas es la más prometedora para la separación de solutos neutros y cargados en soluciones acuosas. Dependiendo del tamaño de poro, los procesos de separación por membrana se clasifican como filtración convencional, microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. Por otra parte la electrodiálisis convencional, es una tecnología de separación por membrana en la cual los iones son transportados a través de una membrana de intercambio iónico de una solución a otra, bajo la influencia de un potencial eléctrico (Bouchoux *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007; Sin y Tueen, 2019).

La nanofiltración es un proceso de membrana que puede utilizarse para separar las impurezas del mosto de fermentación, tales como proteínas, lípidos y azúcar remanente y se aplica en la industria del agua potable, alimentaria y textil (Boussu *et al.*, 2007) mientras que la ósmosis inversa es un método de membranas que se usa para separar agua y concentrar soluciones (Li *et al.*, 2008). Los procesos de membranas combinadas de nanofiltración y de ósmosis inversa, tienen la ventaja de separar impurezas y concentrar el AL del caldo de fermentación. Li *et al.* (2008) emplearon membranas de nanofiltración de diferentes materiales (acetato de celulosa, poliamida y compuestos de ambas) con un 97% de retención de lactosa remanente. La retención de las membranas de ósmosis inversa fue del 100% de AL.

Dentro de los procesos de membranas se están investigando procesos que incluyen separación, purificación y concentración de sales de lactato por electrodiálisis utilizando membranas impulsadas por potencial eléctrico (Henton *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2007;

Sin y Tveen, 2019), conversión de sales de lactato en ácido libre por electrodiálisis con membranas bipolares y tratamientos de intercambio iónico, entre otras (Bouchoux *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007).

1.9. Síntesis de PLA por apertura de anillo de dímero lactido

Si bien la bibliografía sobre la síntesis de PLA es abundante, existen aún varios aspectos sin dilucidar asociados a los fenómenos físicos y químicos, así como a las relaciones entre la estructura y sus propiedades. Existe interés por investigar aspectos básicos y generales de la síntesis química de PLA.

En esta Tesis se apunta a investigar la síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido ya que este proceso permite obtener polímeros con propiedades uniformes y PM muy definidos.

Básicamente, la síntesis de PLA por apertura de anillo involucra una primera etapa de síntesis del dímero cíclico (por oligomerización y posterior depolimerización) y una segunda etapa de obtención de PLA (Fig. 5).

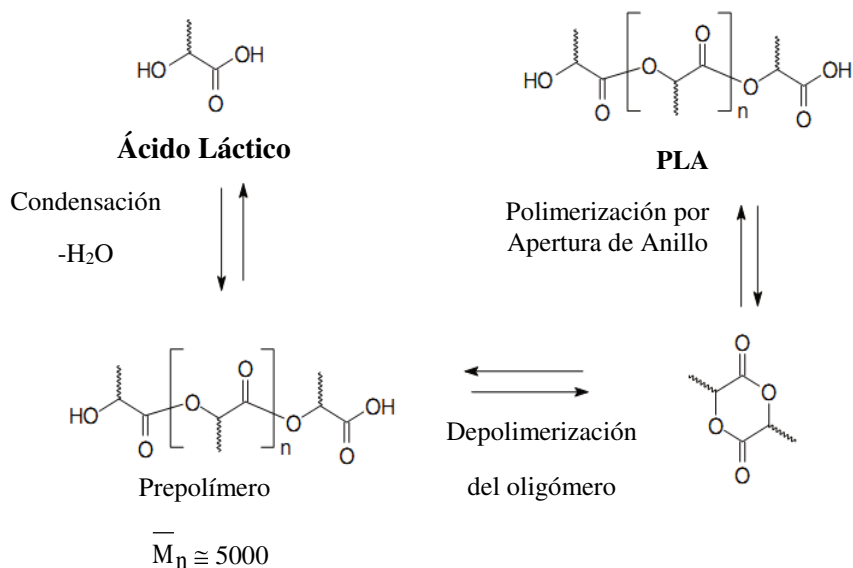


Fig. 5. Síntesis de PLA vía prepólmero y lactido (Henton *et al.*, 2005).

El lactido se obtiene por polimerización de AL o lactatos de alquilo (oligomerización) y posterior depolimerización (deoligomerización) utilizando un catalizador para mejorar la velocidad y la selectividad de la reacción de ciclación intramolecular (Ohara *et al.*, 2003; Henton *et al.*, 2005). Para la depolimerización se emplea por lo general presión reducida entre 5 mmHg a 50 mmHg y temperaturas entre 190 °C y 220 °C. Sin embargo, un alto vacío mejora el rendimiento de lactido (Ohara *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2006).

Fuentes *et al.* (2006) sintetizaron lactido por policondensación de AL a 180 °C y 5.3 kPa durante 120 minutos, y una posterior depolimerización a 220 °C y 5.3 kPa durante 40 minutos empleando cloruro de estaño dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como catalizador.

Por otra parte, Upare *et al.* (2012) sintetizaron lactido a partir de AL y lactato de etilo empleando diferentes catalizadores tales como óxido de estaño (SnO), SnCl_2 , $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]$, hidróxido óxido de n-butilestano (BuSnO_2H) y H_2SO_4 . La oligomerización del AL se llevó a cabo a 180 °C y 720 Torr en atmósfera de nitrógeno durante 6 h y luego se continuó a 10 Torr durante 5 h. La depolimerización se llevó a cabo a 210 °C y 10 Torr durante 5 h empleando 0.5% p/p de SnO como catalizador. De modo similar, la oligomerización del lactato de etilo se realizó entre 150 - 180 °C durante 6 - 10 h en atmósfera de nitrógeno a 720 Torr dependiendo del tipo de catalizador empleado (1%). Luego se redujo la presión a 10 Torr durante 2 - 5 h. La depolimerización se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno a 180 °C y 10 Torr durante 5 h. Los mayores rendimientos de lactido (78% y 81%) se obtuvieron a partir de oligómeros de peso molecular 1394 y 2346 g/mol generados a partir de AL y lactato de etilo empleando SnO y $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizadores, respectivamente.

De modo similar, Ohara *et al.* (2003) sintetizaron lactido partiendo de lactato de etilo y lactato de butilo. El mayor rendimiento fue para el lactido obtenido a partir del lactato de etilo debido a su moderada presión de vapor y bajo impedimento estérico en la oligomerización.

Yoo *et al.*, (2006) estudiaron el efecto de la temperatura, la presión, el peso molecular del oligómero y el tipo de catalizador en la síntesis de lactido. La fracción de meso-lactido disminuyó al aumentar la temperatura. Un mayor rendimiento con menor racemización se observó a una presión más baja. El rendimiento de lactido se maximizó partiendo de un oligómero de peso molecular de 1380 g/mol. Entre los diversos catalizadores basados en Sn, la fracción meso-lactido disminuyó cuando se usó SnO. La mayor conversión de lactido con el menor grado de racemización se obtuvo para una concentración de catalizador de 0.1% en peso.

El lactido viene acompañado de meso-lactido y otras impurezas tales como AL, oligómeros de bajo peso molecular y agua. El lactido fundido puede purificarse por recristalización en tolueno (Kaihara *et al.*, 2007; Yu *et al.* 2009).

En una segunda etapa, el lactido es polimerizado a PLA por apertura de anillo en presencia de un catalizador. El catalizador más empleado es el $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]$ ya que es aceptado por la Agencia de Medicamentos y Alimentación de EE.UU (FDA, Food and Drug Administration) debido a su alta reactividad, baja toxicidad y baja tasa de racemización del polímero (Kaihara *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009). Sin embargo, están surgiendo como alternativas valiosas nuevos sistemas catalíticos eficientes y libres de metales (Henton *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2012). Para sintetizar L-PLA o meso-PLA pueden utilizarse catalizadores quirales, tal como $\text{Al}(\text{OiPr})[(\text{R})\text{-(SalBinap)}]$, los cuales promueven una alta estereoselectividad durante el proceso de polimerización (Porter, 2006).

En la literatura se proponen dos mecanismos para la apertura de anillo que requieren de la participación de una especie con grupo —OH (agua, alcohol, ácido carboxílico).

El “mecanismo de coordinación-inserción” propone la formación de un complejo ternario entre el monómero, las especies que contienen el grupo —OH y el catalizador que es eliminado al final de la reacción (Fig. 6).

Por otra parte, en el “mecanismo de iniciación de alcóxido” el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ reacciona con especies portadoras de $-\text{OH}$ para formar un alcóxido que es la especie que inicia la polimerización. Por lo tanto, el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ y los grupos $-\text{OH}$ son el iniciador y coiniciadores respectivamente, a menudo indicados como catalizador y cocatalizador. La observación de macromoléculas que contienen grupos finales Oct-Sn-O- por MALDI-TOF y la dependencia

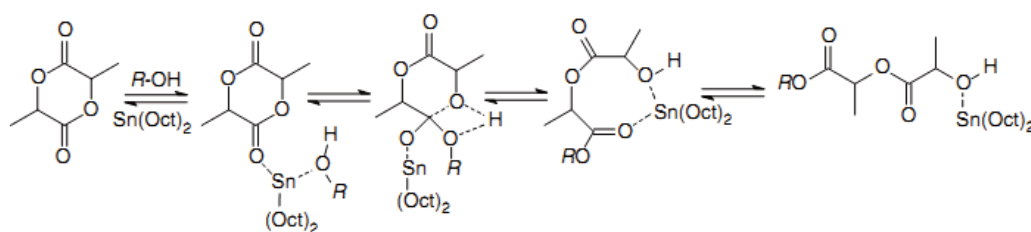


Fig. 6. Mecanismo de crecimiento de cadena de coordinación-inserción utilizando $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizador (Henton *et al.*, 2005).

de la velocidad de polimerización con la concentración de monómero, iniciador y coiniciador son evidencia sólida a favor de este mecanismo (Yu *et al.*, 2009).

Báez (2010) sintetizó PLA a partir de D,L-lactido comercial en presencia de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ disuelto en xileno como iniciador y alcohol bencílico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$) y nonanol [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{OH}$] como coiniciadores a una temperatura de $170\text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora con rendimientos entre 75 - 95%. Kaiara *et al.* (2007) sintetizaron PLA a partir de L-lactido comercial en presencia de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ disuelto en tolueno con rendimientos del 95% a una temperatura de $140\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 horas en atmósfera de nitrógeno. Al final de la polimerización, ambos autores disolvieron el PLA en cloroformo y emplearon la recristalización en metanol como método de separación y purificación. Para la caracterización del PLA emplearon ^1H RMN y Kaiara *et al.* (2007) además emplearon CLE. Kaiara *et al.* (2007) obtuvieron PLA de $\overline{M}_w = 100.000\text{ g/mol}$ mientras que el \overline{M}_n reportado por Báez (2010) fue de aproximadamente 3800 g/mol . Según lo reportado por Báez (2010),

el polímero obtenido en presencia de un alcohol como coiniador tiene apariencia física de polvo blanco y en ausencia de alcohol se obtiene un material con capacidad de formar hilos y películas delgadas.

La pureza (química y óptica) del AL y del lactido, así como las condiciones de polimerización (tiempo y temperatura de reacción, cantidad de catalizador, entre otras), determinarán las propiedades finales del PLA producido por apertura de anillo. El AL obtenido como producto de fermentación puede estar acompañado de azúcares, que aún en pequeñas cantidades, pueden polimerizar impidiendo el desarrollo de la reacción. (Li *et al.*, 2008). Por otra parte, un 0.05% en moles de impurezas tales como butanol o lactato de butilo presentes en el AL afectan la temperatura de degradación del polímero. De modo similar, la presencia de humedad en el lactido promueve su degradación y solventes residuales tales como acetato de etilo o tolueno, empleados para la purificación del lactido por recristalización, afectan el rendimiento de PLA (Inkinen *et al.*, 2011). En ausencia de coiniador, las impurezas ambientales tales como agua (humedad del AL, lactido y del aire) y especies ácidas, tienen un efecto importante en la cinética y el peso molecular. Se han realizado numerosos estudios sobre la influencia de factores tales como la concentración y el tipo de iniciador, la pureza del monómero y la temperatura en la síntesis de PLA (Henton *et al.*, 2005; Sin y Tueen, 2019).

Hasta el momento la bibliografía asociada al empleo de lactosuero como medio de fermentación para la obtención de AL y posterior síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido es escasa. Cuichán Guanoluisa (2015) y Cuervo Garcés y Echeverry Vargas (2016) obtuvieron PLA por fermentación discontinua de lactosuero desproteinizado por calor empleando cepas comerciales de *Lacticaseibacillus casei*, y las especies *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*; respectivamente. En ambos trabajos la fermentación se llevó a cabo a pH entre 5.5 y 6.5 empleando carbonato de sodio y calcio como agente neutralizante, respectivamente.

Cuichán Guanoluisa (2015) llevó a cabo la fermentación a 37 °C durante 21 horas enriqueciendo el medio con lactosa y sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄]. Para el seguimiento temporal de la fermentación se midieron azúcares reductores totales por la técnica de Felhing Causse y Bonnans (FCB). El autor no describe la metodología de recuperación y purificación del AL ni tampoco las condiciones de reacción empleadas durante la obtención de PLA. La caracterización de PLA involucró mediciones de propiedades mecánicas (tales como flexión y tracción) y ensayos de biodegradación. El tiempo de degradación medio resultó de 42.75 días.

Por otra parte, Cuervo Garcés y Echeverry Vargas (2016) realizaron la fermentación a 42 °C durante 96 horas empleando un método de extracción líquido-líquido con éter dietílico para la separación de AL. Para el seguimiento de la fermentación se midieron azúcares reductores totales mediante la técnica de FCB y acidez titulable. El lactido se obtuvo a partir de AL empleando H₂SO₄ como catalizador a 80 °C durante 35 minutos y luego una temperatura de 120 °C durante 2 horas. Seguidamente, se sintetizó PLA por apertura de anillo del lactido a 60 °C empleando SnCl₂ como catalizador y metanol como solvente durante 24 horas. Al final de la polimerización, se eliminó el metanol por evaporación a 70 °C, se lavó con acetona y se filtró al vacío. El PLA se caracterizó por FT-IR y difracción de rayos X (XRD).

1.10. Objetivos

En la actualidad existe la necesidad de evolucionar desde una economía centrada esencialmente en la utilización de recursos no renovables hacia un modelo basado en la bioeconomía. El uso de lactosuero en la producción de bioplásticos representa un elemento crucial en el desarrollo y la aplicación de una biorrefinería sostenible basada en residuos. En esta Tesis, se considera al lactosuero, rico en lactosa, un sustrato adecuado para generar AL y PLA, mediante fermentación y posterior polimerización química, con la utilización de BAL autóctonas aisladas de la región centro del país y empleando tecnología de membranas para la separación y purificación de AL.

El **objetivo general** de esta Tesis es desarrollar procesos integrados y sustentables que permitan aumentar el valor industrial/comercial del lactosuero (residuo y/o subproducto de la industria lechera) para su aplicación en la síntesis de biopolímeros de interés industrial y reducido impacto medioambiental.

Para tender al logro de este objetivo general, se plantea la investigación y estudio de los siguientes **objetivos específicos**:

- A. Aislamiento e identificación de cepas silvestres de BAL de la región centro del país que posean capacidad de acidificar los sustratos (lactosuero y leche cruda) y resistencia a la acidez similar o superior a las cepas comerciales.
- B. Estudio de la fermentación de lactosuero empleando las BAL aisladas e identificadas (cultivos monoclonales y consorcios).
- C. Desarrollo de técnicas de caracterización cromatográficas para el monitoreo de la fermentación.
- D. Separación, purificación y concentración de AL empleando tecnología de membranas.
- E. Síntesis de PLA por apertura de anillo a partir del AL obtenido por fermentación en comparación a una solución de AL comercial.
- F. Caracterización estructural y térmica del polímero. Aplicación tecnológica.



2. Materiales y Métodos

El trabajo experimental involucró básicamente las siguientes etapas: i) búsqueda o “screening” de BAL, ii) obtención de AL por fermentación de lactosuero, y iii) síntesis y caracterización de PLA.

En una primera etapa se aislaron, purificaron, identificaron y conservaron 25 cepas de BAL obtenidas de muestras de sueros frescos, 20 cepas de BAL de muestras de leche cruda y 3 cepas de BAL a partir de muestras de leche agria (potencialmente útiles). Luego se seleccionaron y caracterizaron 5 cepas (de las 48) que revelaron tener mejor capacidad acidificante. En una segunda etapa, las cepas de interés tecnológico fueron empleadas para la obtención de AL por fermentación de lactosuero, en comparación con una cepa testigo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. El AL se recuperó del mosto de fermentación, se purificó y se concentró para ser empleado en la síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido.

A continuación, se describen los materiales y cada una de las etapas.

2.1. Materiales Empleados

2.1.1. Microorganismo testigo: cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC N° 11842, que representa a una subespecie de *Lactobacillus* con buena capacidad de producción de AL a partir de lactosuero. BAL termófila, homofermentante y productora de L-ácido láctico.

2.1.2. Materiales y Reactivos: agua destilada, agar Man Rogosa Sharpe (Agar MRS, Britania), caldo Man Rogosa Sharpe (Caldo MRS, Britania), peptona de carne (Britania), Kit de Gram (Britania), ácido fosfórico 50% p/p (H_3PO_4 , Cicarelli), hidróxido de amonio 28% p/p (NH_4OH , Anedra), extracto de levadura (Merk), triptona (Merk), Tween 80 (Sigma-Aldrich), leche en polvo descremada con un contenido de carbohidratos de 52 g/L (La Serenísima), lactosuero en polvo (Santa María) con un contenido de lactosa de 80% p/p, hidróxido de sodio (NaOH, Cicarelli, 97% de pureza), hidróxido de potasio (KOH, Cicarelli, 97% de pureza), soluciones de NaOH 1 N (Cicarelli) y NaOH 0.1 N (Cicarelli), solución de

ácido clorhídrico 0.1 N (HCl, Anedra), AL ($C_3H_6O_3$, Cicarelli, 85 - 90% de pureza), etanol pro-análisis (CH_3CH_2OH , Cicarelli, 99.5% de pureza), lactosa monohidratada ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, Cicarelli), dicloruro de estaño ($SnCl_2$, Cicarelli), 2-etilhexanoato de estaño (II) [$Sn(Oct)_2$, Cicarelli], xileno (C_8H_{10} , Cicarelli), cloroformo ($CHCl_3$, Cicarelli), metanol (CH_3OH , Cicarelli), tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$, Cicarelli), sulfato de cobre cristalino ($CuSO_4$, Cicarelli), ferrocianuro de potasio [$K_4Fe(CN)_6$, Cicarelli], sulfato de zinc ($ZnSO_4$, Cicarelli), biftalato de potasio ($KC_8H_5O_4$, Cicarelli), fenolftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$, Cicarelli), azul de metileno ($C_{16}H_{18}N_3ClS$, Cicarelli).

2.1.3. Soluciones

- *Solución de azul de metileno* ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) 1%: se disolvió 1 g de azul de metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) en 100 mL de alcohol etílico (CH_3CH_2OH) absoluto y se agitó hasta total disolución.
- *Solución o reactivo de FCB*: se disolvieron por separado 130 g de tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$), 110 g de hidróxido de sodio (NaOH), 24 g de sulfato de cobre cristalino ($CuSO_4$) y 16.8 g de ferrocianuro de potasio [$K_4Fe(CN)_6$] en unos 200 mL de agua destilada para luego mezclarlos en un matraz de 1 L. Se llevó a volumen con agua destilada, se dejó reposar por 24 horas y luego se filtró.
- *Soluciones defectantes de Somogyi*: para la preparación de la solución de *Somogyi I* se disolvieron 12 g de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) en 100 mL de agua destilada agitando vigorosamente hasta total disolución. Para la preparación de la solución de *Somogyi II* se disolvieron 1.25 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 100 mL de agua destilada agitando vigorosamente hasta total disolución. Ambas soluciones se conservaron en frasco color caramelo.
- *Solución alcohólica de KOH 0.1 N*: se disolvieron 5.6 g de KOH en 1 L de alcohol etílico (CH_3CH_2OH) absoluto y se dejó reposar durante 24 h en un recipiente cerrado.

Luego se filtró y se estandarizó empleando biftalato de potasio ($\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$) como patrón primario y fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$) como indicador.

- *Solución de 2-etilhexanoato de estaño (II) [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$] 0.123 M en xileno*: se pesaron aproximadamente 5 g de 2-etilhexanoato de estaño $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ y se disolvieron en 100 mL de xileno. Se conservó en frasco color caramelo.

2.2. Búsqueda de BAL

Se tomaron 50 mL de la producción del día de 5 sueros y 4 leches en envases recolectores estériles y se conservaron a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su uso (dentro de las 24 h luego de la toma de muestra). Los sueros frescos provenientes de la elaboración de quesos cremosos fueron suministrados por las empresas Lácteos Santa María SRL (San Francisco, Córdoba), Lácteos Ramolac (Ramona, Santa Fe), Manfrey Cooperativa de Tamberos Ltda. (Freyre, Córdoba), SanCor Cooperativas Unidas Ltda. (Devoto, Córdoba), Lácteos Don Silvano (Josefina, Santa Fe); y las muestras de leche por las empresas La lecherita. Lácteos República de Entre Ríos SRL (Nogoyá, Entre Ríos), Capyc Cooperativa Agropecuaria Productores y Consumidores Ltda. (Devoto, Córdoba), Lácteos HerBal (Porteña, Córdoba) y un tambo de la zona rural cercana a San Francisco (Córdoba). Además, una muestra de leche proveniente de un tambo de Balnearia (Córdoba), que provee leche a la empresa Lácteos HerBal, se recolectó en envase estéril y se dejó a temperatura ambiente durante 48 h para su acidificación.

Para la búsqueda de BAL potencialmente útiles (búsqueda o “screening” primario) se aislaron, purificaron, identificaron y conservaron 25 cepas de BAL obtenidas de 5 muestras de sueros frescos, 20 cepas de BAL obtenidas de 4 muestras de leche cruda y 3 cepas de BAL (potencialmente más competitivas) a partir de 1 muestra de leche agria. Se adoptó la siguiente denominación para cada una de las cepas aisladas de acuerdo a su procedencia: SM1, SM2, SM3 SM4 y SM5 (Santa María SRL); R1, R2, R3, R4 y R5 (Lácteos Ramolac); M1, M2, M3, M4 y M5 (Manfrey Cooperativa de Tamberos Ltda.); Sc1, Sc2, Sc3, Sc4 y Sc5 (SanCor

Cooperativas Unidas Ltda.); J1, J2, J3, J4 y J5 (Lácteos Don Silvano); L1c1, L1c2, L1c3, L1c4 y L1c5 (La lecherita); L2c1, L2c2, L2c3, L2c4 y L2c5 (Capyc Cooperativa Agropecuaria Productores y Consumidores Ltda.); L3c1, L3c2, L3c3, L3c4 y L3c5 (Lácteos HerBal); L4c1, L4c2, L4c3, L4c4 y L4c5 (tambo de la zona rural cercana a San Francisco); y Lac2, Lac3 y Lac5 (leche acidificada proveniente de un tambo de Balnearia).

