

SÍNTESIS DE ÁCIDO POLILÁCTICO PROVENIENTE DEL SUERO DE QUESERÍA A NIVEL LABORATORIO

Laura Viviana Cuervo Garcés, Julio César Echeverry Vargas

Facultad de Ingenierías, Departamento de Ingeniería Química. Fundación Univ. América, Avda. Circunvalar No. 20–53, Bogotá (Colombia). Correos electrónicos: laura.cuervo@estudiantes.uamerica.edu.co; julio.echeverry@estudiantes.uamerica.edu.co

Recibido: Enero 2017; Aceptado: Mayo 2017

RESUMEN

Los polímeros biodegradables han generado múltiples estudios ya que contrarrestan los daños medioambientales ocasionados por los polímeros derivados del petróleo y su extensa duración. Recientes estudios se han encargado de ver la aplicabilidad del ácido poliláctico (PLA) como polímero termoresistente, termoestable y biodegradable en el uso de bolsas, empaques, botellas e incluso para prótesis y como fibra textil. El PLA producido se estudió mediante la fermentación de la simbiosis de *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus* utilizando dos tipos de sustrato: suero desproteínizado y suero sin desproteínizar, con el fin de observar la producción de ácido láctico, arrojando valores de 9,81 y 11,05 g/L respectivamente. La separación se realizó por el método de extracción líquido–líquido utilizando éter dietílico, donde los porcentajes de recuperación fueron: 78,90% para suero desproteínizado y 79,10% para el suero sin desproteínizar, para demostrar la presencia de ácido láctico se realizó una prueba de espectroscopia infrarroja la cual demostró en el espectro los grupos funcionales correspondientes. La polimerización es realizada por el método llamado apertura abierta del anillo (ROP) con la síntesis de un diéster de ácido láctico denominado lactida, en presencia de metanol y cloruro de estaño II como catalizador, a una temperatura de 60°C. Además se determinó y caracterizó dicho polímero por el método de espectroscopia infrarroja y difracción de rayos X, dando lugar en el espectro a los grupos funcionales del PLA, y en el difractograma el pico característico a la cristalinidad del PLA.

Palabras clave: Ácido poliláctico, ácido láctico, polimerización, fermentación, extracción líquido–líquido.

ABSTRACT

The biodegradable polymers have generated multiple studies since they counteract the environmental damages caused by petroleum polymers and their long duration. Recent studies have examined the applicability of polylactic acid (PLA) as a thermosetting, thermosetting and biodegradable polymer in the use of bags, packaging, bottles and even prostheses and as textile fiber. The PLA produced in this work through the process of fermentation, which was studied by the use of the symbiosis of *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus* using two types of substrate: deproteinized whey and whey without deproteinization, with the final purpose to watch the effect of the production of lactic acid, throwing values of 9.81 and 11.05 g/L respectively. The separation was made by the method of extraction liquid–liquid used diethyl ether where percentages recovery was: 78.90% for deproteinized whey and 79.10% for whey without deproteinization, for show the presence of lactic acid was realized an infrared spectroscopy, which showed in the spectrum the functional groups corresponding. The polymerization was made for the method called ring open polymerization for the synthesis of a diester of lactic acid called lactide, with the used of methanol and tin chloride, with a temperature to 60°C. Further, it was determined and characterized for the method of infrared spectroscopy and diffraction of X–rays, where a place of the functional groups of PLA and the diffraction the characteristic peak of the crystallinity of PLA.

Key words: Polylactic acid, lactic acid, polymerization, fermentation, liquid–liquid extraction.

INTRODUCCIÓN

En la industria quesera el queso es elaborado por la acidificación de la leche, lo que produce la precipitación de proteínas conocidas como caseína, lo que se denomina cuajada. En este proceso se obtiene un subproducto denominado suero, el cual contiene otras proteínas como lactoalbumina, lactoferrina y lactoglobulina, adicionalmente tiene lactosa, grasa y minerales como calcio y hierro que se encuentran presente en la leche.

El suero es contaminante debido a su alta demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO), en la actualidad se han hecho estudios e investigaciones debido a sus múltiples compuestos y a su facilidad de transformación en otro producto útil, esto con el fin de obtener un mayor provecho a los beneficios que este puede brindar. La elaboración de ácido láctico actualmente se ha incrementado por sus múltiples usos en la industria cosmética, química, alimenticia como sales y ésteres.

En la industria alimenticia se usa como acidulante y conservante. Las industrias químicas lo utilizan como solubilizante y como agente controlador de pH. En la producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como disolvente biodegradable. En la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico (PLA), siendo un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y la medicina; debido a las regulaciones ambientales ha hecho que se desarrollen alternativas para materiales más compatibles con el medio ambiente e independientes de los combustibles fósiles, es por esto que los bioplásticos como el PLA se ajustan a satisfacer las necesidades en la industria.