De las 48 cepas de interés potencial se seleccionaron 5 BAL de interés tecnológico (búsqueda o “screening” secundario). A continuación, se describen cada una de las búsquedas.

2.2.1. “Screening” Primario

La metodología empleada para el aislamiento, purificación, identificación y conservación de las BAL potencialmente útiles se muestra en la Fig. 7.

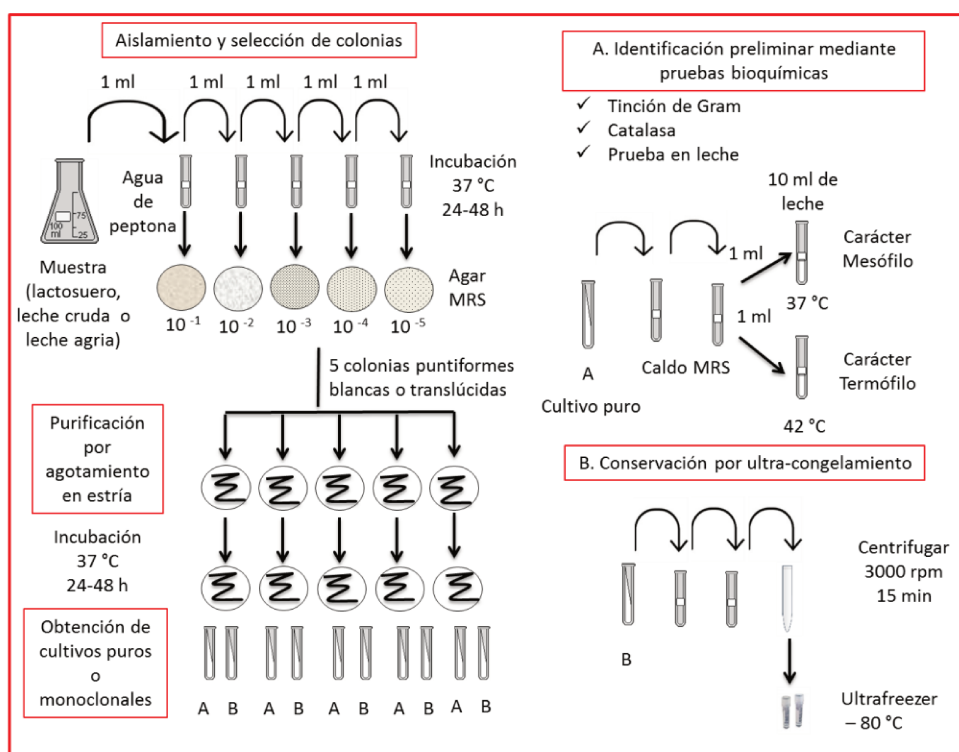


Fig. 7. Metodología de obtención de los aislados de BAL.

Para el aislamiento se prepararon diluciones seriadas 1/10 (10^{-1} a 10^{-5}) en agua peptonada (1 g/L) y se sembró 1 mL de cada una de ellas en placas de Petri con Agar MRS, incubándolas durante 24 - 48 h a 37 °C. Se escogieron 5 colonias puntiformes, blancas o translúcidas, que se sometieron a una doble purificación mediante la técnica de siembra en estrías en placas de Agar MRS. A partir de cada una de las cepas purificadas se realizaron resiembras en tubos con Agar MRS distribuido en forma de pico de flauta, que se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 h a fin de obtener cultivos puros o monoclonales para los ensayos posteriores. La generación de gas, puesta de manifiesto por el desplazamiento del medio agarizado hacia arriba dentro del tubo de ensayo, permitió reconocer el comportamiento metabólico heterofermentante (Fig. 8).



Fig. 8. Cultivo puro heterofermentante en tubo con agar MRS.

2.2.1.1. Identificación mediante pruebas sencillas

Las pruebas bioquímicas realizadas constituyeron un primer paso para la identificación preliminar de los aislados como pertenecientes al grupo de las BAL. Estos ensayos fueron los siguientes: tinción de Gram, prueba de la catalasa (es característico de las BAL ser aerotolerantes y catalasa negativas) y prueba de propagación de los aislados en leche a 37 °C y 42 °C, determinando así su temperatura óptima de producción y desarrollo.

Para la preparación del inóculo de la prueba de propagación en leche se tomó material celular con ansa ojal de las estrías de los tubos A (Fig. 7) y se realizaron dos resiembras consecutivas en 10 mL de Caldo MRS, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

Para la reconstitución de la leche se preparó una solución de 100 g/L con agua destilada y se esterilizó a vapor fluente durante 30 minutos. Luego se sembraron 2 tubos de ensayo conteniendo 10 mL de leche estéril con 1 mL de inóculo y se incubaron a 37 °C y 42 °C, durante 24 - 48 h. Las BAL que fueron consideradas mesófilas, se caracterizaron por la rápida formación de un coágulo que se observó más definido en el tubo a 37 °C, en comparación con el que se formó a 42 °C, observándose lo opuesto para las BAL que fueron consideradas termófilas.

2.2.1.2. Conservación de las cepas aisladas

Para la conservación se tomó material de las colonias del tubo en pico de flauta B (Fig. 7) y se realizaron 2 resiembras consecutivas en 10 mL de Caldo MRS, incubando a 37 °C durante 24 h y un cultivo “overnight” de 12 h. Luego se centrifugó el último cultivo a 3000 rpm durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 5 mL de Caldo MRS con el agregado de un 15% (v/v) de glicerol. Estas suspensiones celulares concentradas se distribuyeron en tubos Eppendorf y en crioviales para su conservación a -80 °C en ultrafreezer.

2.2.2. “Screening” Secundario

Se determinó la capacidad acidificante de las 48 cepas conservadas y de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* empleada como testigo. Se seleccionaron y caracterizaron 5 cepas que demostraron tener la mejor capacidad acidificante en comparación con la cepa testigo en cultivos desarrollados en leche en polvo rehidratada y estéril.

2.2.2.1. Capacidad acidificante

Para la preparación del inóculo se sembró 1 mL de los conservados en tubos Eppendorf en 10 mL de Caldo MRS, se incubó a 37 °C durante 24 h y luego se realizó una resiembra en las mismas condiciones. Para cada una de las cepas se inocularon 6 frascos conteniendo 100 mL de leche estéril con 1 mL de inóculo, el que poseía una concentración

celular comprendida entre 1×10^8 y 1×10^9 UFC/mL (Fig. 9). Se midió la acidez titulable y el valor de pH a 0, 8, 24 y 48 h de incubación a 37 °C y 42 °C. Se empleó un pHmetro marca HANNA y un electrodo HI 8424 para medir el pH.



Fig. 9. Capacidad acidificante: frascos con 100 mL de leche estéril y 1 mL de inóculo.

Para la medición de acidez se titularon 10 mL de muestra con NaOH 0.1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

La acidez titulable, expresada como g/L de AL, se determinó aplicando el siguiente cálculo [ec. (7)]:

$$\text{Acidez Titulable (g/L)} = 0.9 \times (V - V_B) \times N \times f \quad (7)$$

donde V es el volumen (mL) gastado de NaOH 0.1 N en la titulación, V_B es el volumen (mL) gastado de NaOH 0.1 N en el blanco (acidez del precultivo), N es la normalidad de la solución NaOH y f el factor de corrección para la solución de NaOH.

2.2.2.2. Caracterización Taxonómica

Para la caracterización de las bacterias se empleó un espectrómetro de masas del tipo Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight (MALDI-TOF) marca SHIMADZU iD plus PERFORMANCE (Fig. 10).

En el ensayo se comparó el espectro de masas de los aislados con espectros de referencia de una base de datos teórica mundial denominados “Super Espectros” resultando la identificación con un nivel de confianza entre el 75% y 99% (Jadhav *et al.*, 2015).



Fig. 10. Equipo SHIMADZU iD plus PERFORMANCE de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los “Super Espectros” resultan de masas de aislados identificados por métodos ampliamente aceptados tales como fenotipado bioquímico, análisis de ARN 16s o mecanografía de secuencia de locus múltiples (Multi Locus Secuency Typing, MLST).

2.3. Obtención de AL por fermentación de lactosuero

Se llevaron a cabo 8 fermentaciones empleando como inóculo las 5 cepas seleccionadas, la cepa testigo y 2 consorcios integrados por 2 de las cepas seleccionadas a fin de favorecer la sinergia entre las BAL.

2.3.1. Preparación del mosto

Se preparó una solución con un contenido de lactosa de 4.5% a partir de 56 g de suero en polvo y 800 mL de agua destilada en un frasco autoclavable de 1L. El pH se ajustó a 4.25

± 0.05 con una solución de ácido fosfórico 50% (por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas, $pI = 4.6$), y se esterilizó a vapor fluente. Las proteínas precipitadas se separaron por filtración al vacío. El suero desproteinizado se enriqueció con extracto de levadura (20 g/L) y triptona (10 g/L) como fuente de nitrógeno y se adicionó 1 g/L de Tween 80 como antiespumante. Finalmente se ajustó a $pH 6 \pm 0.5$ con solución de NaOH 1 N.

2.3.2. Reactivación de cepas y preparación del inóculo

Para cada una de las 5 cepas seleccionadas y la cepa testigo se sembró 1 mL del conservado en 10 mL de Caldo MRS, y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Luego se realizó una resiembra en las mismas condiciones. El precultivo se sembró luego, en 100 mL de mosto y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para ser empleado como inóculo en el fermentador. Para los consorcios se sembraron 1 mL de cada conservado en 5 mL de Caldo MRS que se emplearon como inóculo de 100 mL de mosto.

2.3.3. Fermentación

Para las fermentaciones se empleó un fermentador de vidrio de 1L con tapa de acero inoxidable equipado con agitador mecánico, termómetro digital, manómetro, calefacción externa mediante recirculación de agua proveniente de un baño termostatzado, controlador de pH, y reservorio con solución de NH_4OH 28% p/p para el ajuste de pH mediante apertura de válvula solenoide (Fig. 11).

Se trabajó a la temperatura óptima de desarrollo de cada BAL y $pH 6 \pm 0.5$. El tiempo de fermentación fue de 33 h. Se tomaron muestras de 10 mL cada 3 h empleando aguja y jeringa estériles.

A lo largo de las fermentaciones se cuantificó lactosa mediante la técnica de FCB y se empleó cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID) para la caracterización de los compuestos presentes en el mosto de fermentación. Los compuestos al final de 2 de las fermentaciones fueron analizados además por espectrometría de masas (GC-

MS) y por CCD a fin de comprobar la presencia del ácido orgánico y su sal (AL y lactato de amonio).



Fig. 11. Sistema de fermentación (A: controlador de pH, B: agitador mecánico, C: fermentador, y D: baño termostatzado).

Para el análisis de las muestras por CG se inactivaron los microorganismos por tratamiento térmico a baño María (100 °C) durante 30 min. y luego se separaron por

centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se ajustó a pH 3 a fin de garantizar la presencia de la especie no disociada.

Todas las fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado excepto la correspondiente a la cepa testigo.

2.3.3.1. *Determinación de azúcares reductores totales - Método volumétrico de Fehling, Causse y Bonnans (FCB)*

La lactosa es oxidada por el cobre presente en el reactivo de FCB a temperatura de ebullición con formación de un complejo cupro-tartrato-sódico-potásico. La reducción se efectúa en condiciones alcalinas a fin de mejorar el poder reductor de la lactosa.

Se debe realizar una desproteinización de la muestra previo a la titulación. En un matraz de 100 mL se colocaron 10 mL de mosto de fermentación, 60 mL de agua destilada, 2 mL de solución *Somogyi I* y 2 mL de solución *Somogyi II* bajo agitación suave luego de cada agregado. Luego de 2 minutos de reposo se llevó a volumen con agua destilada. Se homogeneizó, y se filtró el sobrenadante luego de 24 h de reposo hasta obtener un filtrado límpido.

Como el método es no estequiométrico, no se conoce con exactitud la relación de moles entre el ion Cu^{2+} y los azúcares reductores, lo que presenta una dificultad a la hora de realizar los cálculos. Esto se evita determinando el título del reactivo de FCB (X). En este sentido se preparó una solución patrón de lactosa a partir de 500 mg de lactosa monohidratada (m) en 100 ml de agua destilada. La solución de lactosa se colocó en una bureta de vástago acodado y se procedió a la titulación en ebullición de 15 mL de reactivo de FCB en 50 mL de agua destilada contenidos en un Erlenmeyer de 250 mL empleando azul de metileno como indicador. El título X corresponde a los mg de lactosa necesarios para reducir el reactivo (15 mL) y se obtuvo a partir de la siguiente expresión [ec. (8)]:

$$X = \frac{m \times V}{100} \quad (8)$$

donde m es la masa de lactosa empleada y V (mL) es el volumen de la solución patrón de lactosa gastado en la titulación.

De modo similar, la muestra desproteïnizada se colocó en la bureta de vástago acodado y se procedió a la titulación en ebullición de 15 mL de reactivo de FCB (de título X) en 50 mL de agua destilada contenidos en un Erlenmeyer de 250 mL empleando azul de metileno como indicador.

Los resultados se calcularon empleando la sig. expresión [ec. (9)]:

$$\text{g lactosa/100 mL} = \frac{X \times 100 \times F}{V} \quad (9)$$

donde X es el título del reactivo de FCB, V (mL) es el volumen de la solución desproteïnizada gastado en la titulación y F es el factor de dilución ($F = 10$).

Al tratarse de un método no estequiométrico se deben utilizar iguales volúmenes de reactivo FCB, la misma temperatura de calentamiento, concentraciones de azúcar similares, y el mismo tiempo de reacción. Sólo así las determinaciones serán comparables y los análisis reproducibles. La determinación debe efectuarse durante los dos primeros minutos de ebullición. Caso contrario, se cometen errores.

Para incrementar la exactitud de los resultados se realizó una primera titulación orientativa para conocer el rango aproximado de azúcar reductor en las muestras. El Erlenmeyer con la solución de FCB se llevó a franca ebullición y se comenzó a agregar con rápido goteo el titulante. Cuando la solución de FCB cambió de color azul a azul claro se agregaron 2-3 gotas de azul de metileno y se continuó la titulación hasta viraje del indicador al amarillo. Luego, se realizó la titulación “exacta” donde se agrega el azul de metileno al inicio de la titulación y se deja caer rápidamente un volumen 2 mL menor al volumen gastado en la titulación orientativa y se prosigue lentamente hasta su decoloración.

2.3.3.2. Cromatografía de Gases

Se empleó un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, modelo Clarus 600, con detector fotométrico de llama (GC-FID), inyector programables Split/Splitless (PSS), bajo las siguientes condiciones de análisis: tipo de columna, DB 5 (Agilent Tech. 122-5552, 5% fenil metil silicona 95%); largo de columna, 50 m; diámetro de columna, 0.25 mm, y película de 0.25 μm . La separación cromatográfica se realizó con una rampa de calentamiento del horno de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$., partiendo de una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min. hasta una temperatura de 240 $^{\circ}\text{C}$, manteniendo luego esta temperatura durante 16 min. La temperatura del inyector fue de 260 $^{\circ}\text{C}$ y la correspondiente al detector de 300 $^{\circ}\text{C}$. El gas transportador utilizado fue nitrógeno (1.5 mL/min). Se usó una válvula de inyección automática para inyectar 1 μL de la muestra en el flujo de gas, que lo llevó a través de la columna al detector.

2.3.3.3. *Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)*

Se empleó un cromatógrafo gaseoso marca Perkin Elmer, modelo Clarus 600 acoplado a un Espectrómetro de Masas Clarus 600T. Para la ionización de la muestra (por impacto electrónico a 70 eV) el equipo posee un filamento de renio, el analizador es un cuadrupolo simple y el detector un fotomultiplicador electrónico. Tipo de columna Elite-5; largo de columna, 30 m; diámetro de columna, 0.25 mm, y película 0.25 μm . El gas transportador fue helio a un caudal de 1 mL/min. El programa de calentamiento fue el mismo que el correspondiente al GC-FID. La detección de los compuestos fue realizada mediante ionización por impacto. Los datos fueron adquiridos a una velocidad de 3 espectros a lo largo de un rango de barrido de 40 - 500 uma. Los compuestos fueron identificados por comparación de los espectros obtenidos con los correspondientes a la librería de espectros NIST 2008 (versión 2.2).

2.3.3.4. *Cromatografía de Capa Delgada (CCD)*

Se sembró una placa de gel de sílice con una gota de muestra y se llevó a una cuba cromatográfica conteniendo hexano y acetato de etilo en relación 1:2. Se empleó solución de permanganato de potasio 0.1 N como revelador químico.

2.3.4. Recuperación, purificación y concentración del AL obtenido por fermentación

Al final de cada fermentación las células se inactivaron por tratamiento térmico a baño María y se separaron por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. en una centrífuga Rolco de 12 vasos de 60 mL. Los mostos agotados (sin microorganismos) de cada fermentación se mezclaron y se conservaron en un frasco a temperatura de refrigeración (4°C).

El mosto agotado se ajustó a pH 3 con solución de HCl 1 N a fin de desplazar el equilibrio de disociación del ácido orgánico hacia la especie no disociada (pK_a ácido láctico = 3.86).

Para la purificación (por nanofiltración) y concentración (por ósmosis inversa) de la solución de AL se empleó un sistema integrado por un reservorio que contiene la muestra a filtrar, un equipo de filtración de flujo cruzado SEPA CF Cell con un área efectiva de filtración de 142 cm² (22 pulgadas²), una bomba de vacío y un reservorio para el filtrado.

Para la nanofiltración del mostro agotado se emplearon membranas de poliamida de tamaño de poro entre 200 y 400 Dalton y un 94% de rechazo hacia el sulfato de magnesio (TriSep Flat Sheet Membrane, TS80, PA, NF, Sepa, 5/Pk). Durante este proceso se trabajó con una presión de bomba de 30 bar durante 8 h y agitación del filtrado de 200 rpm. Las membranas se lavaron cada 2 horas con agua destilada a fin de favorecer la desobstrucción de los poros y el buen funcionamiento del equipo.

Posteriormente, para la concentración de la solución de AL se llevó a cabo un proceso de ósmosis inversa con membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro de aproximadamente 100 Dalton y un 97% de rechazo hacia el cloruro de sodio (GE Osmonic Flat Sheet Membrane CE, RO, Sepa, 5/Pk). Durante este proceso se trabajó con una presión de bomba de 40 bar durante 8 h. Los problemas de obstrucción de membrana hicieron que la

concentración de AL se continúe en un equipo de evaporación rotatoria a una temperatura de 40 °C, una presión de 50 mm Hg y una velocidad de rotación de 95 rpm.

La concentración de la solución de AL se determinó por titulación con NaOH 0.1 N empleando fenolftaleína como indicador. Además, se empleó CG-MS a fin de verificar la eficiencia del proceso de eliminación de impurezas (volátiles) de PM superiores a 200 - 400 Dalton generadas durante el proceso fermentativo. Para el análisis por GC-MS se adoptó el equipamiento y metodología descriptos en la sección 2.3.3.3.

2.4. Síntesis y Caracterización de PLA

Se llevaron a cabo dos experimentos. En uno de los experimentos se empleó la solución de AL 80% obtenida por fermentación (Exp. 1) y en el otro experimento una solución de AL comercial 85-90% (Exp. 2).

La obtención de PLA involucró básicamente 3 etapas: i) la síntesis del oligómero por condensación de AL, ii) la síntesis del dímero lactido por depolimerización del oligómero, y iii) la síntesis de PLA por apertura de anillo del lactido.

2.4.1. Síntesis del oligómero

Se colocaron 50 g de solución de AL en un balón de 3 bocas provisto de refrigerante y agitador magnético con calefacción. La reacción se llevó a cabo a 180 °C y se empleó corriente de nitrógeno durante las primeras 6 horas (oligómero A) y vacío por otro período de 6 horas (oligómero B). Se trabajó con corriente de nitrógeno para mejorar la eliminación de agua (Codari, 2011) y para evitar el ingreso de oxígeno al sistema el cual produciría una caída en la actividad de la reacción y un polímero coloreado (Köhn *et al.*, 2003).

En la Fig. 12 se muestra el sistema de reacción para la etapa bajo vacío a fin de favorecer la eliminación de agua y el incremento del peso molecular del oligómero.



Fig. 12. Sistema de reacción empleado para la oligomerización/depimerización bajo vacío.

Para el monitoreo de la reacción se midió el índice de acidez (IA).

2.4.1.1. Índice de Acidez

Una muestra de masa m (g) se pesó (0.15 g para la solución de AL y 0.5 g para los oligómeros A y B) y se disolvió en 20 mL de una solución iso-propanol/tolueno (1:1). La acidez de la muestra se tituló con KOH alcohólico 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador.

El IA se determinó aplicando el siguiente cálculo [ec. (10)]:

$$IA \text{ (mg KOH / g)} = \frac{56.1 \times N \times V \times f}{m} \quad (10)$$

donde N es la normalidad, V es el volumen (mL) gastado y f es el factor de corrección de la solución de KOH 0.1 N.

2.4.2. Síntesis de lactido

Para la síntesis de lactido se empleó el sistema de reacción de la Fig. 12 adoptando la metodología descrita por Upare *et al.* (2012) bajo vacío. El oligómero B contenido en el balón de reacción se depolimerizó a 210 °C durante 5 horas bajo vacío empleando 0.5% p/p de SnCl₂ como catalizador.

El lactido se obtuvo por sublimación inversa adherido en forma de cristales con forma de aguja a las paredes del refrigerante y del balón de destilación y se retiró con la ayuda de una espátula de acero inoxidable (Fig. 13).



Fig. 13. Síntesis de lactido: extracción mecánica de los cristales en forma de aguja.

2.4.3. Síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido

Para la síntesis de PLA se empleó el sistema de reacción de la Fig. 14. Se adoptó la metodología y condiciones de reacción reportadas por Báez (2010). En un balón de 25 mL de una boca provisto de refrigerante y agitador magnético se pesaron 4.3 g de lactido y se adicionaron 0.2 mL de alcohol bencílico y 1 mL de solución Sn(Oct)₂ 0.123 M. La reacción de polimerización se llevó a cabo bajo agitación (300 rpm), a temperatura de reflujo de 170 °C durante una hora.



Fig. 14. Sistema de reacción para la síntesis de PLA por apertura de anillo del dímero lactido.

El crudo de reacción caliente se vertió en un vaso de precipitado bajo campana de extracción de gases y se dejó enfriar. El resto del polímero que quedó adherido a las paredes del balón se disolvió en un volumen mínimo de cloroformo (5 ml) y se añadió al vaso de precipitado conteniendo el polímero. El polímero se recuperó por recristalización en exceso de metanol frío (50 ml). Los cristales de polímero se filtraron y secaron en estufa de vacío a 25 °C hasta pesada constante. El PLA exhibió apariencia de polvo blanco en concordancia a lo reportado por Baéz (2010) (Fig. 15).

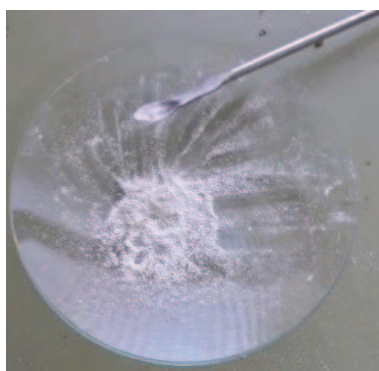


Fig. 15. PLA recuperado por recristalización y secado en estufa de vacío.

2.4.4. Caracterización del lactido, oligómeros y polímero

Se emplearon técnicas espectroscópicas (FT-IR y ^1H RMN) para determinar la estructura molecular del lactido, oligómeros y PLA, y cromatográficas (CLE) para estimar las distribuciones de PM y los PM medios. Para la caracterización térmica del PLA obtenido por fermentación (Exp. 1) se empleó DSC y TGA.

2.4.4.1. FT-IR

Se empleó un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier ThermoScientific Nicolet IN 10 (Waltham, MA, USA) en la región de número de onda de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Se prepararon pastillas de KBr conteniendo 2 - 3% p/p de muestra seca.

2.4.4.2. ^1H RMN

Los espectros de ^1H RMN fueron adquiridos en un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker UltraShieldTM 400 (Bruker, Alemania) a 400 MHz, empleando cloroformo deuterado como disolvente para las muestras secas. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. Para el análisis de los espectros se empleó el software del equipo (Mestre-C).

2.4.4.3. CLE

Se empleó un Cromatógrafo Líquido Waters Breeze compuesto por una bomba modelo binaria 1525 con un inyector automático Waters 717 plus, acoplado a un set de columnas Styragel HR 4E (7.8 x 300 mm) con un detector de índice de refracción diferencial (modelo 2414) modelo 410 ($T = 30\text{ }^\circ\text{C}$). Se empleó THF como fase móvil a 1 mL/min. Las muestras se disolvieron en THF (0.1% p/p), y los volúmenes de inyección fueron de 20 μL . La temperatura del sistema fue de $25\text{ }^\circ\text{C}$. Para la calibración universal se emplearon patrones de PS SHODEX SM-105 (Lote 90601, certificado por Showa Denko K. K.) de masa molar de 1200, 3070, 7210, 19600, 55100, 275000 y 133000 g/mol.

2.4.4.4. DSC

La T_g se determinó en un equipo de calorimetría diferencial de barrido Q2000 conectado a un enfriador RCS 90. Se pesaron 6.2 mg de muestra que fueron calentados desde 0 a 180 °C y luego enfriados a 25 °C para eliminar la historia térmica del material y restos de humedad. Luego, la muestra fue calentada nuevamente desde -90 hasta 180 °C a una velocidad de 10 °C/min.

2.4.4.5. TGA

La estabilidad térmica del PLA se estudió en un analizador termogravimétrico dinámico Mettler Toledo TGA/SDTA851e/LF/1100 con aire como gas de purga. Se pesaron 1.8 mg de muestra en crisoles de platino que fueron calentados desde 20 °C a 600 °C a una velocidad de 10 °C/min.

3. Resultados y Discusión

3.1. Aislamiento e identificación de Bacterias Ácido Lácticas silvestres de la región Centro

Los aislados de BAL mostraron morfología de cocos o bacilos y formas de agrupación variadas tales como cadenas cortas, en pares o agrupación irregular, y en su mayoría resultaron ser mesófilos y homofermentantes. Todos los aislados mostraron ser Gram positivos, catalasa negativos y aerotolerantes. Los lactococos resultaron más rápidos para acidificar que los lactobacilos, pero estos últimos fueron más resistentes a la acidez.

Las BAL con mayor capacidad acidificante y resistencia a la acidez producida, que al mismo tiempo demostraron mayor rapidez en la disminución de pH, resultaron ser las cepas denominadas Sc3, Lac2, L2c2 y L4c2 (lactobacilos) y R3 (lactococos).

En la Tabla 6 se muestran las principales características de estos aislados en comparación con la cepa testigo. Todos los aislados resultaron mesófilos. La cepa L4c2 presentó metabolismo heterofermentante mientras que en el resto de las cepas no se observó desprendimiento de gas.

Tabla 6. Características de los aislados de BAL y de la cepa testigo (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*).

Cepa	Morfología	Desprendimiento de gas	Propagación en leche		Capacidad Acidificante			
					Δ pH ^a		Acidez titulable ^b (g/L)	
			37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
Sc3	Bacilos	-	++	+	2.50	2.50	0.96	1.22
Lac2	Bacilos	-	++	+	1.58	1.55	0.40	0.44
L2c2	Bacilos	-	++	+	2.60	2.50	1.04	0.97
L4c2	Bacilos	+	++	+	2.22	2.18	0.96	0.60
R3	Cocos	-	++	+	1.68	1.63	0.85	1.18
Cepa testigo	Bacilos	-	— ^c	++	— ^c	2.62	— ^c	1.62

^a Δ pH= pH (48 h) - pH inicial, ^b medición a 48 h, y ^c bacteria termófila.

Además, en la Fig. 16 y Fig. 17 se muestran las correspondientes evoluciones de acidez titulable y disminución de pH para las cepas seleccionadas. Por otra parte, en la Fig. 18 se muestra la evolución de acidez titulable y disminución de pH para la cepa testigo.

Los aislados Sc3, L2c2 y L4c2 exhibieron una disminución de pH comparable a la cepa testigo (Tabla 6) y los aislados Lac2 y R3 mayor rapidez de acidificación [Fig. 16 c)-d), Fig.16 i)-j) y Fig. 18 a)] y menor acidez producida (Tabla 6).

Las características del resto de los aislados, las mediciones de acidez titulable (g/L) y la evolución temporal de pH se muestran en las correspondientes Tabla A.1 y Figs. A.1 - A.10 del Anexo.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la caracterización taxonómica de los aislados con mayor capacidad acidificante. La identificación a nivel de género o especie se hizo con un nivel de confianza igual o superior al 75% (Jadhav *et al.*, 2015). El aislado L2c2 corresponde a una cepa de *Lactobacillus pentosus* o *Lactiplantibacillus plantarum*. Las especies de *Lactobacillus pentosus* y *Lactiplantibacillus plantarum* están estrechamente relacionadas genotípicamente (Torriani *et al.*, 2001) lo que imposibilita su identificación por MALDI TOF.

Los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* pertenecen al Phylum Firmicutes y son bacterias Gram (+) con bajo contenido de Guanina y Citosina (G+C).

Las BAL del género *Lactobacillus* son consideradas GRAS (generalmente reconocidas como seguras) por la OMS para su empleo en la alimentación humana y animal.

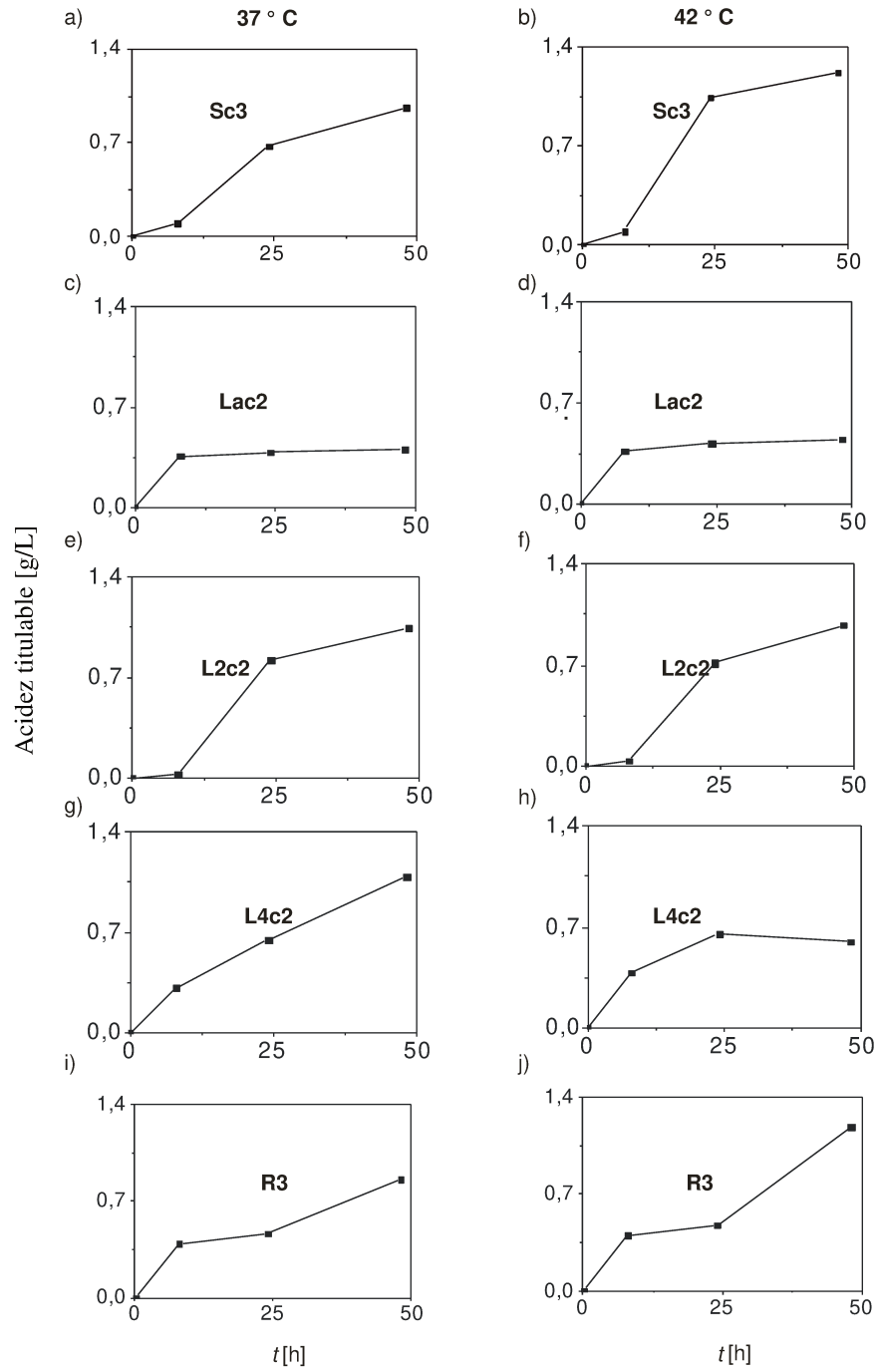


Fig. 16. Cepas de BAL seleccionadas: Evolución temporal de acidez titulable.

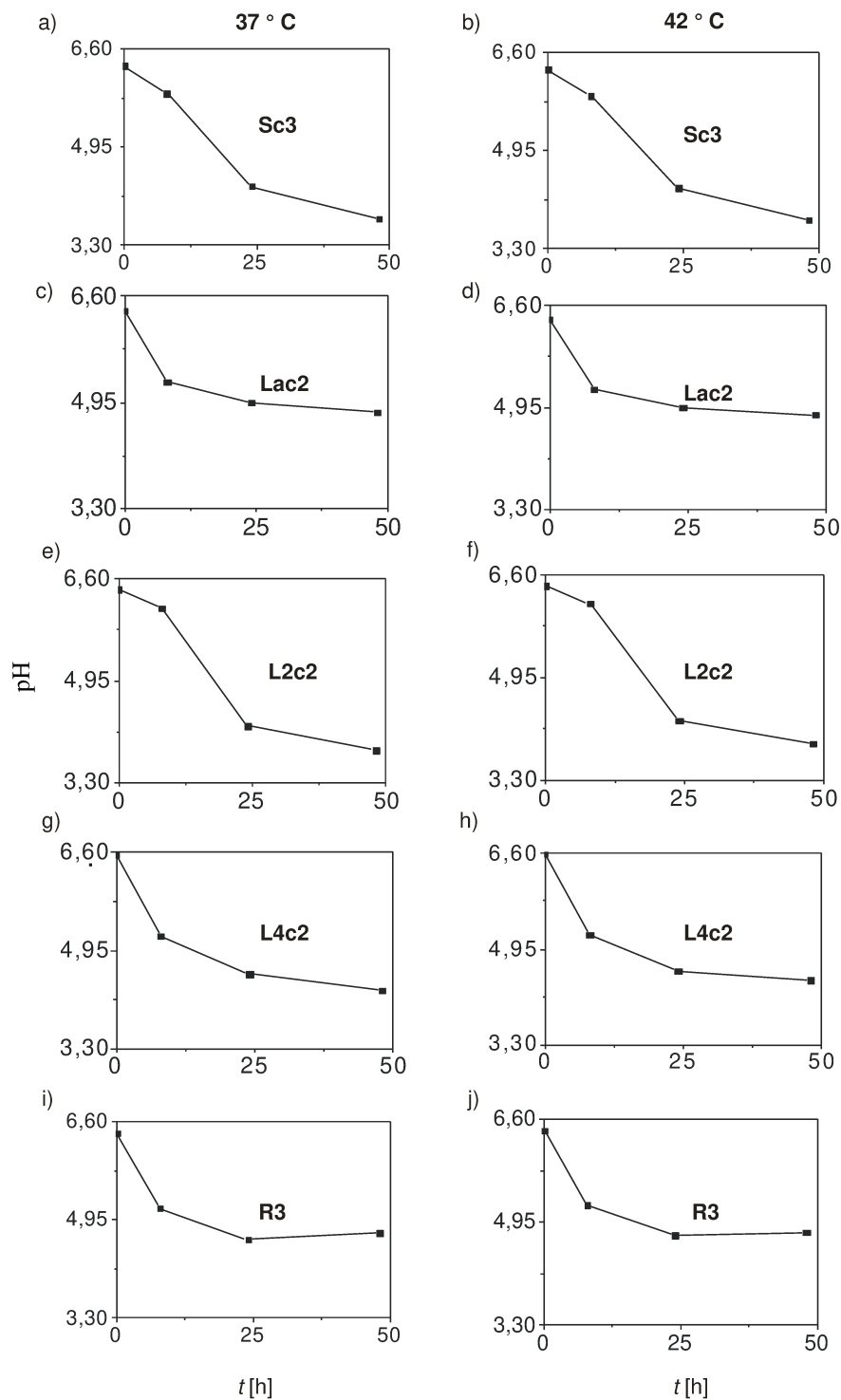


Fig. 17. Cepas de BAL seleccionadas: Evolución temporal de pH.

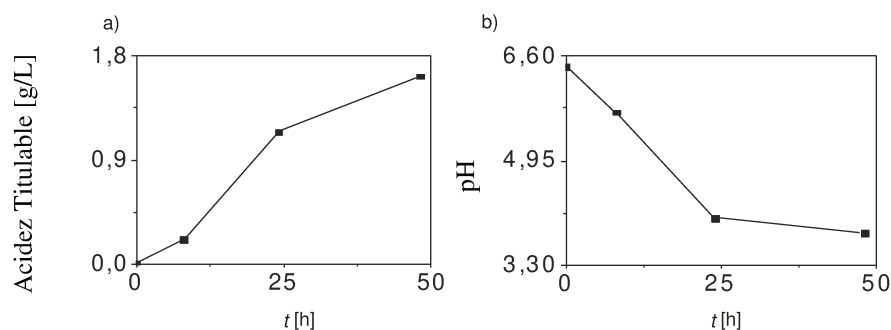


Fig. 18. Cepa testigo: a) Evolución temporal de acidez titulable, y b) Evolución temporal de pH.

Tanto la cepa de *Lacticaseibacillus rhamnosus* como la cepa de *Lactobacillus pentosus/plantarum* poseen un metabolismo heterofermentante facultativo que les permite en condiciones de microaerobiosis metabolizar la lactosa siguiendo la ruta glucolítica de Embden-Meyerhof. Estos resultados concuerdan con la falta de desprendimiento de gas durante la obtención de cultivos puros o monoclonales (Tabla 6). Ambos lactobacilos son ampliamente utilizados como fermento en productos lácteos (Cebeci y Gürakan, 2002; Cui *et al.*, 2012). Por otra parte, la cepa de *Limosilactobacillus fermentum* es heterofermentante obligado, es decir metaboliza la lactosa siguiendo la vía de la 6-fosfogluconato-fosfocetolasa (Cueto y Aragón, 2012; Cui *et al.*, 2012).

Los aislados de Sc3 y Lac2 corresponden a cepas monoclonales de *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Los resultados de acidez titulable y pH mostraron una mayor resistencia a la acidez de la cepa Sc3 aislada de una muestra de lactosuero [Fig. 16 a)-b) y Fig. 17 a)-b)] en comparación a la mayor rapidez de acidificación de la cepa Lac2 [Fig. 16 c)-d) y Fig. 17 c)-d)] aislada de una muestra de leche agria.

Por otra parte, las bacterias del género *Enterococcus* son homofermentantes y residentes del tracto intestinal del hombre y de la mayoría de los animales. Asimismo, son patógenos oportunistas y por lo tanto son indeseables para la tecnología de alimentos

Tabla 7. Procedencia e Identificación de los aislados.

Muestra	Procedencia	Empresa	Metabolismo	Familia	Género	Especie	% de confianza de identificación
Sc3	Lactosuero	SanCor Cooperativas Unidas Ltda.	Heterofermentante facultativo	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	77.8
Lac2	Leche agria	Lácteos HerBal.	Heterofermentante facultativo	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	99.9
L2c2	Leche cruda	Capyc Cooperativa Agropecuaria Productores y Consumidores Ltda.	Heterofermentante facultativo	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus/ Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>pentosus/ plantarum</i>	90.5
L4c2	Leche cruda	La lecherita. Lácteos República de Entre Ríos SRL.	Heterofermentante obligado	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	80.9
R3	Lactosuero	Lácteos Ramolac.	Homofermentante	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	89.1

(Salminen *et al.*, 2004). *Enterococcus faecalis* tiene una relativa importancia industrial ya que integra los fermentos de ciertos tipos de quesos, como el Cheddar o Grana Italiano.

Las cepas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Enterococcus faecalis* son productoras de L-ácido láctico mientras que las cepas *Lactobacillus pentosus/ Lactiplantibacillus plantarum* y *Limosilactobacillus fermentum* producen el par racémico, es decir, DL- ácido láctico (Panesar *et al.* 2007; Cui *et al.*, 2012).

3.2. Producción de Ácido Láctico a partir de lactosuero por fermentación empleando Bacterias Ácido Lácticas aisladas de la región Centro del país

Se llevaron a cabo un total de 8 fermentaciones (Tabla 8). En 5 fermentaciones se emplearon las BAL de mayor capacidad acidificante y resistencia a la acidez producida previamente aisladas e identificadas en comparación con 1 fermentación llevada a cabo con la cepa testigo. Además, se llevaron a cabo 2 fermentaciones empleando consorcios de BAL a fin de incrementar el rendimiento de los procesos fermentativos. Cada consorcio quedó conformado por una bacteria del género *Enterococcus* y una bacteria del género *Lactobacillus* a fin de producir una sinergia entre ellas combinando la rapidez de acidificación de *Enterococcus* y la resistencia a la acidez de *Lactobacillus*.

3.2.1. Monitoreo de la fermentación por FCB: Rendimiento y Productividad

En la Fig. 19 se muestra la evolución temporal de lactosa para las cepas monoclonales y la cepa testigo, y en la Fig. 20 la correspondiente a los consorcios. El error cuadrático medio (ECM) de cada fermentación fue calculado a partir de las 2 evoluciones temporales de lactosa (excepto para la cepa testigo). Se observa repetibilidad y buena reproducibilidad de las mediciones [Fig. 19 y Fig. 20].

El rendimiento y la productividad de los procesos fermentativos se muestran en las 2 últimas columnas de la Tabla 8. Nótese que el tiempo final de fermentación (t_f) corresponde al tiempo cuando el contenido de lactosa se hace constante [Fig. 19 y Fig. 20].

Las cepas Sc3, Lac2 y L2c2 correspondientes a BAL heterofermentantes facultativas tales como *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lactobacillus pentosus/plantarum* mostraron buena resistencia a las condiciones de fermentación [Fig. 19. a)-c)] con rendimientos comprendidos en el rango de 72.1% a 78.2% (Tabla 8) y cercanos al rendimiento de la cepa testigo *Lactobacillus delbruekii* subsp *bulgaricus* (80.9%). Estos resultados son comparables con los reportados en la literatura (Waldir *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016). No se observaron diferencias apreciables en las fermentaciones correspondientes a las cepas Sc3 y Lac2 en contraposición a lo observado en los ensayos de capacidad acidificante en leche donde Sc3 mostró mayor resistencia a la acidez y Lac2 mayor rapidez de acidificación [Fig. 16 a)-d) y Fig. 17 a)-d)].

Tabla 8. AL a partir de permeado: Rendimiento y productividad.

Fermentación	Especie	Lactosa inicial	Lactosa residual	Ácido Láctico	Tiempo ^b	Rendimiento	Productividad
		<i>Li</i> (% p/v)	<i>Lf</i> (% p/v)	(gL ⁻¹)	<i>t_f</i> (h)	(%)	(gL ⁻¹ h ⁻¹)
1	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	5.75	1.49	42.6	30	74.1	1.42
		5.82	1.36	44.6	30	76.6	1.49
2	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	5.05	1.10	39.5	33	78.2	1.20
		5.82	1.36	44.6	30	76.6	1.49
3	<i>Lactobacillus. pentosus/ Lactiplantibacillus plantarum</i>	5.85	1.63	42.2	30	72.1	1.41
		5.81	1.57	42.4	30	73.0	1.41
4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> ^a	5.85	2.44	17.0	30	29.1	0.57
		5.82	1.98	19.2	33	33.0	0.58
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.81	3.27	25.4	12	43.7	2.11
		5.79	3.23	25.6	12	44.2	2.13
6	<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp <i>bulgaricus</i> (cepa testigo)	5.77	1.10	46.7	27	80.9	1.73
7	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus/Enterococcus faecalis</i>	5.82	1.34	44.8	24	77.0	1.87
		5.85	0.63	52.2	24	89.2	2.18
8	<i>L.pentosus/plantarum/E. faecalis</i>	5.62	0.96	46.6	15	82.9	3.10
		5.52	0.95	45.7	15	82.8	3.05

^a metabolismo heterofermentante, y ^b tiempo correspondiente a la máxima conversión del sustrato.