En la presente investigación se desarrolló una alternativa de reutilización del suero para la síntesis de ácido poliláctico, con el uso de bacterias ácido lácticas como son *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*.

El suero utilizado es proporcionado por la empresa *Quesos del Vecchio*, el volumen de residuo generado en su producción es de 15.000 a 16.000 litros diarios. La empresa utilizan aproximadamente 100.000 litros para la producción de 10 ton/sem de queso ricota, la disposición final del suero debe ser realizada por empresas especializadas debido a su alto impacto ambiental, por lo tanto, la empresa invierte en su tratamiento ya que acarrea multas y sanciones.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Medio de cultivo. El suero utilizado fue proporcionado por la empresa quesos del Vecchio ubicada en la carrera 27#6–32 de Bogotá (Distrito Capital).

Microorganismos. Se trabajó con dos marcas de liofilizados, con los microorganismos de interés, liofilizado 1: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Bifidobacterium* (centro Agrolechero de Bogotá), liofilizado 2: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* y levadura sp (Interenzimas S.A.S de Bogotá).

Activación de microorganismos liofilizados: Para la activación de la cepa microbiana, se prepara tripticasa de soya caldo pesando 2,1 g y se adicionan a 70 mL de agua destilada, se lleva a una autoclave para esterilizar durante 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión, a la solución esterilizada (en una cabina de bioseguridad) se añaden 0,5 g de liofilizado; se lleva a incubación durante 24 horas a 30°C. Pasadas las 24 horas de activar los microorganismos en el tripticasa de soya caldo se toma una muestra para siembra por agotamiento en el medio de cultivo tripticasa soya agar, se lleva a incubación entre 24 a 48 horas a 30°C, se empieza a observar el crecimiento macroscópico microbiano con el fin de obtener la cepa pura de los microorganismos de interés provenientes de los dos liofilizados, eliminando a *Bifidobacterium* y levadura del inóculo.

Purificación de los microorganismos: El procedimiento de purificación se realiza, al tomar muestras con un asa de las colonias de la misma morfología más pura sembradas en las cápsulas de Petri con tripticasa de soya agar y se llevan a una nueva cápsula de Petri limpia con tripticasa soya agar, se incuba entre 24 a 48 horas, a 30°C, analizando la morfología de las colonias presentes hasta que sólo se pueda diferenciar macroscópicamente una morfología de cada una de las cepas.

Inóculo: Al obtenerse las cepas aisladas se toma con una asa los microorganismos de interés y se adicionan a un tubo de ensayo con 10 mL de suero desproteínizado estéril se lleva a incubación durante 24 horas a 30°C. Se realiza el inóculo con el liofilizado 1, puesto que no se observa crecimiento del liofilizado 2 en el suero, el inóculo se prepara el 10% del volumen total de la fermentación en un frasco de tapa azul de 250 mL, se realiza una mezcla de los dos tipos de suero adicionando 100 mL de suero desproteínizado y 100 mL de suero sin desproteínizar se esteriliza en una autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos, posteriormente se toma (en cabina de bioseguridad) un mililitro del tubo de ensayo incubado previamente con los microorganismos de interés y se adicionan a la solución de la mezcla de sueros se lleva a un agitador durante 24 horas a

150 rpm y 42°C. El inóculo es realizado con el fin de adaptar el microorganismos y tener una concentración inicial de microorganismos en la fermentación la cual se realiza antes de iniciar la fermentación tomando 1 mL y realizando una dilución del suero inoculado con microorganismos por el método de dilución y conteo en placa para encontrar la concentración inicial de microorganismos.

Fermentación. Se realiza la fermentación con dos tipos de suero: desproteínizado y sin desproteínizar. Al suero desproteínizado se eliminan las proteínas a partir de que estas se desnaturalizan a temperaturas mayores de 70°C, así que se lleva 1 litro de suero en un erlenmeyer de tapa azul en una autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos; luego se realiza una filtración con un embudo de porcelana, papel filtro y una bomba de vacío. Se debe esterilizar en la autoclave una vez filtrado el suero desproteínizado a 121°C y 15 lb de presión durante 15 min, luego se adiciona en 450 mL de suero desproteínizado en un frasco de tapa azul de 500 mL y se adiciona 50 mL de inóculo (se realiza una réplica de la experimentación).

El suero sin desproteínizar se pasteuriza y no se desnaturalizan las proteínas, se realiza un choque térmico al suero, se toma 1 litro de suero en un erlenmeyer de tapa azul y se hace pasar por un baño termostático a 65°C y luego se pasa a una cubeta con hielo a 4°C. Al igual que en el suero desproteínizado se adiciona en un frasco de 500 mL de tapa azul 450 mL de suero y 50 mL de inóculo (se realiza una réplica de la experimentación).

Los frascos son llevados a un *shecker* a 42°C y 150 rpm a pH de 5,5 durante 72 horas, cada 24 horas se toman muestras de un mililitro de cada frasco de tapa azul de 500 mL.

Se prepara en 7 tubos de tubos de ensayo de 10 mL, 9 mL de solución de agua peptona al 0,1%, se realizan el método de diluciones para conteo en placa de las muestras tomadas para sembrar en placas de *Petri*, Se adiciona en un primer tubo 1 mL de la muestra extraída del frasco de tapa azul de 500 mL que se encuentra fermentando, se agita en un *vortex* para homogenizar la muestra, se toma un mililitro del tubo homogenizado y se añade a un nuevo tubo de ensayo con solución de agua peptona se agita de nuevo en un *vortex* y se repite el procedimiento en los 5 tubos de ensayo restantes; se toma del último tubo donde se hizo la última dilución 50 µL con una micropipeta y se añade a una placa de *Petri* con agar de soja gelificado y se esparce por toda la caja se lleva a incubación a 30°C por 24 horas, pasadas las 24 horas se procede a realizarse el conteo de unidades formadoras de colonia. Se repite el procedimiento cada 24 horas con los dos tipos de suero, las diluciones realizadas son de hasta 10⁶. Este se realizó en la cabina de bioseguridad. La

fermentación se paró a las 96 horas. La Tabla 1 muestra el resultado de los conteos realizados durante la fermentación, la muestra inicial del primer conteo se realizó por el método de dilución para conteo en placa al inculo.

Tabla 1. Conteo de colonias durante la fermentación.

<i>Horas</i>	<i>UFC R1S</i>	<i>UFC R2S</i>	<i>UFC R1C</i>	<i>UFC R2C</i>
0	5	6	15	17
24	5	7	37	115
48	115	127	276	295
72	311	322	352	387
96	312	324	352	390

Además, durante la fermentación se realizaron la prueba de *Fehling* para azúcares reductores para determinar el consumo de lactosa en los dos tipos de suero y a las réplicas tomando de cada fermentador en un erlenmeyer de 100 mL, 30 mL de muestra y realizando las mediciones cada 24 horas en la Tabla 2, se pueden ver los mililitros gastados en cada titulación para los dos tipos de suero con sus respectivas réplicas.

Tabla 2 Mililitros de suero gastados en prueba de *Fehling* para azúcares reductores.

<i>Horas</i>	<i>mL R1S</i>	<i>mL R2S</i>	<i>mL R1C</i>	<i>mL R2C</i>
0	11	11	12,8	12,8
24	12,9	12,5	18,6	17
48	18	17,4	23	23,9
72	27,5	27,2	34,6	35,2
96	27,6	27,4	35	35,3

Al finaliza la fermentación se realiza la prueba de acidez titulable con el fin encontrar la cantidad de ácido láctico producido y poder encontrar el rendimiento. La

Tabla muestra los mililitros gastados de NaOH en la titulación.

Tabla 3. Valoración con NaOH al iniciar y finalizar la fermentación.

<i>R1S mL</i>	<i>R2S mL</i>	<i>R1C mL</i>	<i>R2C mL</i>
NaOH	NaOH	NaOH	NaOH
2,79	2,79	2,79	2,79
11,07	10,75	11,7	12,85

Separación: Terminada la fermentación se realiza la separación donde se tiene en cuenta el proceso de extracción líquido-líquido descrito por Cuellar [1].

Primero se realiza una centrifugación en tubos falcón de 50 mL para centrifuga, se añade a la misma cantidad el caldo de fermentación, y se centrifugan durante 20 minutos a 5.000 rpm, se realiza con los dos tipos de suero fermentado y con sus respectivas replicas, este procedimiento se vuelve a hacer para obtener una mejor remoción de los sólidos del caldo fermentativo.

Una vez terminada la centrifugación, el sobrenadante obtenido se pasa por dos filtraciones, la primera por medio de un papel filtro *Whatman* 42 con la ayuda de un embudo de porcelana y un erlenmeyer de 500 mL, con el líquido obtenido por la primera filtración se realiza después una micro filtración en membrana con poro de 0.45 micras al vacío.

El filtrado es llevado al rota evaporador y se realiza la concentración de ácido láctico, se adicionan 150 mL de cada suero filtrado y las réplicas, esta concentración se debe hacer a presión reducida y no elevar a la temperatura de ebullición del agua porque a esta temperatura el ácido láctico presente cambios en su estructura como la producción de oligómeros esta concentración se hace a 40°C y 72 mbar de presión a una velocidad de rotación de 95 rpm.