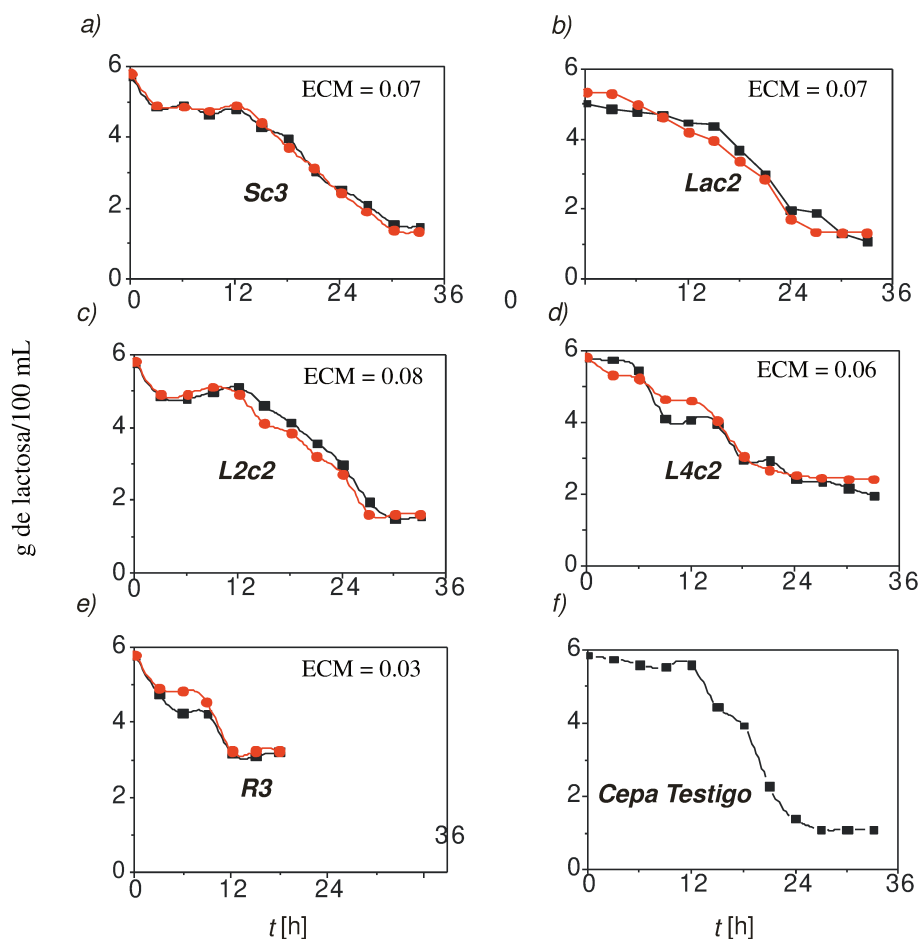


Fig. 19. Fermentaciones 1-6: Evolución de la concentración de lactosa a pH 6. a) *Lacticaseibacillus rhamnosus* a 37 °C, b) *Lacticaseibacillus rhamnosus* a 37 °C, c) *Lactobacillus pentosus*/*Lactiplantibacillus plantarum* a 37 °C, d) *Limosilactobacillus fermentum* a 37 °C, e) *Enterococcus faecalis* a 37 °C, y f) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a 42 °C. ECM: error cuadrático medio.

Por otra parte, la cepa de *Limosilactobacillus fermentum* mostró buena resistencia a las condiciones de fermentación [Fig 19 d)] en comparación a la cepa testigo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pero su rendimiento resultó menor debido a su metabolismo heterofermentante obligado (Tabla 8).

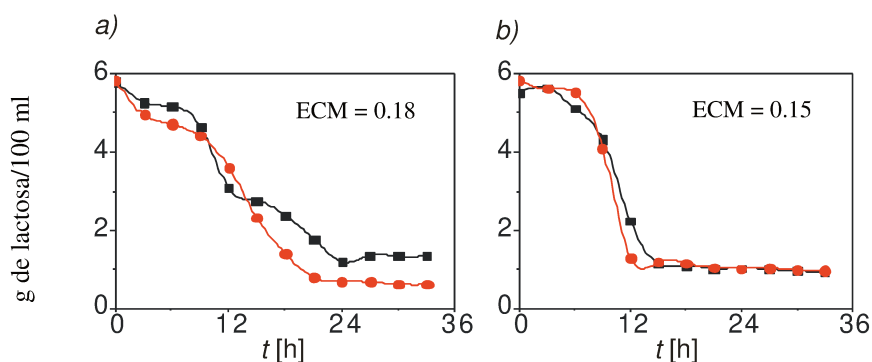


Fig. 20. Fermentaciones 7 y 8: Evolución de la concentración de lactosa a pH 6 y 37 °C.
 a) *Lacticaseibacillus rhamnosus/Enterococcus faecalis*; b) *Lactobacillus pentosus/*
Lactiplantibacillus plantarum/ Enterococcus faecalis. ECM: error cuadrático medio.

Como era de esperar, la cepa de *Enterococcus faecalis* exhibió una velocidad de conversión de lactosa superior a los lactobacilos [Fig. 19 e)] aunque su rendimiento fue considerablemente menor debido a la sensibilidad que presentan los cocos a la acidez del medio (Tabla 8). Estos resultados coinciden con los correspondientes al ensayo de capacidad acidificante en leche [Fig. 16 i)-j) y Fig. 17 i)-j)].

Los consorcios exhibieron muy buena resistencia a las condiciones de fermentación [Fig. 20] con rendimientos similares o superiores a la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Tabla 8). Además, la productividad del consorcio integrado por las cepas de *Lactobacillus pentosus/ Lactiplantibacillus plantarum* y *Enterococcus faecalis* duplicó la productividad de la cepa testigo como resultado del menor tiempo de fermentación (aproximadamente 55% menor).

1.2.1. Monitoreo de la fermentación por CG y separación del AL

En la Fig. 21 se muestran los resultados temporales de CG para la fermentación 1 llevada a cabo con la cepa de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Sc3). Cromatogramas similares se obtuvieron para el resto de las fermentaciones.

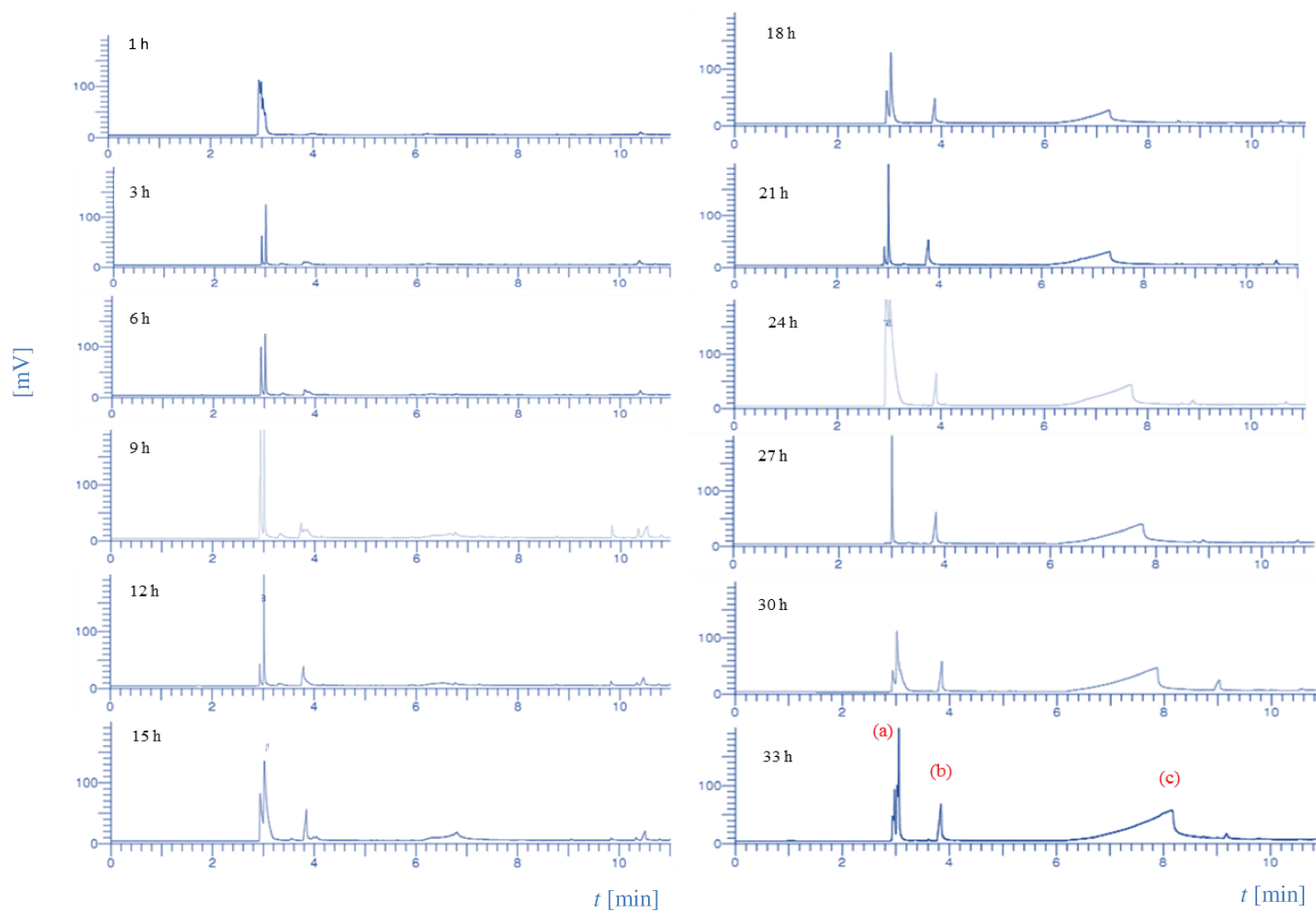


Fig. 21. Fermentación 1: CG-FID. *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Sc3).

En la Fig. 22 se muestra el cromatograma correspondiente a la mezcla de los mostos obtenidos al final de las fermentaciones 1-8 luego de las etapas de separación y concentración.

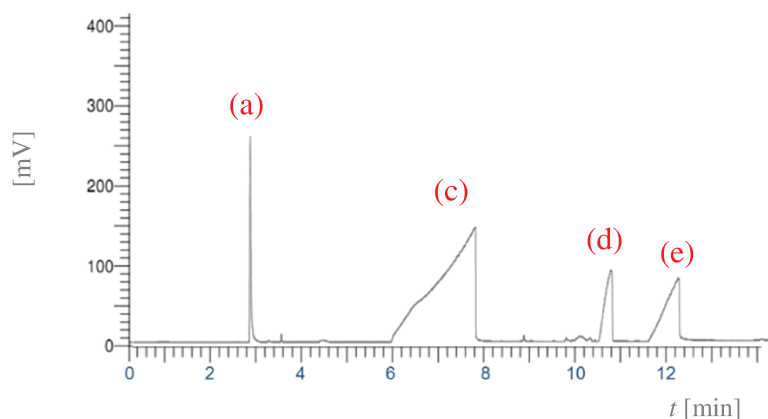
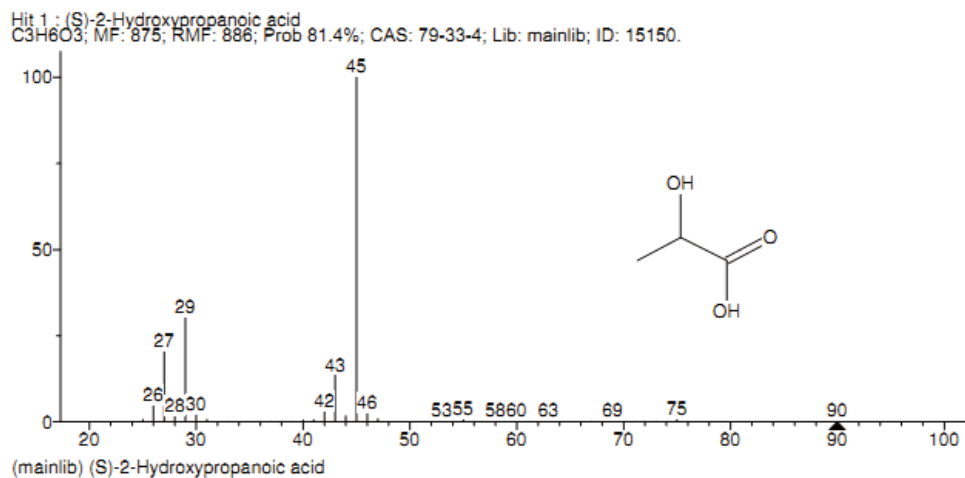


Fig. 22. GC-FID: Solución de AL luego del tratamiento de separación y concentración.

La asignación de las señales se hizo de acuerdo a Staniforth *et al.* (1999) y Feng *et al.* (2012). Las señales (a), (c), (d), y (e) corresponden a AL, lactido, dímeros y trímeros, respectivamente. Las señales correspondientes a las formas isoméricas del D-, L- y meso-lactido se superponen en una ancha señal (c) como resultado de la baja polaridad de las columnas utilizadas. Feng *et al.* (2012) emplearon columnas polares que permitió la separación de las especies. En la Fig. 23 se muestran los espectros de masa asociados a las señales (a) y (c).

La señal aguda a 3.86 min (b) presente en todos los cromatogramas de la Fig. 21, así como su análisis por espectrometría de masas, y su notable disminución luego de la etapa de separación y concentración de AL (Fig. 22) sugieren presencia de compuestos volátiles derivados de nitrógeno o alcoholes superiores generados durante la fermentación. Luego de los procesos de separación y concentración de AL (Fig. 22) se observó incremento de las señales (d) y (e) como posible resultado del incremento en la velocidad de condensación durante la concentración por evaporación de agua. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Groot *et al.* (2010) y Inkinen *et al.* (2011).

a)



b)

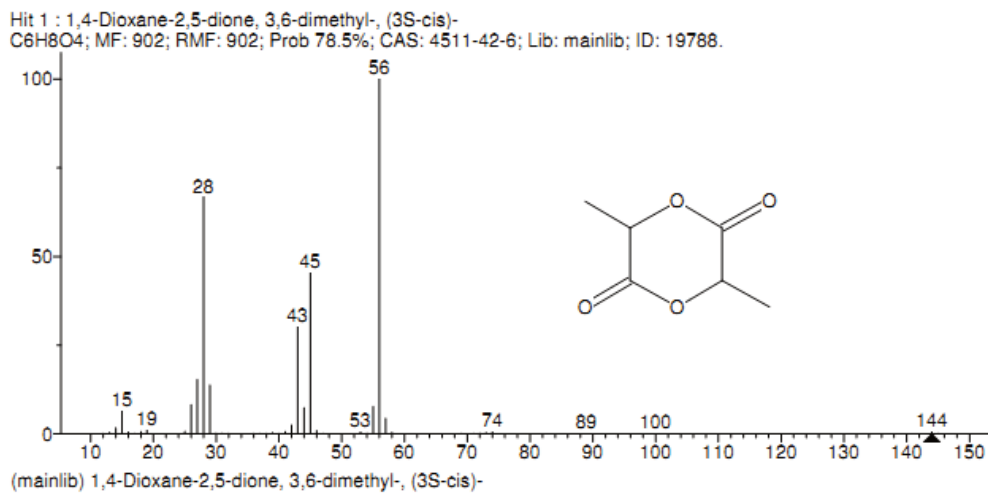


Fig. 23. GC-MS: a) señal (a), y b) señal (c) de la Fig. 21 para 33 h.

Por otra parte, se corroboró la presencia de AL y su sal de amonio por CCD al final de las fermentaciones 1 y 7.

3.3. Síntesis y caracterización de PLA

Se obtuvo PLA a partir de dos mezclas racémicas de AL: i) una solución de AL 80% obtenida por fermentación (Exp. 1), y ii) una solución comercial de AL 85-90 % (Exp. 2).

3.3.1. Índice de Acidez (IA)

Para el monitoreo de la polimerización se midió el IA. En la segunda y sexta columna de la Tabla 9 se muestran los valores de IA para el Exp. 1 y Exp. 2, respectivamente.

Tabla 9. Índice de Acidez (IA), PM medios (\bar{M}_n y \bar{M}_w) y polidispersidad (\bar{M}_w / \bar{M}_n) del AL, oligómeros, lactido y PLA.

	Exp. 1				Exp. 2			
	IA	\bar{M}_n (g/mol)	\bar{M}_w (g/mol)	D_n	IA	\bar{M}_n (g/mol)	\bar{M}_w (g/mol)	D_n
AL	708	746 ^b	764 ^b	1.02	656	178 ^b	211 ^b	1.19
Olig. A	261	1266 ^b	1543 ^b	1.22	208	392 ^b	759 ^b	1.93
Olig. B	91.1	2109 ^b	3094 ^b	1.47	70.4	835 ^b	2000 ^b	2.40
Lactido	— ^a	722 ^b	783 ^b	1.08	— ^a	196 ^b	260 ^b	1.33
PLA	— ^a	6886 ^b	8513 ^b	1.24	— ^a	2107 ^b	3027 ^b	1.44
	— ^a	4282 ^c	— ^a	— ^a	— ^a	1908 ^c	— ^a	— ^a

^a no se hicieron mediciones, ^b CLE, y ^c ¹H RMN.

A medida que avanza la reacción, el IA disminuye como consecuencia de la disminución de grupos ácidos que reaccionan durante la polimerización.

3.3.2. FT-IR

En la Fig. 24 se muestran los espectros del oligómero B y del PLA para el Exp. 1, y en la Fig. 25 el correspondiente al PLA para el Exp. 2. La asignación de bandas se hizo de acuerdo a las señales características reportadas por Cai *et al.* (2012).

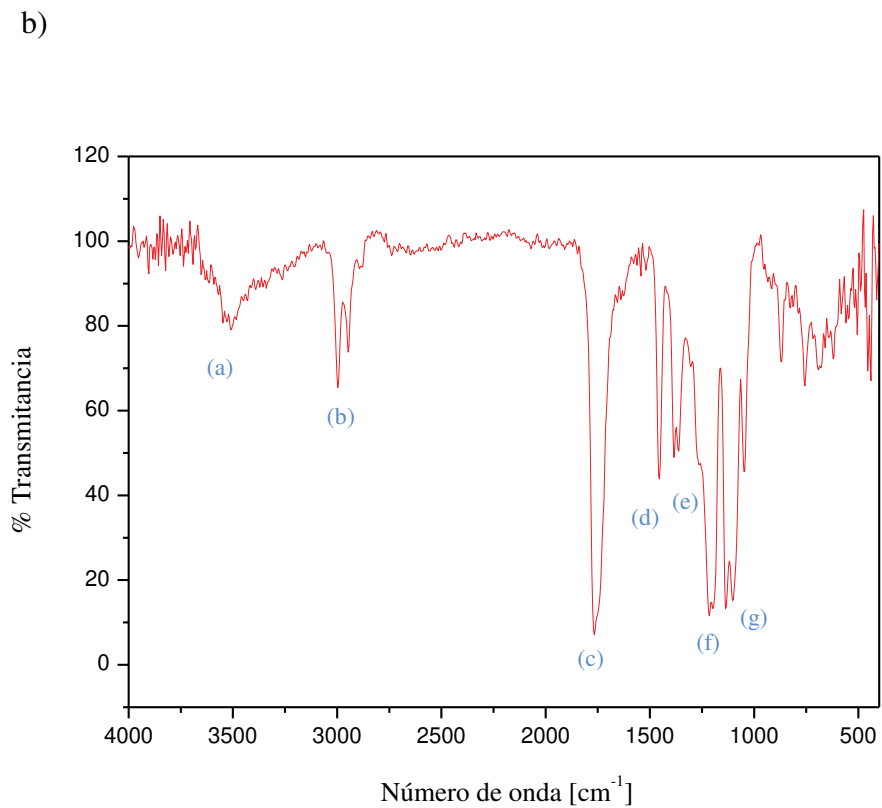
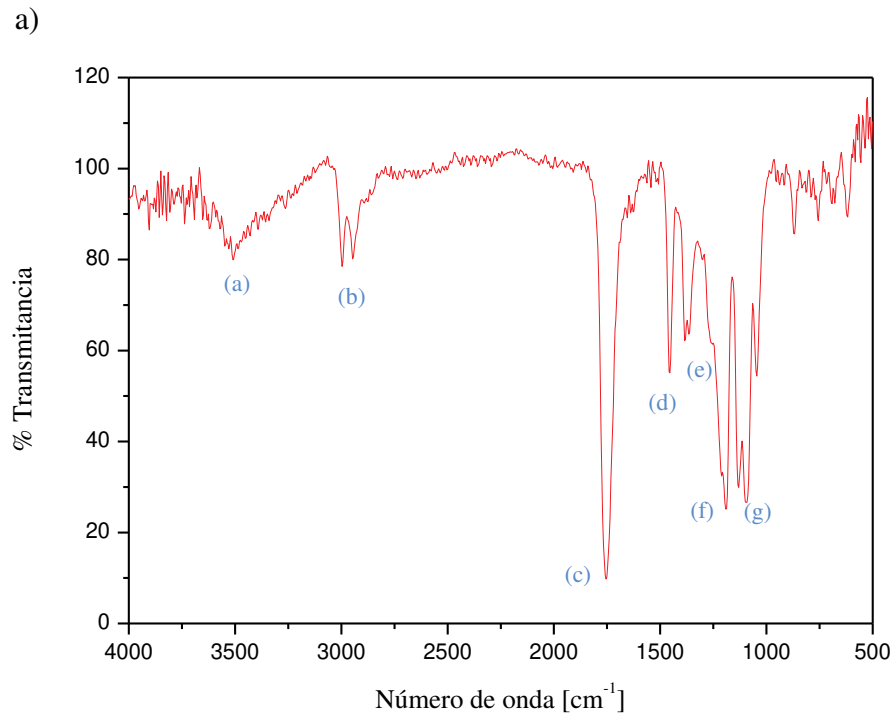


Fig. 24. Exp. 1. Espectro FT-IR: a) Oligómero B, y b) PLA.

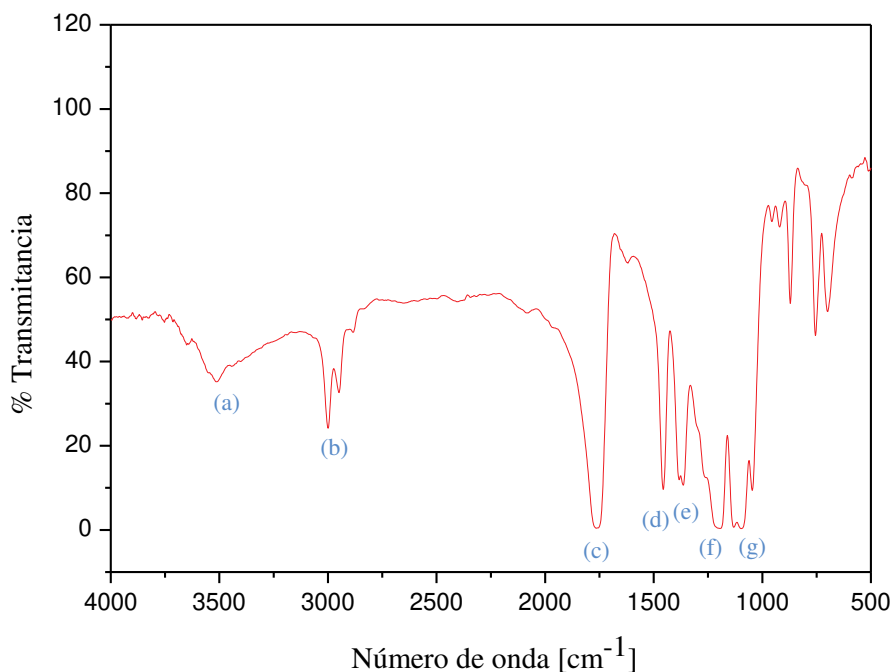


Fig. 25. Exp. 2. Espectro FT-IR correspondiente a PLA.

La señal a 3500 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace -OH en el grupo hidroxilo (a).

A 2997 y 2946 cm^{-1} se observan las señales características de vibración por estiramiento (simétrico y asimétrico) del enlace C-H en el grupo -CH_3 (b) y en el rango entre 1470 y 1450 cm^{-1} (d) la correspondiente a la vibración por deformación asimétrica.

Por otra parte, la señal a 1735 cm^{-1} en el oligómero y a 1754 cm^{-1} en el polímero (c) corresponde a vibración por estiramiento del enlace C=O en el grupo carbonilo (-C=O). El desplazamiento de esta señal en el polímero es debido a la hiperconjugación del protón del C adyacente al -C=O .

A 1466 y 1379 cm^{-1} (e) se observan las señales características correspondientes a la flexión asimétrica y a la flexión simétrica del grupo $\text{-CH}_2\text{-}$, respectivamente. Las señales de torsión del grupo C-O-C en el rango entre 1266 y 1185 cm^{-1} (f) se conocen como bandas

cristalinas (Urayama *et al.*, 2003 y Ahmed *et al.*, 2009) y a 1130 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} y 1047 cm^{-1} se observan las bandas características de estiramiento del grupo C-O-C (g).

3.3.3. ^1H RMN

En la Fig. 26 y la Fig. 27 se muestran los espectros de ^1H RMN correspondientes al lactido y PLA sintetizado a partir de AL fermentativo (Exp. 1) y AL comercial (Exp. 2), respectivamente.

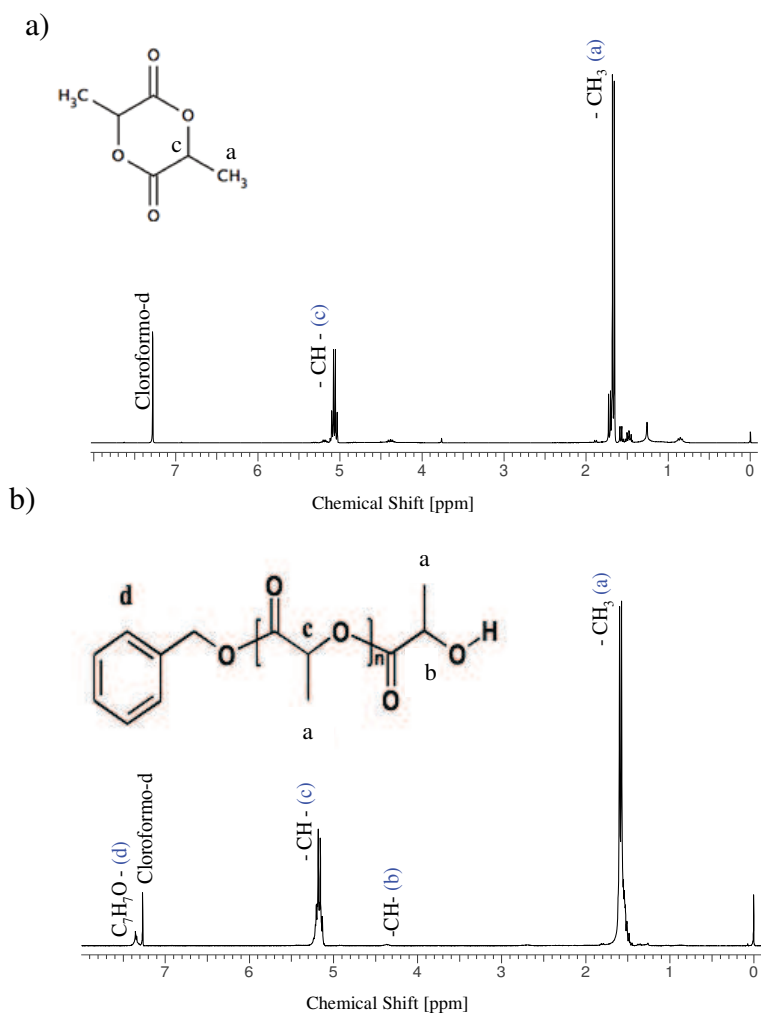


Fig. 26. Exp. 1. Espectro ^1H RMN: a) lactido, y b) PLA.

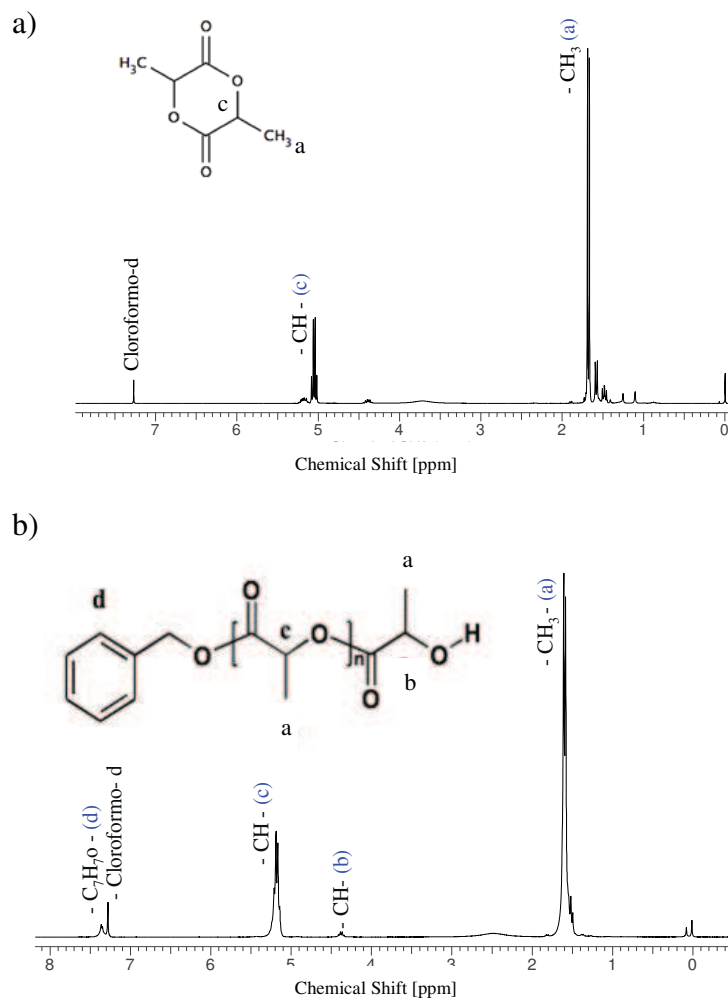


Fig. 27. Exp. 2. Espectro ^1H RMN: a) lactido, y b) PLA.

La asignación de los picos se hizo a partir de las señales características del lactido y del PLA reportadas por Lemmouchi *et al.* (2007).

Los protones metílicos muestran un desplazamiento químico entre 1.5 y 1.6 ppm (a), mientras que los metínicos un desplazamiento químico entre 5 y 5.30 ppm (c). La integración de estas señales permite establecer una relación entre las áreas de los protones metílicos a metínico ($-\text{CH}_3/-\text{CH}-$) de 3 a 1, en concordancia con la estructura molecular del lactido y el PLA.

La señal con desplazamiento químico entre 4.30 y 4.50 ppm (b) corresponde al protón del carbono adyacente al grupo -OH terminal. En el lactido, esta señal sugiere presencia de AL como impureza [Fig. 26 a) y Fig. 27 a)]. Además, la señal con desplazamiento químico entre 7.25 y 7.40 ppm (d) en los espectros de PLA [Fig. 26 b) y Fig. 27 b)] corresponde al grupo bencílico del coiniador que se une covalentemente a un extremo de la cadena del PLA.

A partir de los espectros de ^1H RMN se calculó el grado de polimerización (GP) como se muestra a continuación (Báez, 2010):

$$GP = [(A_a) / (A_b)] + 1 \quad (10)$$

donde A_a es el valor de la integral del área bajo la curva para el carbono metílico (a) presente en la cadena polimérica y A_b es el valor de la integral del área bajo la curva para el carbono metílico del grupo terminal de la cadena (b). El término de valor uno corresponde a la contribución de un grupo terminal (monómero). Para AL, $A_a = 0$ y $GP = 1$.

A partir de las mediciones de ^1H RMN se puede estimar el peso molecular medio en número (\overline{M}_n) del PLA según la siguiente expresión:

$$\overline{M}_n = GP \times 72 \text{ g/mol} + 108 \text{ g/mol} \quad (11)$$

donde 72 g/mol es el peso molecular de la unidad repetitiva o monomérica del PLA, y 108 g/mol es el peso molecular del grupo bencílico empleado como iniciador.

Los PM medios de PLA se muestran en la Tabla 9. Como era de esperar se obtuvo un polímero de PM similar al reportado por Báez (2010). Nótese que las condiciones de reacción de esta Tesis corresponden a las adoptadas por Báez (2010).

3.3.4. CLE

En la Fig. 28 y en la Fig. 29 se muestran las distribuciones de PM correspondientes a AL, lactido, oligómeros y PLA obtenidos por CLE para los Exp.1 y Exp.2, respectivamente. Además, en la Tabla 9 se muestran los valores de PM medios en número (\overline{M}_n) y en peso (\overline{M}_w) y los correspondientes a la polidispersidad ($\overline{M}_w / \overline{M}_n$).

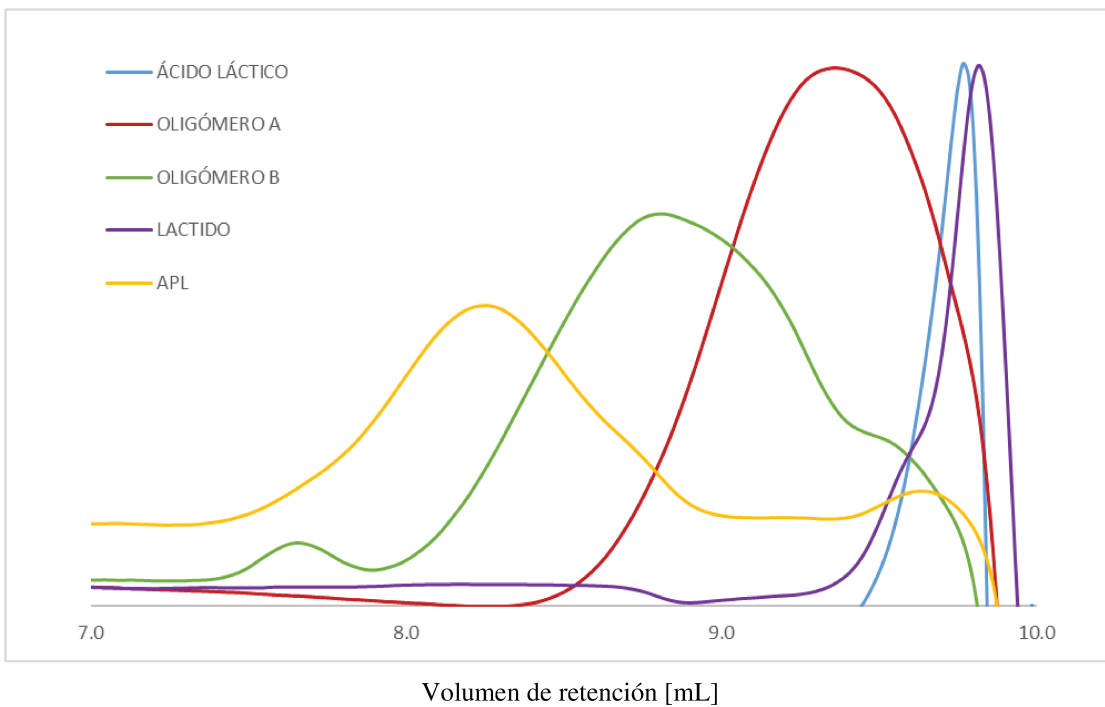


Fig. 28. Exp. 1. Cromatogramas obtenidos por CLE.

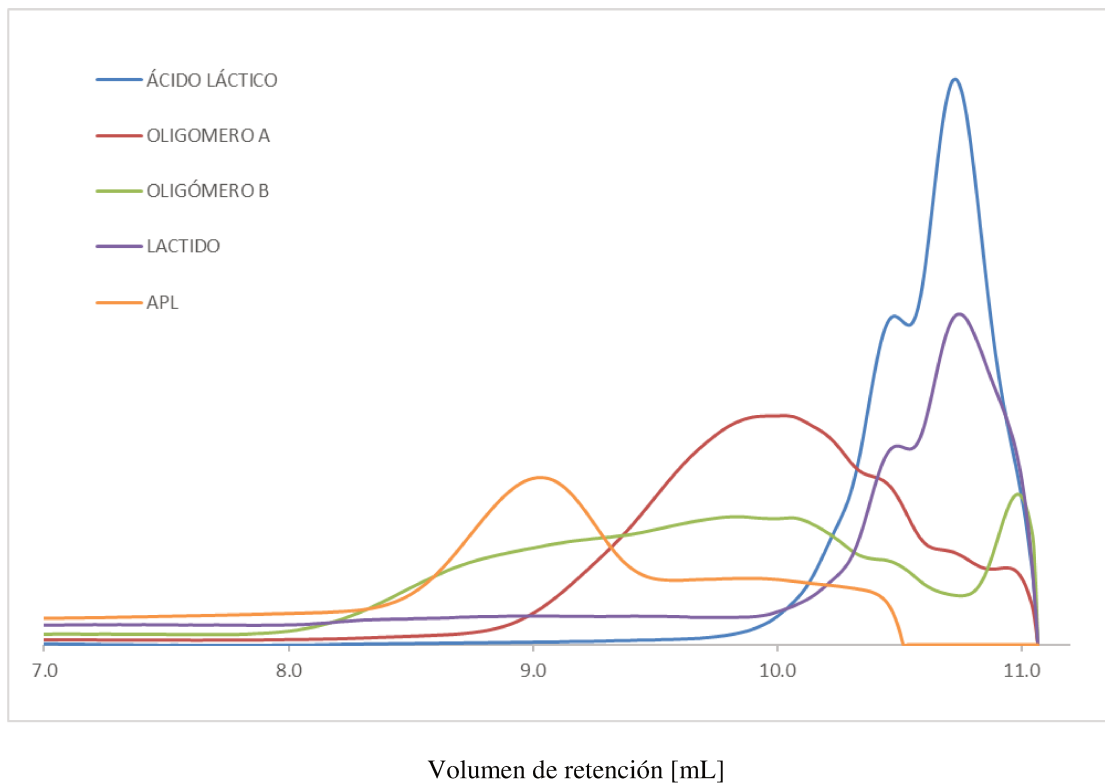


Fig. 29. Exp. 2: Cromatogramas obtenidos por CLE.

Como era de esperar los PM medios aumentan durante la policondensación (oligómero A y oligómero B), disminuyen durante la depolimerización (lactido) e incrementan al final de la polimerización por apertura de anillo del dímero lactido (PLA).

Se obtuvo PLA de PM del orden de 10^3 y baja polidispersidad. La polidispersidad del PLA resultó menor a 2 en concordancia con lo reportado en la literatura (Fuentes *et al.*, 2006; Lasprilla *et al.*, 2012; Sin y Tueen, 2019) siendo menor para el PLA obtenido por fermentación que para el obtenido a partir de AL comercial.

El procesamiento de datos para el AL y el lactido adoleció de errores ya que las muestras fluyeron en un rango de volúmenes que no correspondían al rango de los patrones empleados en la calibración. Así, los valores absolutos de PM obtenidos empleando la calibración no fueron los esperados de acuerdo a los resultados experimentales. Sin embargo, el mayor valor de \overline{M}_n del AL obtenido a partir del AL producido por fermentación (746 g/mol) en comparación al AL comercial (178 g/mol) sugiere oligomerización incipiente producida durante el proceso de rotoevaporación. Estos resultados coinciden con las observaciones de Cuervo Garcés y Echeverry Vargas (2016).

3.3.5. Análisis Térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la Fig. 30 se presenta la curva de DSC de la muestra de PLA del Exp. 1. El termograma presenta una única temperatura de transición que corresponde a la temperatura de transición vítrea (T_g) a 40.23 °C en concordancia con los valores de T_g reportados en la literatura para PLA amorfo (Garlotta, 2001; Amhed *et al.*, 2009 y Lasprilla *et al.*, 2012). La T_g fue determinada ubicando el punto de inflexión en la gráfica.

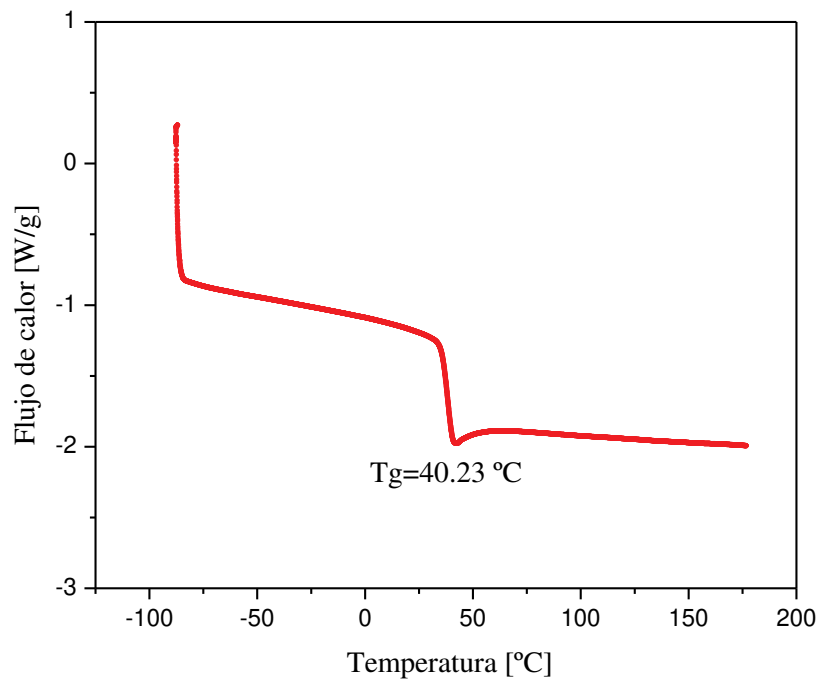


Fig. 30. Curva de DSC para el PLA correspondiente al Exp. 1.

En la Fig. 31 se muestra la curva de TGA de la muestra de PLA del Exp. 1 donde se pueden observar tres zonas. En la primera zona (0 - 200 °C) la pérdida de peso del material corresponde a pérdidas de humedad por evaporación y desorción de agua. La segunda zona (200 - 280 °C) corresponde a la degradación térmica o el rompimiento de los enlaces. En la tercera zona, a partir de los 360 °C la descomposición es completa. Al final del ensayo el residuo es de 0.8 %.

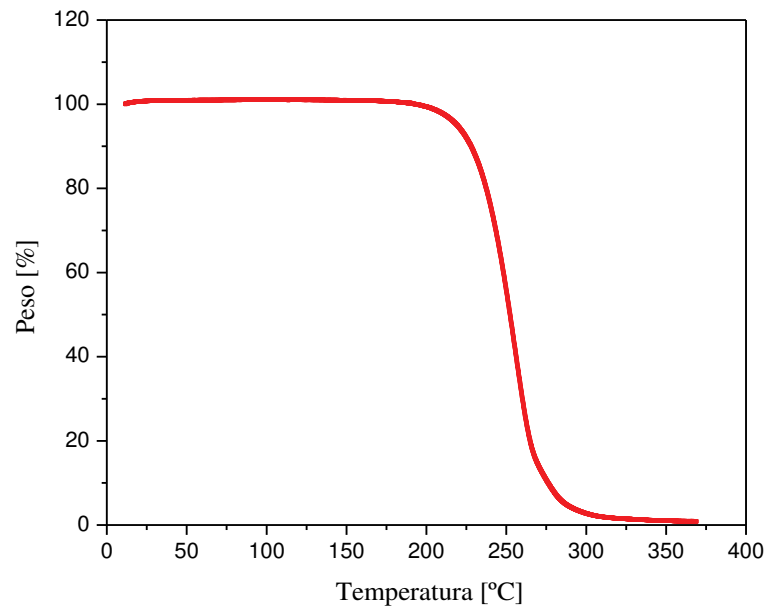


Fig. 31. Curva de TGA para el PLA correspondiente al Exp. 1.

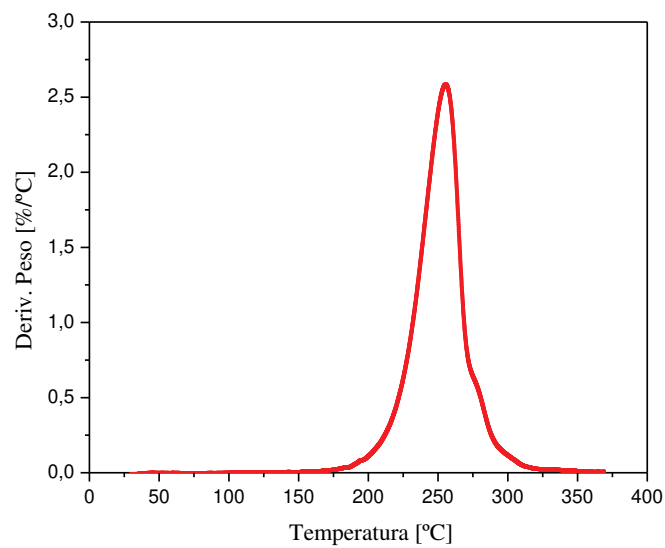


Fig. 32. Curva de DTGA para el PLA correspondiente al Exp. 1.

Por otra parte, en la gráfica de la derivada de la curva de TGA se puede observar un valor máximo a 235 °C correspondiente a la temperatura de degradación del polímero.

Todos los resultados expuestos coinciden con lo reportado por Amhed *et al.* (2009).



4. Conclusiones y Trabajos a Futuro

Se estudió experimentalmente un proceso integrado y sustentable que permite aumentar el valor industrial/comercial del lactosuero para su aplicación en una segunda cadena de valor, promoviendo la obtención de PLA. El proceso involucra la síntesis de AL empleando permeado de lactosuero como medio de fermentación, BAL silvestres y tecnología de membranas para su separación y purificación. El AL es polimerizado a PLA por apertura de anillo.

En esta Tesis se aislaron y conservaron 48 cepas de BAL Gram positivas, catalasa negativas provenientes de muestras de lactosuero fresco, leche cruda fresca y agria de la región Centro del país con buena resistencia a la acidez y a las condiciones de fermentación. Se seleccionaron e identificaron 2 cepas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (heterofermentante facultativa productor de L-ácido láctico), una cepa de *Lactobacillus pentosus/plantarum*, (heterofermentante facultativa productor de DL-ácido láctico), una cepa de *Limosilactobacillus fermentum* (heterofermentante obligado productor de DL-ácido láctico) y una cepa de *Enterococcus faecalis* (homofermentante productor de L-ácido láctico) con potencial tecnológico para la obtención de AL por fermentación de permeado de lactosuero.

Para las fermentaciones batch a pH 6 y 37 °C se empleó hidróxido de amonio como agente neutralizante. Se llevaron a cabo 8 fermentaciones a partir de las cepas puras y dos consorcios constituidos por las especies *Lactobacillus pentosus/plantarum/Enterococcus faecalis* y *Lacticaseibacillus rhamnosus/Enterococcus faecalis*. Los consorcios exhibieron rendimientos de AL superiores (83% - 89%) a la cepa de *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* empleada como testigo (81%). Además, el consorcio integrado por *Lactobacillus pentosus/plantarum/Enterococcus faecalis* casi duplicó la productividad ($3.10 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) de la cepa testigo.

Para el seguimiento de las fermentaciones se emplearon técnicas cromatográficas (GC) y volumétricas (método de FCB).

La separación de AL puro del mosto de fermentación se realizó empleando tecnología de membranas evitando así la generación de sulfato de calcio y el empleo de metanol de los procesos convencionales de separación y purificación de AL.

Se estudió la síntesis de lactido vía un proceso de oligomerización-depolimerización. La oligomerización de DL-ácido láctico se llevó a cabo a 180 °C (6 h en atmósfera de nitrógeno - 6 h de vacío) y la depolimerización a 210 °C (5 h de vacío con 0.5% p/p de cloruro estañoso como catalizador). Se sintetizó PLA por apertura de anillo del dímero lactido a 170 °C empleando 2-etilhexanoato de estaño y alcohol bencílico y como iniciador y coiniciador, respectivamente.

Se obtuvo PLA amorfo de peso molecular medio $\overline{M}_n = 6886$ g/mol, una polidispersidad de 1.24, una temperatura de degradación térmica de 235 °C y una Tg de 40.23 °C, con potencial aplicación para la microencapsulación y nanoencapsulación de medicamentos y agroquímicos.

En futuros trabajos se pretende:

1. Optimizar y validar la tecnología de fermentación y separación de AL utilizando el equipo piloto instalado en planta piloto de INTA Rafaela (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).
2. Reutilizar las cepas bacterianas mediante inmovilización por encapsulación.
3. Aprovechar la biomasa unicelular obtenida durante el proceso fermentativo como un aditivo tecnológico para la industria alimentaria.
4. Emplear el PLA obtenido en esta Tesis para la síntesis de micro y nanopartículas para la encapsulación de medicamentos y agroquímicos
5. Obtener L-PLA enantioméricamente puro para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Se está evaluando la factibilidad de protección de la propiedad intelectual del proceso de obtención de AL desarrollado en esta Tesis y su escalado en planta piloto.



Tabla A.1. Características de los aislados de BAL.

Cepa	Morfología	Desprendimiento de gas	Propagación en leche		Capacidad acidificante			
					Δ pH ^a		Acidez titulable ^b (g/L)	
			37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
SM1	Cocos	-	++	+	1.79	1.54	1.09	0.93
SM2	Cocos	-	++	+	1.79	1.59	0.63	0.51
SM3	Cocos	-	++	+	1.61	1.62	0.94	0.56
SM4	Cocos	-	++	+	1.78	1.64	0.61	0.57
SM5	Cocos	-	++	+	1.72	1.58	0.72	0.59
Sc1	Cocos	-	+	++	1.80	1.72	0.43	1.06
Sc2	Cocos	-	++	+	0.26	0.16	0.26	0.16
Sc3	Bacilos	-	+	++	2.57	2.53	0.96	1.22
Sc4	Bacilos	-	+	++	3.03	2.77	0.97	1.07
Sc5	Bacilos	-	++	+	2.52	1.97	0.73	0.19
R1	Cocos	-	++	+	1.83	1.69	0.64	0.59
R2	Cocos	-	++	+	1.79	1.63	0.65	0.52
R3	Cocos	-	+	++	1.68	1.63	0.85	1.18
R4	Cocos	-	++	+	1.81	1.69	0.71	0.68
R5	Cocos	-	++	+	1.81	1.63	0.69	0.60
M1	Cocos	+	++	+	1.32	1.22	0.67	0.39
M2	Cocos	-	++	+	1.27	1.16	0.73	0.44
M3	Cocos	-	++	+	1.74	1.15	0.58	0.49

Tabla A.1. (continuación) Características de los aislados de BAL.

M4	Cocos	+	++	+	1.35	1.27	0.78	0.51
M5	Cocos	-	++	+	1.28	1.14	0.76	0.44
J1	Cocos	-	+	++	1.32	1.22	0.38	0.66
J2	Cocos	-	+	++	1.49	1.51	0.32	0.39
J3	Cocos	-	+	++	1.15	1.74	0.55	0.57
J4	Cocos	-	++	+	1.51	1.47	0.41	0.31
J5	Cocos	-	++	+	1.50	1.42	0.37	0.30
L1c1	Cocos	-	++	+	1.09	0.21	0.44	0.13
L1c2	Bacilos	-	++	+	1.27	1.10	0.46	0.35
L1c3	Cocos	-	++	+	2.54	2.53	0.88	0.79
L1c4	Cocos	-	+	++	1.98	1.57	0.49	0.56
L1c5	Cocos	-	+	++	2.58	2.55	0.76	0.92
L2c1	Bacilos	-	++	+	1.10	0.57	0.12	0.09
L2c2	Bacilos	-	++	+	2.60	2.50	1.04	0.97
L2c3	Cocos	-	+	++	2.42	5.41	0.58	0.76
L2c4	Bacilos	-	++	+	2.52	2.41	0.74	0.73
L2c5	Bacilos	-	+	++	1.71	1.30	0.39	0.41
L3c1	Cocos	-	++	+	2.25	2.28	0.68	0.64
L3c2	Bacilos	-	++	+	1.72	1.67	0.52	0.43
L3c3	Cocos	-	++	+	1.92	1.91	0.58	0.51
L3c4	Bacilos	+	++	+	1.91	1.93	0.58	0.56

Tabla A.1. (continuación) Características de los aislados de BAL.

L3c5	Bacilos	-	+	++	1.34	1.17	0.18	0.28
L4c1	Bacilos	-	+	++	2.19	2.18	0.65	0.72
L4c2	Bacilos	-	++	+	2.22	2.18	0.96	0.60
L4c3	Cocos	-	+	++	2.02	2.19	0.68	0.78
L4c4	Cocos	-	++	+	2.22	2.17	0.96	0.71
L4c5	Cocos	-	+	++	2.26	2.16	0.72	0.76
Lac2	Bacilos	-	+	++	1.58	1.55	0.40	0.44
Lac4	Cocos	-	+	++	1.63	1.51	0.40	0.51
Lac5	Cocos	-	++	+	1.66	1.68	0.35	0.29

^a $\Delta\text{pH} = \text{pH (48 h)} - \text{pH inicial}$, y ^b medición a 48 h.

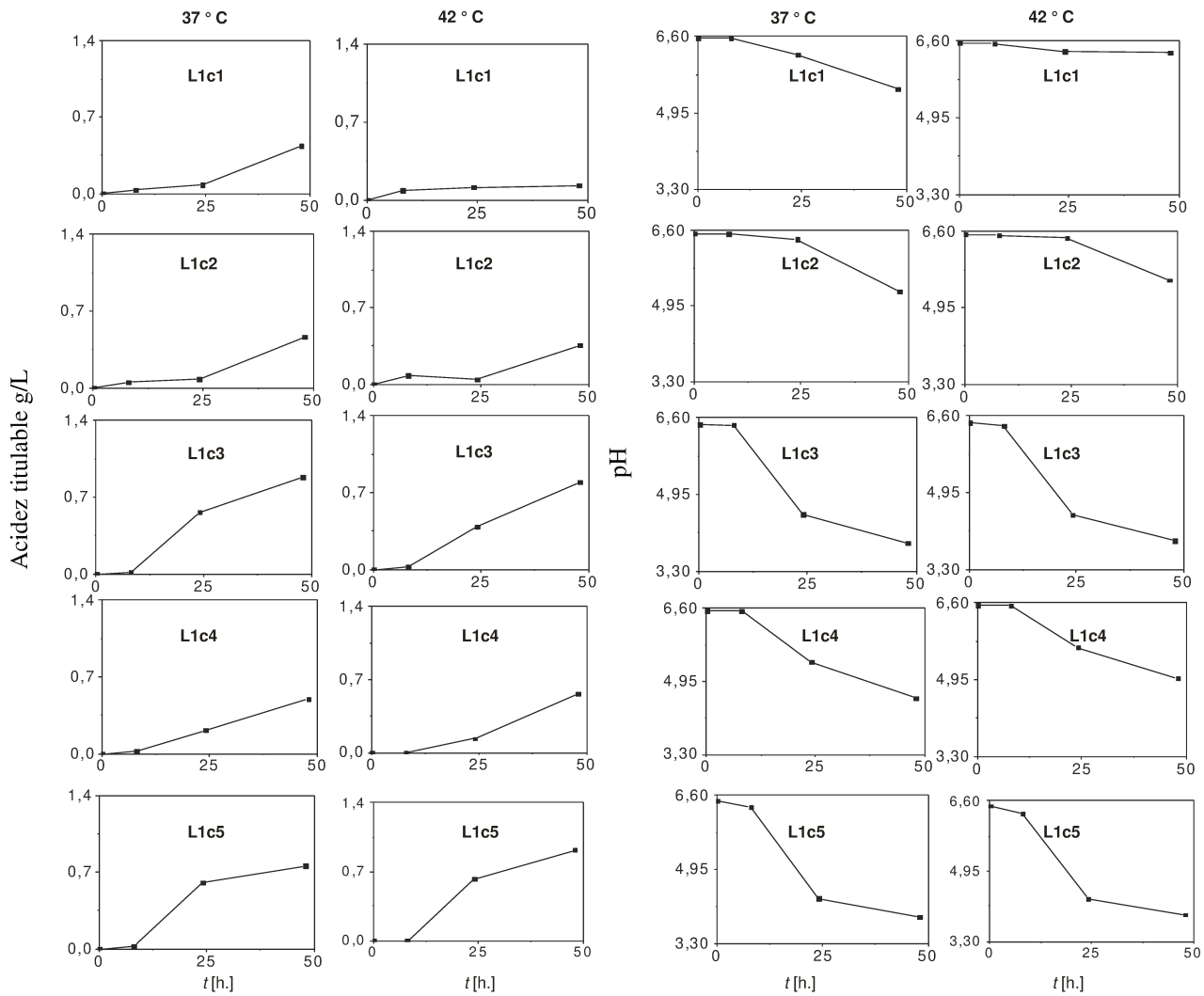


Fig. A.1. Evoluciones temporales de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Tambo Zona Rural (San Francisco, Córdoba).

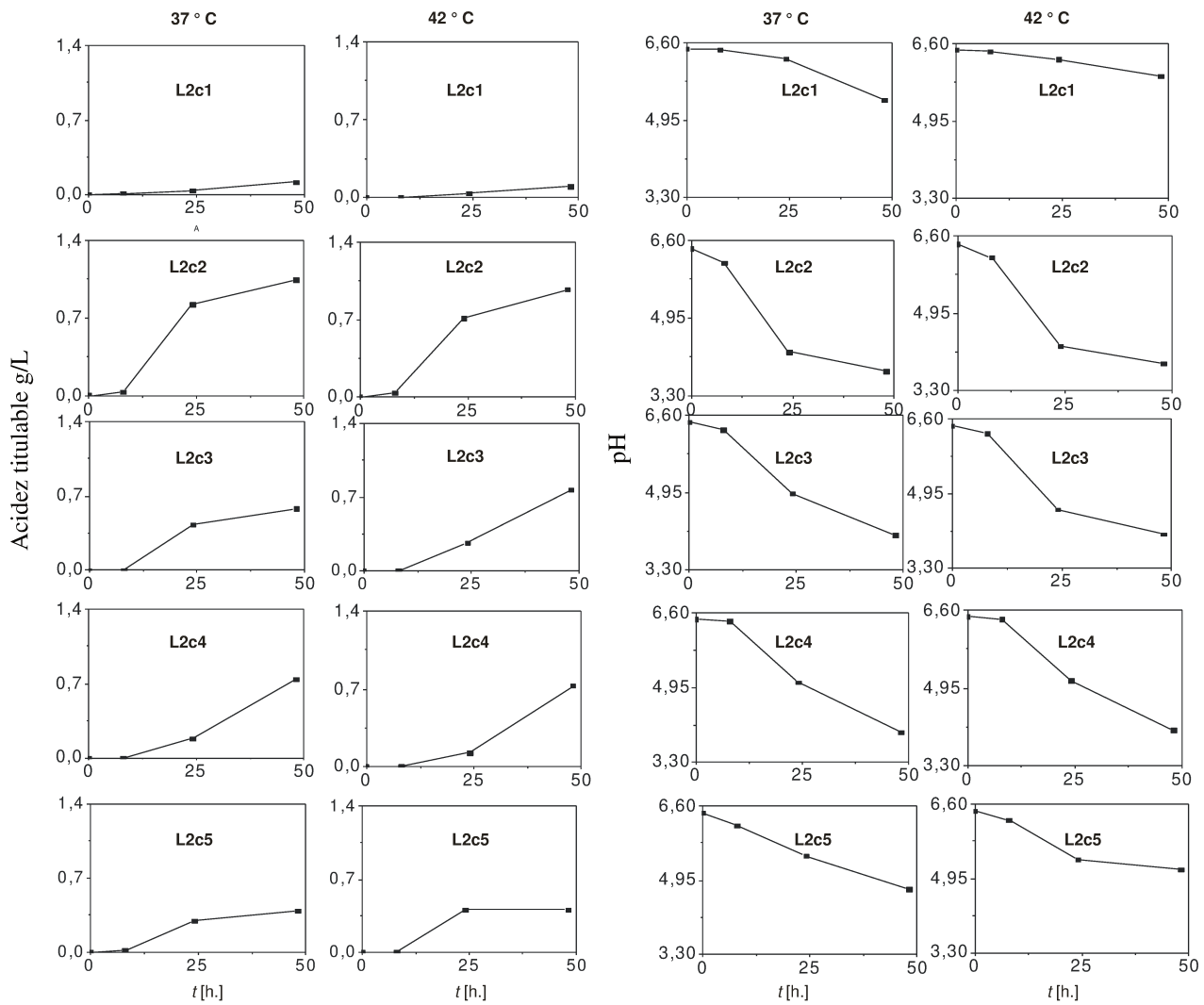


Fig. A.2. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Capyc Cooperativa Agropecuaria Productores y Consumidores Ltda. (Devoto, Córdoba).

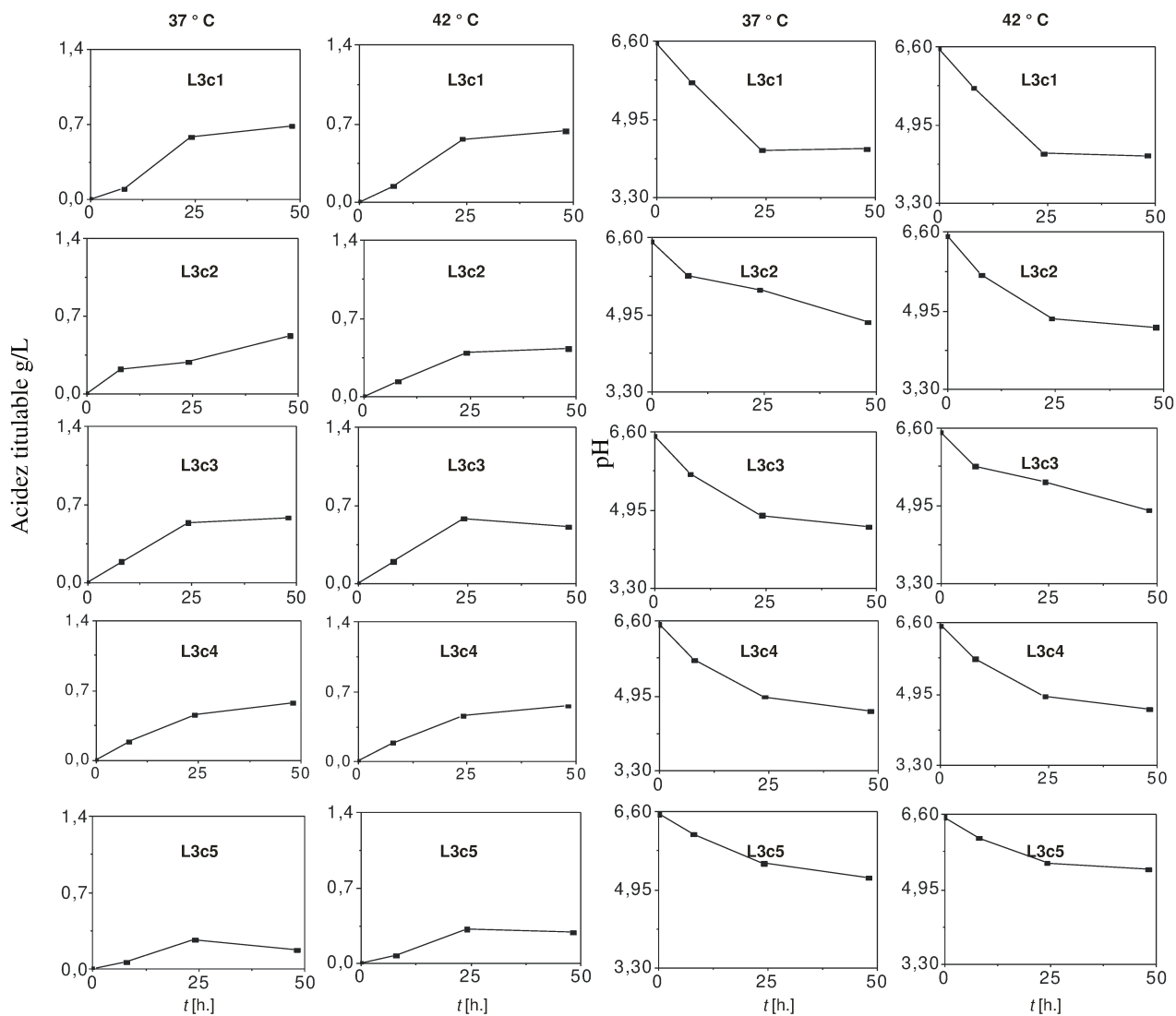


Fig. A.3. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Lácteos HerBal (Porteña, Córdoba).

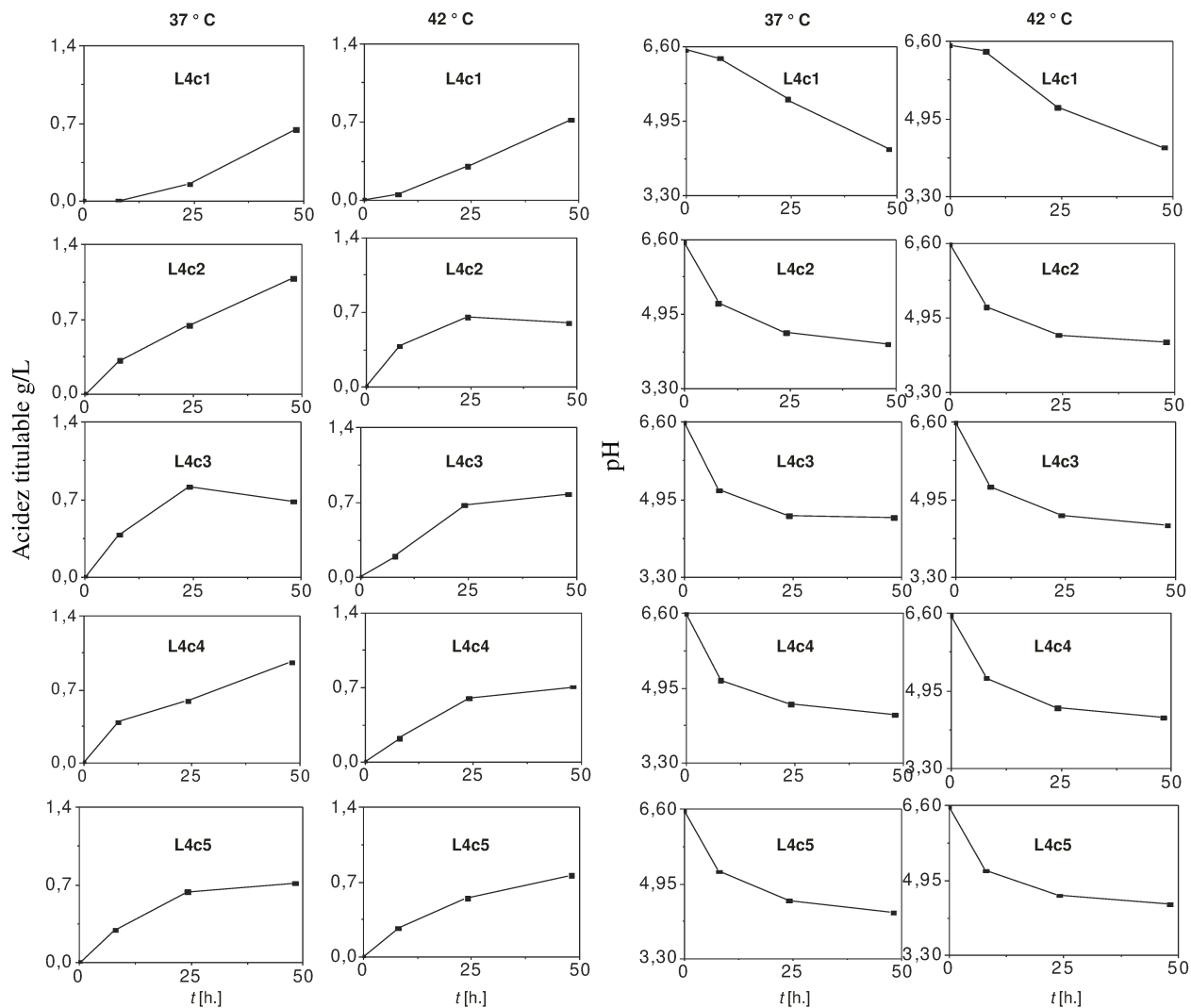


Fig. A.4. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por La lecherita. Lácteos República de Entre Ríos SRL (Nogoyá, Entre Ríos).

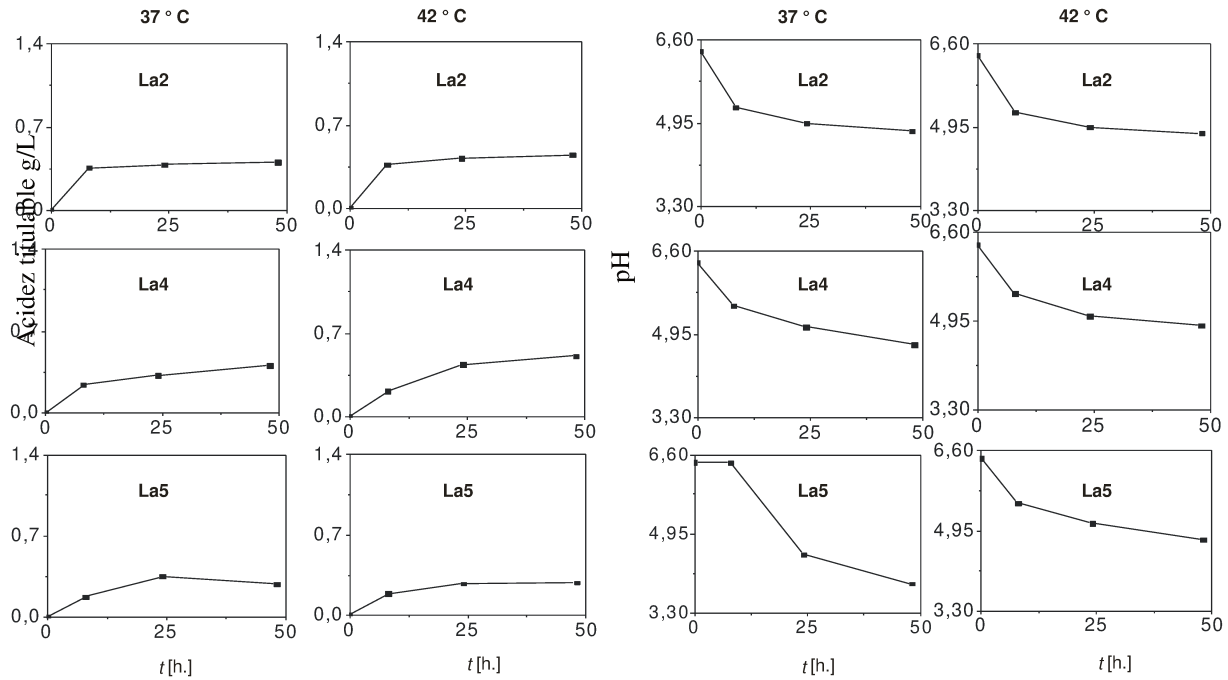


Fig. A.5. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de leche cruda provista por Lácteos HerBal (Porteña, Córdoba).

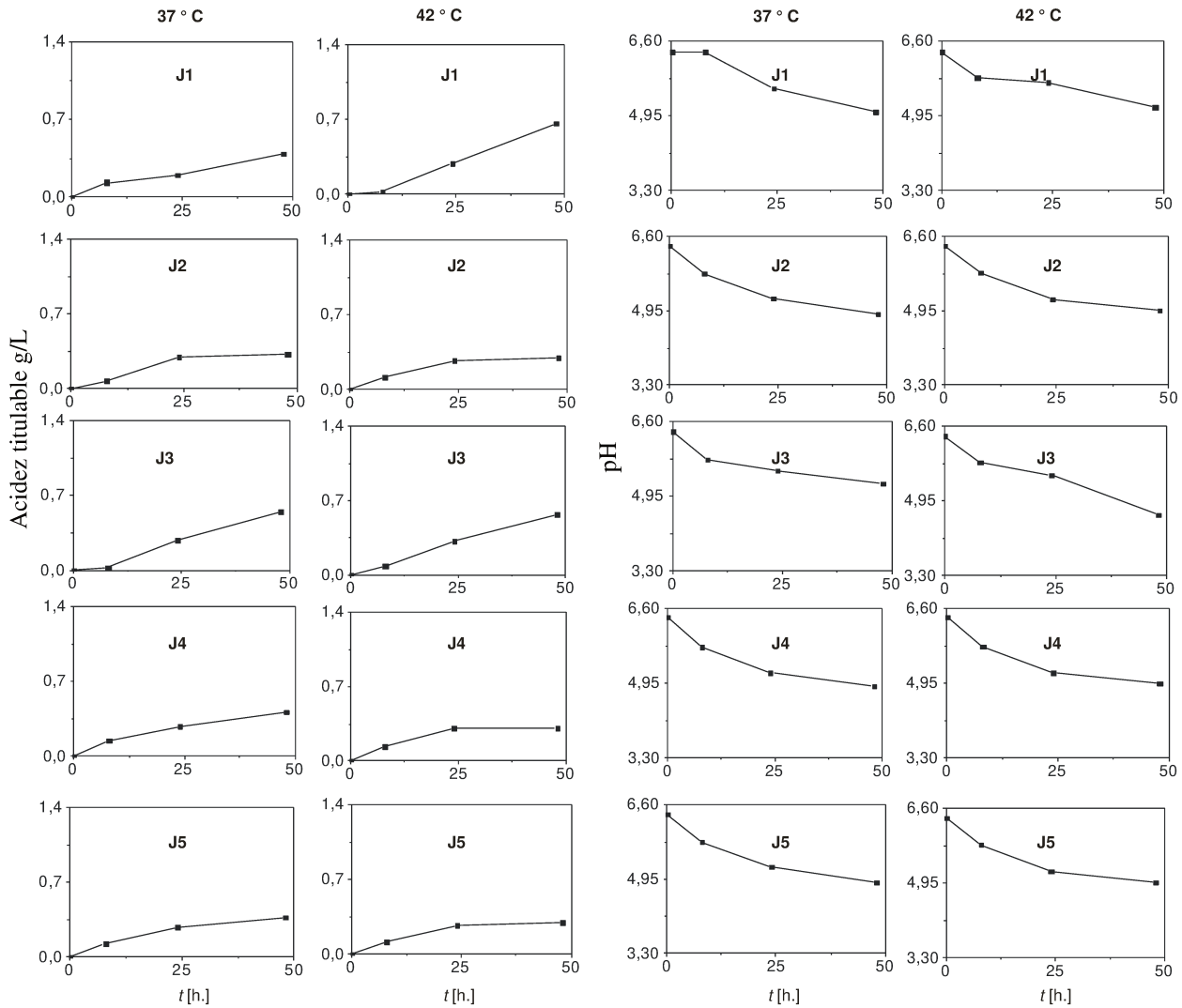


Fig. A.6. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Lácteos Don Silvano (Josefina, Santa Fe).

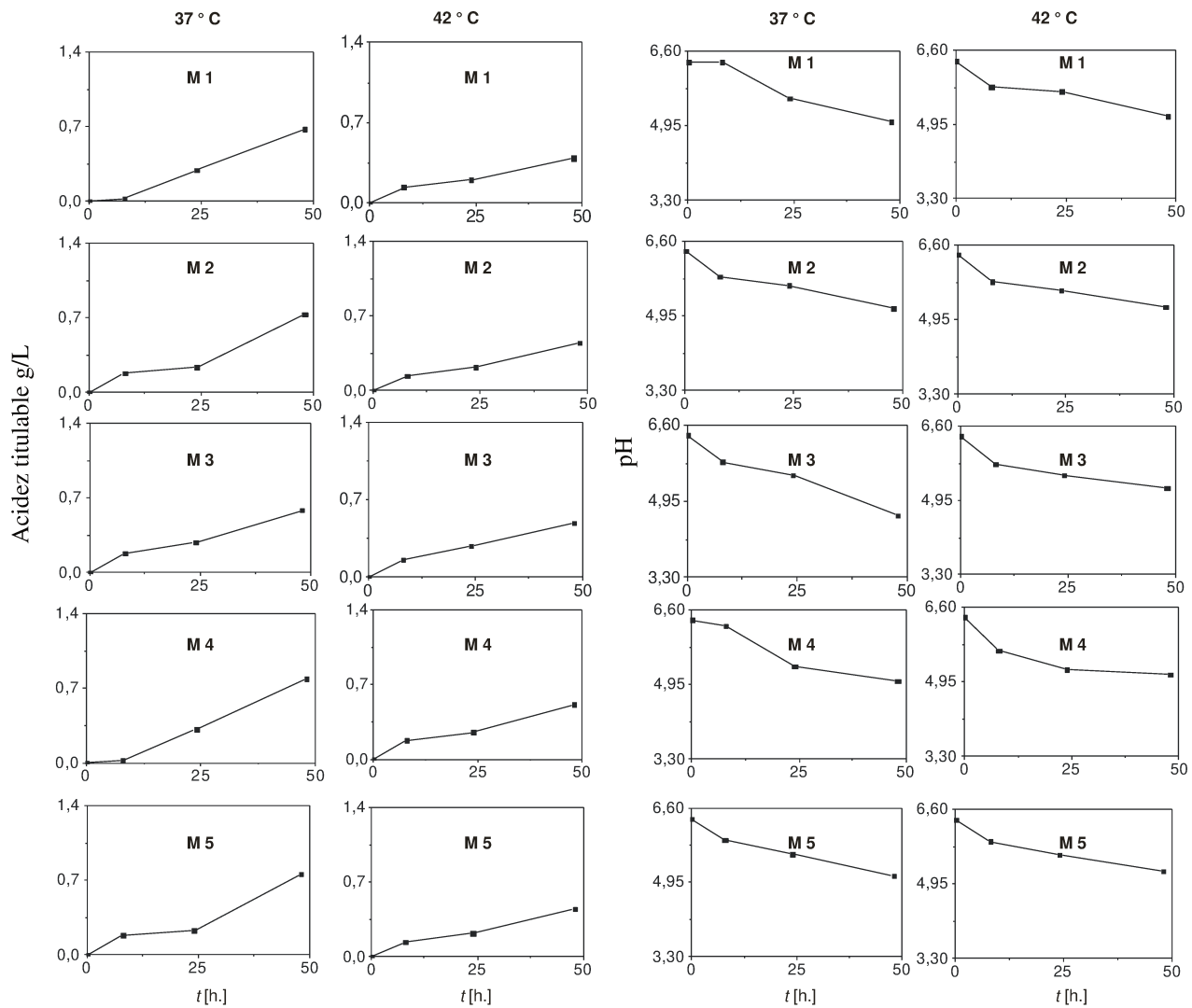


Fig. A.7. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Manfrey Cooperativa de Tamberos Ltda. (Freyre, Córdoba).

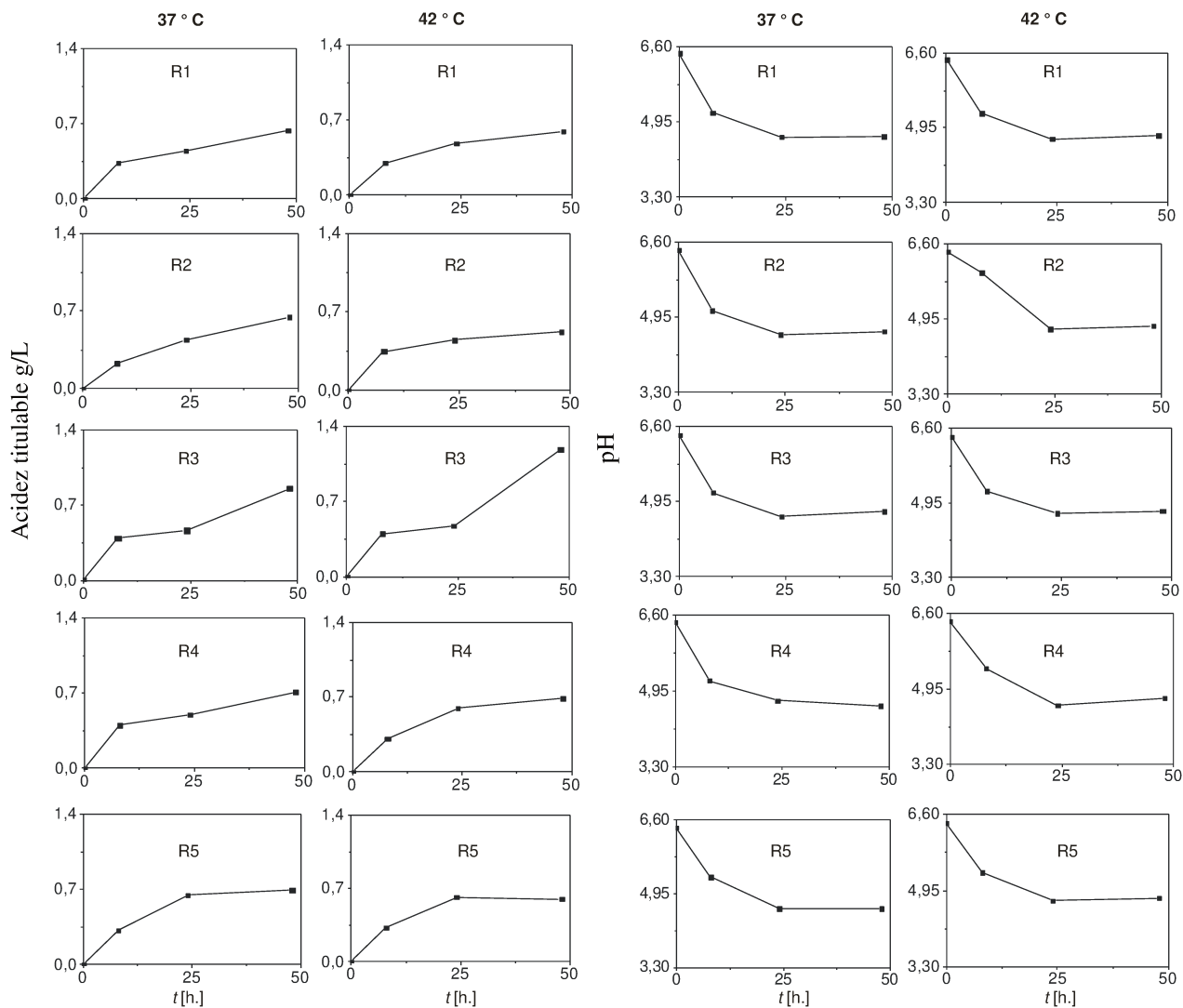


Fig. A.8. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Lácteos Ramolac (Ramona, Santa Fe).

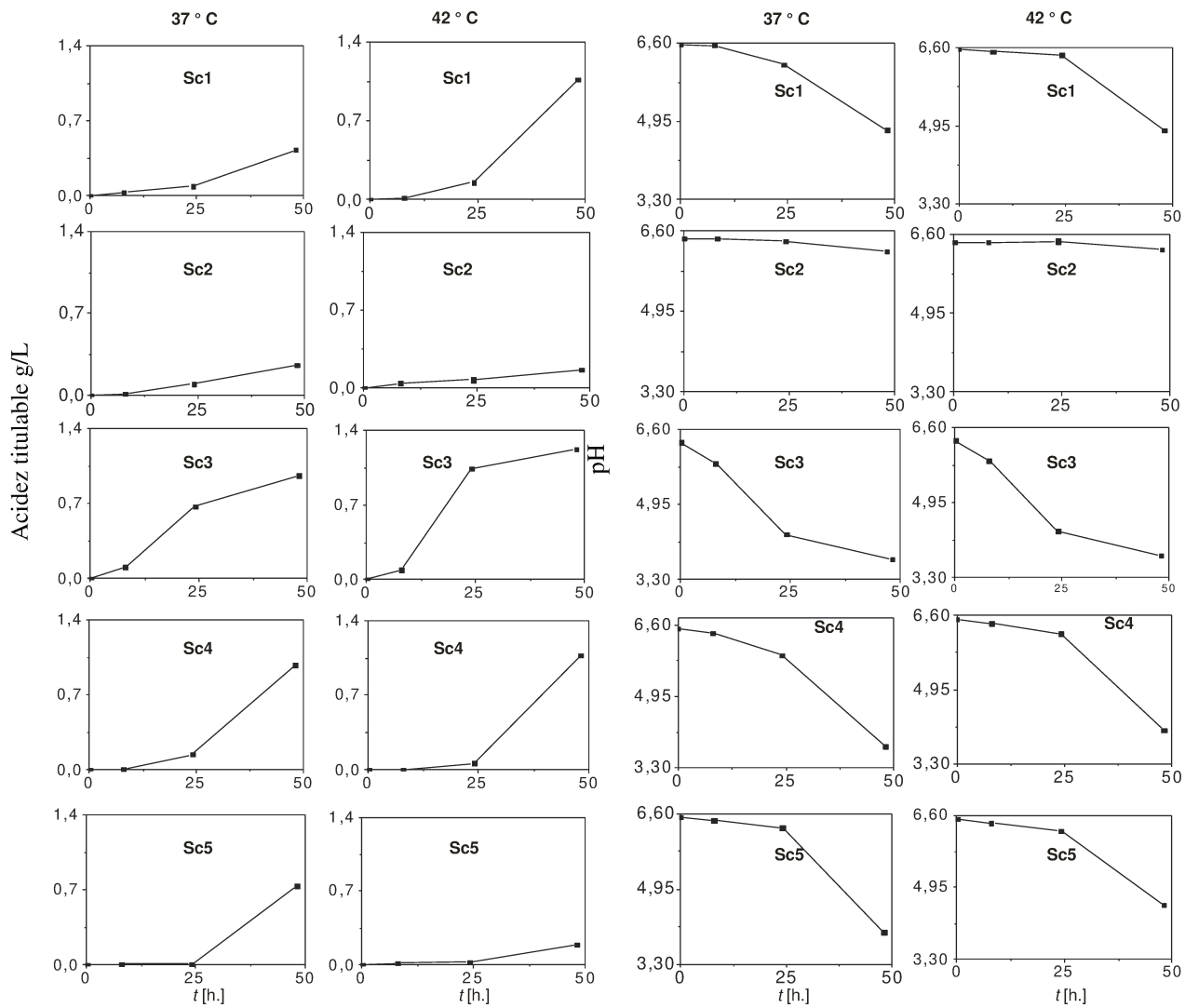


Fig. A.9. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por SanCor Cooperativas Unidas Ltda. (Devoto, Córdoba).

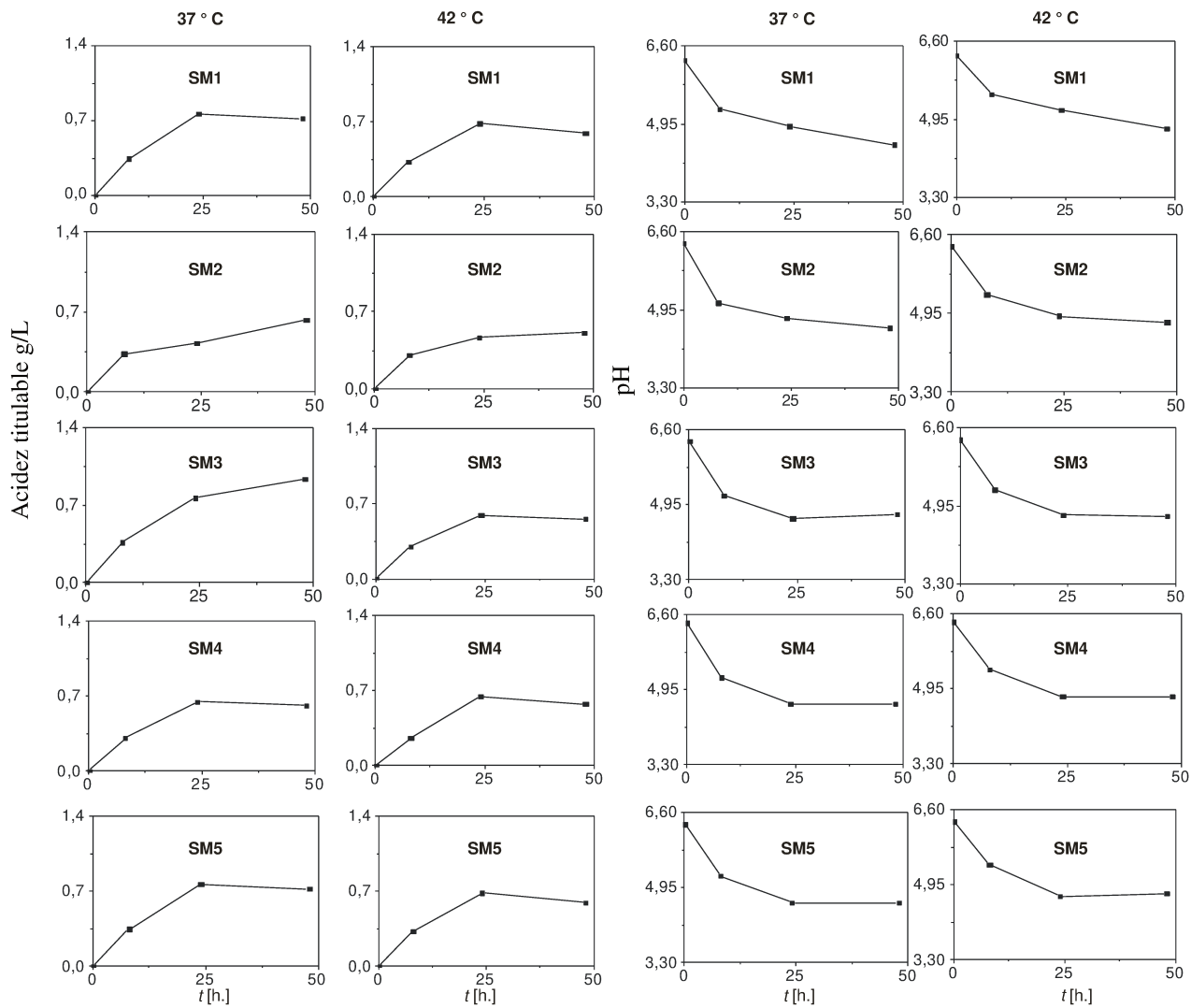


Fig. A.10. Evolución temporal de acidez titulable y pH de los aislados de BAL de la muestra de lactosuero provista por Lácteos Santa María SRL (San Francisco, Córdoba).



Referencias Bibliográficas

Páginas de internet

www.ocla.org.ar

www.gminsights.com/industry-analysis/lactic-acid-and-polylactic-acid-market

Papers, patentes y libros.

Abdel-Rahman, M.A.; Tashiro, Y.; Sonomoto, K. 2013. "Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes." *Biotechnology Advances* 31: 877-902.

Arellano Arriaga, A. 2013. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos "Evaluación del proceso de obtención y separación de Ácido Láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana." Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química Posgrado de Alimentos del Centro de la República. Santiago de Querétaro, Querétaro. México.

Ahmed, J.; Zhang, J.; Song, Z.; Varshney, S.K. 2009. "Thermal properties of polylactides effect of molecular mass and nature of Lactide isomer." *Journal Of Thermal Analysis and Calorimetry* 95 (3): 957-964.

Alonso, S.; Herrero, M.; Rendueles, M.; Díaz, M. 2010. "Residual yoghurt whey for Lactic Acid production." *Biomass and Bioenergy* 34 (7): 931-938.

Altioik, B. D. 2006. Tesis para obtener el título de Maestro de Ciencia. Departamento de Ingeniería de los Alimentos. "Kinetic modelling of Lactic Acid production from whey." Izmir Institute of Technology Izmir, Turkey.

Audet, P. C.; Lacroix, C. y Paquin, C. 1991. "Continuous fermentation of a supplemented whey permeate medium with immobilized *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*". *Int. Dairy Journal* 1: 1-15.

Badui Dergal, S. 2009. *Química de los Alimentos*. Edited by Ed. Pearson Educación. 3ra Edición.

Báez, J. E. 2010. “Cómo obtener un polímero degradable en el laboratorio : síntesis de la Poli (D, L-Lactida) y caracterización por ^1H RMN. *Educación química*, 21(2), 170-177.

Bao, Y.; Yanchao, Z.; Yong, Z.; Yong, L.; Shuiquan, W.; Ximei, D.; Yanyan, W.; Heping, Z. 2010. “Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus Fermentum* isolated from traditional dairy products.” *Food Control* 21 (5): 695-701.

Bergmaier, D.; Champagne, C. P. y Lacroix, C. 2005. “Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M.” *Journal of Applied Microbiology* 98: 272-284.

Berry, A. R.; Christopher, M.M.; Wei, Z. y Middelberg, A.P.J. 1999. “Growth and Lactic Acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium.” *Biotechnology Letters* 21 (2): 163-167.

Bouchoux, A.; Roux-de Balmann, H.; Lutin, F. 2006. “Investigation of Nanofiltration as a purification step for Lactic Acid production processes based on conventional and Bipolar Electrodialysis operations.” *Separation and Purification Technology* 52 (2): 266-273.

Boussu, K.; Baerdemaeker, J.; Dauwe, C.; Weber, M.; Lynn, K. G.; Depla, D.; Steliana, A.; Vankelecom, C. ; Vandecasteele, C. y Van Der Bruggen. B. 2007. “Physico-chemical characterization of Nanofiltration Membranes.” *ChemPhysChem* 8 (3): 370-379.

Burgos-Rubio, C. N.; Okos, M. R. y Wankat. P. C. 2000. “Kinetic study of the conversion of different substrates to Lactic Acid using *Lactobacillus bulgaricus*.” *Biotechnology Progress* 16 (3): 305-314.

Büyükkileci, A.O. y Harsa, S. 2004. “Batch production of L(+) Lactic Acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441).” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79 (9): 1036-1040.

Cao, X.; Hyun S. y Yoon-mo K. 2002. “Recovery of L- (+)-Lactic Acid by Anion Exchange Resin” *Biochemical Engineering Journal* 11: 189-196.

Cardona Alzate, C. A.; López Giraldo L.J. y López Suárez F.E. 2004. "Separación de Ácido Láctico por destilación reactiva." *Revista Universidad EAFIT* 40 (135): 40-53.

Carlson, T. L. y Peters, E. M. 2002. United States Patent US 6,475,759 B1.

Carvalho, F.; Prazeres, A. R. y Rivas, J. 2013. "Cheese whey wastewater: characterization and treatment." *Science of the Total Environment* 445-446: 385-396.

Cebeci, A.; Gürakan, C. 2002. "Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains." *Food Microbiology* 20: 511-518.

Champagne, C. P.; Gaudy, C.; Poncelet, D. y Neufeld R. J. 1992. "*Lactococcus lactis* release from calcium alginate beadst." *Applied and Environmental Microbiology* 58 (5): 1429-1434.

Chiarini, L.; Mara, L. y Tabacchioni, S. 1992. "Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*." *Applied Microbiology Biotechnology* 36: 461-464.

Choi, J. y Hong W. H. 1999. "Recovery of Lactic Acid by batch distillation with chemical reactions." *Journal of Chemical Engineering* 32 (2): 184-89.

Codari, F. 2011. "Poly (Lactic Acid) Polycondensation , degradation and nanoparticles synthesis," Tesis para obtener el título de Maestro de Ciencia en Ingeniería Química. Politecnico di Milano. Milano, Italia.

Colmenero de Miguel, C.; Colomo Herranz, B.; Conejo Sánchez; A. y Cutuli de Simón, M.T. 2009. "Vida social de las bacterias: aquí no hay quien viva" *RCCV* 3 (2): 235-243.

Corre, Y.M.; Maazouz, A.; Duchet, J. y Reignier, J. 2011. "Batch foaming of chain extended PLA with supercritical CO₂: Influence of the rheological properties and the process parameters on the cellular structure." *Journal of Supercritical Fluids* 58 (1): 177-188.

Cuervo Garcés, L.V. y Echeverry Vargas, J.C. 2016. "Evaluación de la síntesis de Ácido

Poliláctico proveniente del suero de quesería a nivel laboratorio.” Proyecto Integral de Grado para obtener el título de Ingeniero Químico. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. Programa de Ingeniería Química Bogotá, Colombia.

Cueto, C. y Aragón, S. 2012. “Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*.” *Scientia Agropecuaria* 1: 45 - 50.

Cui, F.; Caixia W.; Yebo L.; Zhe L. y Gireesh R. 2012. “Co-production of Lactic Acid and *Lactobacillus rhamnosus* cells from whey permeate with nutrient supplements.” *Food and Bioprocess Technology* 5 (4): 1278-1286.

Cuichán, R. 2015. “Obtención de Ácido Poli-Láctico a partir de lactosuero para la fabricación de empaque primarios.” Tesis para obtener el título de Magister en Industrias Pecuarias, Mención en Industrias de Lácteos. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Chimborazo, Ecuador.

Cury Regino, K.; Arteaga Márquez, M.; Martínez Flórez, G.; Luján Rhenals, D. y Durango Villadiego, A. 2014. “Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (Entero y Desproteínizado) utilizando *Lactobacillus Casei*.” *Revista Colombiana de Biotecnología* 1 (1): 137-145.

Datta, R. y M. Henry. 2006. “Lactic Acid : recent advances in products , processes and technologies – a Review.” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 1119-1129.

Delgado, P.; Sanz, M.T. y Beltrán, S. 2007. “Kinetic study for esterification of Lactic Acid with ethanol and hydrolysis of Ethyl Lactate using an Ion-Exchange Resin catalyst.” *Chemical Engineering Journal* 126 (2–3): 111-118.

De Vries Klaas S. 1989. United States Patent US005664913A.

Dusselier, M.; Van Wouwe, P.; Dewaele, A.; Makshina, E. y Sels, B. F. 2013. “Lactic Acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis.” *Energy and Environmental Science* 6 (6): 1415-1442.

Dutkiewicz, S. y Grochowska-Lapienis, D. 2003. "Synthesis of Poly (L (+) Lactic Acid) by polycondensation method in solution" *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 11 (4): 66-70.

Efthimiadou, E.K.; Tziveleka, L.A.; Bilalis, P.; Kordas G. 2012. " Novel PLA modification of organic microcontainers based on ring opening polymerization: Synthesis, characterization, biocompatibility and drug loading/release properties". *International Journal of Pharmaceutics* 428: 134-142.

Feng, L.; Xuesi C.; Xinchao B.; Sheng X.; Bin S. y Zhiming C. 2012. "Chemometrics and intelligent laboratory systems calculating D -Lactide content by probability using Gas Chromatographic data Lactic Acid prepolymer crude Lactide refined high molecular weight PLA refined Lactide." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 110 (1): 32-37.

Fitzpatrick, J.J.; Ahrens, M. y Smith, S. 2000. "Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce Lactic Acid from whey permeate." *Process Biochemistry* 36: 671-75.

Fu, W. y Mathews, A. P. 1999. "Lactic Acid production from Lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate and oxygen." *Biochemical Engineering Journal* 3 (3): 163-70.

Fuentes, D. A.; Díazgranados M. A. y Perilla J. E. 2006. "A method to obtain high purity Lactide," 2: 115-123.

Gamez Mayes, J. A. 2008. "Sintesis y Caracterizacion de Copolimeros a base de Ácido Láctico". Tesis para obtener el título de Maestro en Tecnología Avanzada. Instituto Politecnico Nacional. Cicata, Altamira. México.

Garlotta D. 2001. "A Literature Review of Poly(Lactic Acid)." *Journal of Polymers and the Environment* 9 (2): 63-84.

Ghaffar, T.; Irshad M.; Anwar, Z.; Aqil, T.; Zulifqar, Z.; Tariq, A.; Kamran, M.; Ehsan, N. y Mehmood, S. 2014. "Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: A Brief Review on Production to Purification." *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7 (2): 222-

229.

Gil-Horán, R. H.; Domínguez-Espinosa, R. M. y Pacho-Carrillo, J. D. 2008. "Bioproducción de Ácido Láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: procesos de separación y purificación" *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* 23 (232): 79-90.

Gonzalez, J.; Mas, M.; Tabla, R.; Moriche, J.; Roa, I.; Rebollo, J. E.; Cáceres, P. 2003. "Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of ibores goat's milk cheeses." *Lait* 83: 193-202.

González, M. I.; Alvarez, S.; Riera, F. A. y Álvarez, R. 2008. "Lactic Acid Recovery from Whey Ultrafiltrate Fermentation Broths and Artificial Solutions by Nanofiltration." *Desalination* 228 (1-3): 84-96.

González Cáceres, M. 2012. "Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la Industria Láctea" *Mundo Pecuario* 1: 16-32.

Groot, W.; Krieken, J.V.; Sliekersl, O. y De Vos, S. 2010. *Chemistry and production of Lactic Acid, Lactide, and Poly(Lactic Acid)*. In *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Edited by Inc. John Wiley & Sons.

He, Y.; Guang M. L.; Hua W.; Zhu W. J.; Zhao, J.; He X. S. y Qun Y. H. 2009. "Experimental Study on the Rejection of Salt and Dye with Cellulose Acetate Nanofiltration Membrane." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40 (3): 289-295.

Henton, D. E. ; Gruber, P.; Lunt, J. y Randall J. 2005. "Polylactic Acid Technology." *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites* 527-578.

Hitomi Ohara, K.; Masahiro Ito, K.; Seiji Sawa, O. 2003. United States Patent US 6,569,989 B2

Hofvendahl, K. y Hahn-Hägerdal B. 2000. "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources." *Enzime and Microbial Technology* 26: 87-107.

Holzappel, W. y Wood, B. 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Edited by Wiley Blackwell.

Hujanen, M. y Linko, Y. Y. 1996. "Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+)- Lactic Acid production by *Lactobacillus casei*" *Applied Microbiology Biotechnology* 45: 307-313.

Idage, B. B.; Idage, S. B.; Kasegaonkar A. S. y Jadhav R. V. 2010. "Ring Opening Polymerization of dilactide using salen complex as catalyst." *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology* 168 (1): 193-198.

Inkinen, S.; Hakkarainen, M.; Albertsson, A. C. y Södergård, A. 2011. "From Lactic Acid to Poly(Lactic Acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors." *Biomacromolecules* 12 (3): 523-532.

Jadhav, S.; Gulati, V.; Fox, E. M.; Karpe, A.; Beale, D. J.; Seviour, D.; Bhave, M. y Palombo, E. A. 2015. "Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry." *International Journal of Food Microbiology* 202: 1-9.

Jelen, P. 2011. "Whey Processing, Functionality and Health Benefits." In *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, 731-737.

Julien, J. M.; Bénézet, J. C.; Lafranche, E.; Quantin, J. C.; Bergeret, A. y Lacrampe, M. 2012. "Development of poly (lactic acid) cellular materials : physical and morphological characterizations." *Polymer* 53: 5885-5895.

Kaihara, S.; Matsumura, S.; Mikos, A. G. y Fisher, J. P. 2007. "Synthesis of poly(l-lactide) and polyglycolide by ring-opening polymerization." *Nature Protocols* 2 (11): 2767-2771.

Kazemi, A. y Baniardalan, P. 2001. "Production of lactic acid from whey by immobilized cells." *Scientia Iranica* 8 (3): 218-222.

Komesu, A.; Johnatt A.; De Oliveira, R. y Silva Martins. 2017. "Lactic Acid production to

purification: a review.” *BioResources* 12 (2): 4364-4383.

Köhn, R. D.; Pan, Z.; Sun, J. y Liang, C. 2003. “Ring-Opening Polymerization of D , L - Lactide with bis (trimethyl triazacyclohexane) praseodymium triflate.” *Catalysis Communications* 4: 33-37.

Kumar, R.; Mahajani, S. M.; Nanavati, H. y Noronha, S. B. 2006. “Recovery of lactic acid by batch reactive distillation” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 1141-1150.

Kwak, H.; Hwang, D. W.; Hwang, Y. K. y Chang, J. S. 2012. “Recovery of alkyl lactate from ammonium lactate by an advanced precipitation process.” *Separation and Purification Technology* 93: 25-32.

Kylmä, J.; Tuominen, J.; Helminen A. y Seppälä J. 2001. “Chain Extending of lactic acid oligomers. effect of 2,2'-bis(2-oxazoline) on 1,6-hexamethylene diisocyanate linking reaction.” *Polymer* 42: 3333-3343.

Lambolely, L.; Lacroix, C.; Champagne C. P. y Vuilleumard J. C. 1997. “Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology.” *Biotechnology and Bioengineering*, VOL. 56 (5): 502-516.

Lasprilla, A. J. R.; Martinez, G. A. R.; Lunelli, B. H.; Jardini, A. L. y Filho, R. M. 2012. “Poly-Lactic Acid Synthesis for Application in Biomedical Devices - A Review.” *Biotechnology Advances* 30 (1): 321-328.

Lemmouchi, Y.; Perry, M. C.; Amass, A. J.; Chakraborty, K.; Schué, F. 2007. "Novel synthesis of biodegradable poly(lactide-co-ethylene glycol) block copolymers". *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 45: 2235-2245.

Li, Y.; Shahbazi, A.; Williams, K. y Wan, C. 2008. “Separate and concentrate lactic acid using combination of nanofiltration and reverse osmosis membranes.” *Chemical Engineering Transactions* 985-990.

Liu, X.; Chung Y. K.; Yang S. T. y Yousef, A. E. 2005. “continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*.” *Process Biochemistry* 40 (1): 13-24.

López, D. D. A. 2007. “Estudio y síntesis en la producción de Lactido (PLA).” Tesis para obtener el título de Maestro en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Altamira. Cicata-Altamira. México.

Lunt, J. 1998. “Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers.” *Polymer Degradation and Stability* 59: 145-152.

Machado, A.; Gorrochotegui, L. y Cárdenas, A. 2007. “Lactic Acid separation from fermented whey using electrodialysis.” *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia* 30 (1): 56-63.

Martin, O. y Avérous, L. 2001. “Poly (Lactic Acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems” *Polymer* 42: 6209-6219.

Mikelsaar, M. y Zilmer, M. 2009. “Lactobacillus Fermentum ME-3 an antimicrobial and antioxidative probiotic.” *Microbial Ecology in Health and Disease*. 21: 1-27.

Mondragón-Parada, M. E.; Nájera-Martínez, M.; Juárez-Ramírez, C.; Galíndez-Mayer, J.; Ruiz-Ordaz, N. y Cristiani-Urbina, E. 2006. “Lactic Acid bacteria production from whey.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 134 (3): 223-232.

Muñi, A.; Páez, G.; Faría, J.; Ferrer, J. y Ramones E. 2005. “Eficiencia de un sistema de Ultrafiltración/Nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración de lactosuero.” *Revista Científica FCV-LUZ* 15 (4): 361-367.

Nilsen, T.; Nes, I. F.; Holo, H. 2003. “Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (5) 2975-2984.

Nampoothiri, K. M.; Nair, N. R. y Rojan Pappy, J. 2010. “An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research.” *Bioresource Technology* 101 (22): 8493-8501.

Norddhal, B. 2001. United States Patent. US6319382B1.

Pal, P.; Sikder, J.; Roy, S. y Giorno, L. 2009. “process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes.” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48: 1549-1559.

Panesar, P. S.; Kennedy, J. F.; Gandhi, D. N. y Bunko, K. 2007. “Bioutilisation of whey for lactic acid production.” *Food Chemistry* 105: 1-14.

Panesar, P. S.; Kennedy, J. F.; Knill, C. J. y Kosseva, M. 2010. “Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from whey.” *Brazilian Archives of Biology and Technology* 5 (1): 219-226.

Parra Huertas, R. A. 2009. “Whey : Importance in the food industry.” *Revista Facultad Nacional Agropecuaria Medellín* 62 (1): 4967-82.

Parra Huertas, R. A. 2010. “Review Lactic Acid Bacteria: Functional role in the foods.” *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 8 (1): 93-105.

Petrov, K.; Petrova P. y Beschkov, V. 2007. “Improved Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in Polyacrylamide gel , preventing cell leakage during lactic acid fermentation.” *World J Microbiol Biotechnology* 23: 423-428.

Porter, K. 2006. “Ring open polymerization of Lactide for the synthesis of Poly (Lactic Acid).” 25-32.

Rawlings, D. E. y Johnson D. B. 2007. “The Microbiology of biomining : development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia.” *Microbiology* 153: 315-324.

Ríos Castro, A. 2011. “Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando la tecnología de membranas.” Tesis

pata obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Química. Querétaro. México.

Rojas, A. M.; Montaña, L. P. y Bastidas, M. L. 2016. "Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*." *Revista Colombiana de Química* 44 (3): 5-10.

Romo-Buchelly, J.; Rodríguez-Torres, M.; Orozco-Sánchez, F. 2019. "Biotechnological valorization of agro industrial and household wastes for lactic acid production." *Rev. Colomb. Biotecnol.* 21(1):83 - 97.

Roukas, T. y Kotzekidou, P. 1991. "Production of Lactic Acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells." *Enzyme and Microbial Technology* 13: 33-38.

Salminen, S.; Wright, A. V. y Ouwehand, A. 2004. *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspect*. Edited by Board. 3ra. Edición.

Sánchez, N.; Ramírez, D. y Zapata, A. 2007. "Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato." *Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 14 (2): 22-34.

Schepers, A. W.; Thibault, J. y Lacroix, C. 2002. "*Lactobacillus helveticus* growth and Lactic Acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. part i. multiple factor kinetic analysis." *Enzyme and Microbial Technology* 30: 176-186.

Schepers, A. W.; Thibault, J. y Lacroix, C. 2006. "Continuous Lactic Acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and Experiments." *Enzyme and Microbial Technology* 38 (3-4): 324-337.

Senthuran, A.; Senthuran, V.; Hatti-kaul, R. y Mattiasson, B. 1999. "Lactic Acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards

Optimization.” *Journal of Biotechnology* 73: 61-70.

Seo, Y.; Hi Hong, W. y Hong, T. H. 1999. “Effects of operation variables on the recovery of Lactic Acid in a batch distillation process with chemical reactions” *Korean Journal of Chemical Engineering* 16(5): 556-561.

Serna-Cock, L. y Rodríguez-de Stouvenel A. 2009. “Biotechnological Production of Lactic Acid: state of the art.” *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5 (1): 54-65.

Sin, L. T.; Tuen, B. S. 2019. Poly(Lactic Acid). A Practical Guide for the Processing, Manufacturing, and Applications of PLA. Second Edition. Ed. William Andrew-Elsevier.

Srivastava, A.; Roychoudhury, P. y Sahai, V. 1992. “Extractive Lactic Acid fermentation using ion-exchange resin.” *Biotechnology and Bioengineering* 39 (6): 607-613.

Staniforth, M.; O`Hanlon, M.; Khong, T. M. 1999. “Comparative study of lactic acid and polylactides using static headspace, gas chromatography and high-performance liquid chromatography. ”. *Journal of Chromatography A* 833: 195 - 208.

Sun, X.; Wang, Q.; Zhao, W.; Ma, H. y Sakata, K. 2006. “Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method.” *Separation and Purification Technology* 49 (1): 43-48.

Tejeda Benítez, L. P.; Villabona Ortiz, A.; Tejeda Tovar, C. y Tejeda Benítez, L. M. 2007. “Acido Poliláctico: Un plástico biodegradable a partir del almidón.” *Revista Teknos* 3: 43-48.

Toor, A. P.; Sharma, M.; Thakur, S. y Wanchoo R. K. 2011. “Ion-Exchange Resin catalyzed esterification of lactic acid with isopropanol : a kinetic study” 6 (1): 39-45.

Torriani, S.; Felis, G. E.; Dellaglio, F.; Torriani, S. y Felis, G. E. 2001. “Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with RecA Gene-Derived Primers.” *Applied and Environmental Microbiology* 67 (8): 3450-3454.

Upare, P. P.; Hwang, Y. K.; Chang, J. S. y Hwang, D. W. 2012. "Synthesis of Lactide from alkyl lactate via a prepolymer route." *Industrial and Engineering Chemistry Research* 51 (13): 4837-4842.

Urribarrí, L.; Vielma, A.; Paéz, G.; Ferrer, J.; Mármol, Z. y Ramones, E. 2004. "Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo." *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia* 14 (4): 1-11.

Vaccari, G.; González-Vara, A.; Campi, A. L.; Dosi, E.; Brigidi, P. y Matteuzzi, D. 1993. "Fermentative production of L-Lactic Acid by *Lactobacillus casei* DSM 20011 and product recovery using ion exchange resins." *Applied Microbiology and Biotechnology* 40: 23-27.

Vaidya, A. N.; Pandey, R. A.; Mudliar, S.; Suresh Kumar, M.; Chakrabarti T. y Devotta S. 2005. "Production and recovery of Lactic Acid for Polylactide - An Overview." *Environmental Science and Technology* 35 (5): 429-467.

Villegas, E. y Gilliland, S.E. 1998. "Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* at 5°C". *Journal of Food Science* 63 (6): 1070-1074.

Vink, E.T.H.; Glassner, D.A.; Kolstad, J.J.; Wooley R.J. y O'Connor R.P. 2007. "The ecoprofiles for current and near-future NatureWorks® polylactide (PLA) production." *Industrial Biotechnology* 3 (1): 58-81.

Vuan, Victoria. 2018. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biotecnología "Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables" Universidad ORT. Facultad de Ingeniería. Montevideo, Uruguay.

Waldir, E.; Rychtera, M.; Melzoch, K.; Quillama E. y Egoavil E. 2007. "Producción de Ácido Láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo." *Rev. Peru. Biol* 14 (2): 271-275.

Wang, X. L.; Shang, W. J.; Wang, D. X.; Wu, L. y Hui Tu, C. 2009. "Characterization and

applications of nanofiltration membranes: state of the art.” *Desalination* 236: 316-326.

Wang, K.; Li, W.; Fan, Y. y Xing, W. 2013. “Integrated membrane process for the purification of lactic acid from a fermentation broth neutralized with sodium hydroxide.” *Industrial and Engineering Chemistry Research* 52: 2412-2417.

Wang, Y.; Tashiro, Y. y Sonomoto, K. 2015. “Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119 (1): 10-18.

Wee, Y. J.; Yun, J.S.; Park, D. H. y Ryu, H. 2004. “Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*.” *Biotechnology Letters*. 26: 71-74.

Wee, Y. J.; Kim, J. N. y Ryu, H. 2006. “Biotechnological production of Lactic Acid and its recent applications.” *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2): 163-172.

Wee, Y. J. y Ryu, H. W. 2009. “Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials.” *Bioresource Technology* 100: 4262-4270.

Xiao, L.; Wang, B.; Yang, G. y Gauthier, M. 2012. “Poly (Lactic Acid) -based biomaterials : synthesis , modification and applications.” *Biomedical Science, Engineering and Technology* 247-282.

Yoo, D. K. y Kim, D. 2006. “Synthesis of Lactide from oligomeric pla: effects of temperature, pressure, and catalyst.” *Macromolecular Research* 14 (5): 510-516.

Yu, Y.; Storti, G.; Morbidelli, M. 2009. “Ring-Opening Polymerization of L,L-Lactide: Kinetic and Modeling Study. ” *Macromolecules* 42: 8187–8197.

Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.; Harris, H.; Mattarelli, P.; O'Toole, P.; Pot, B.;

Walter, J.; Watanabe, K.; Wuyts, S.; Felis, G.; Gänzle, M.; Lebeer, S. 2020. "A taxonomic note

on the genus *Lactobacillus* : Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck 1901*, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*".

Zhao, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Mai, H.; Yan, B. y Yang, F. 2003. "Direct Synthesis of Poly (D , L -Lactic Acid) by Melt Polycondensation and Its Application in Drug Delivery." *Journal of Applied Polymer Science* 91: 2143-2150.

Zhao, J. y Wilkins, R. M. 2005. "Low Molecular Weight Polylactic Acid as a Matrix for the Delayed Release of Pesticides." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4076-4082.

Zhao, W.; Sun, X.; Wang, Q.; Ma, H. y Teng, Y. 2009. "Lactic Acid recovery from fermentation broth of kitchen garbage by esterification and hydrolysis method" *Biomass and Bioenergy* 33: 21-25. ERA. *Education and research archive*.