Se procede a realizar la extracción del ácido láctico donde suero concentrado se adiciona en una relación 1:1 con el disolvente en una agitación constante durante 45 min, se adicionan en un embudo de decantación la mezcla y se espera a que se evidencien las dos fases. En frascos con tapa azul se separan las dos fases obtenidas la más clara y transparente es llevada al rota evaporador a presión atmosférica y a una temperatura de 40°C para evaporar el éter dietílico así como para concentrar y purificar el ácido láctico.

Polimerización: El ácido poliláctico es obtenido mediante una polimerización del ácido láctico por el método de apertura abierta del anillo (ROP), dónde se realiza una esterificación para

producir un diéster del ácido láctico en el cual el ácido láctico obtenido se debe esterificar a partir de una reacción con ácido sulfúrico a 60% v/v de pureza, se toman en un balón de 250 mL se adicionan 100 mL de ácido láctico y 5 mL de ácido sulfúrico y en una plancha de calentamiento con agitación magnética se lleva a cabo la reacción primero a 80°C durante 35 min, posteriormente a 120°C durante 2 horas y se adicionan 5 mL más de ácido sulfúrico y se espera alrededor de 7 horas a 8 horas y se agregan 5 mL más de ácido sulfúrico y pasadas alrededor de 9 horas se obtiene el diéster de ácido láctico llamado lactida.

Una vez obtenida la lactida se lleva a cabo la reacción de polimerización por apertura abierta del anillo (ROP) la cual consiste en una reacción catalítica donde se adicionan 5,01 g de lactida obtenida, se añaden 50 mL de metanol y 3 g de cloruro de estaño II, esta reacción ocurre transcurridas 2 horas a 60°C.

El proceso para secar el polímero consta de evaporar y retirar el metanol a 70 °C, adicionar acetona y filtrar con ayuda de una bomba de vacío y un papel filtro Watman 42. Luego el polvo que esta sobre el filtro es llevado a un desecador para terminar de secar completamente el polímero.

CARACTERIZACIONES

Acidez titulable. La prueba según la norma técnica colombiana NTC 4978 [2] consiste en realizar el método de acidez titulable para leches y productos lácteos utilizando NaOH al 0,1 N, se toman 10 mL de muestra en un erlenmeyer de 100 mL y se adicionan 3 gotas de fenolftaleína; en una bureta de 25 mL se adicionan 25 mL de NaOH al 0,1 N y se adicionan gota a gota hasta que aparezca un tono rosado en la muestra y se registra el volumen gastado en la titulación.

Densidad. De acuerdo a la norma AOAC 33.2.03 (925.22) que se especifica en la NTC 506 [3] al cual se realiza para leche pasteurizada, se determina la densidad con el uso de un picnómetro de 25 mL pesado previamente, se adiciona la muestra de suero lácteo en el picnómetro de 25 mL y se pesa en una balanza analítica.

pH. La determinación del pH se realiza con un pH-metro o un papel indicador que mide el potencial de hidrogeno en una solución.

Método de Biuret para cuantificación de proteínas: El método de *Biuret* se realiza la prueba por medio de la norma AOAC 1999 [4] la cual se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. El Cu^{2+} se acompleja con NH_4^+ . La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de

proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en suero).

El método de *Biuret* consta en hacer pasar la muestra de proteína con el reactivo del mismo nombre el cual es sulfato cúprico con tartrato de sodio y potasio y NaOH en un espectrofotómetro realizando una curva de calibración, en la cual se utiliza albumina para poder medir la muestra problema que en este caso es suero lácteo y el método utiliza la ecuación de *Lambert-Beer*, que relaciona la concentración con respecto a la absorbancia de la luz y se mide a una longitud de onda de 540 nm.

Para esto se preparan los reactivos en balones aforados de 100 y 250 mL y se prepara una solución patrón de albumina de 10 mg/mL y en 6 tubos de ensayo adicionar: (1 mL de agua: (0,2 mL de SLN y 0,8 mL de agua); (0,4 mL de SLN y 0,6 mL de agua); (0,6 mL de SLN y 0,4 mL de agua); (0,8 mL de SLN y 0,2 mL de agua) y (1 mL de SLN) respectivamente. El suero se toma 5 mL de muestra y se hace pasar por una centrifuga a 5.000 rpm durante 20 minutos y se guarda el sobrenadante, se toma en un tubo de ensayo 0,5 mL de muestra de sobrenadante y se adiciona 0,5 mL de agua y en cada tubo de ensayo se adiciona 4 mL del reactivo de *Biuret*.

Prueba de Fehling para azúcares reductores: Mediante la NTC 1779 [5] se realiza el método el cual consta del reactivo del mismo nombre en donde se utilizan dos diluciones de *Fehling A* y *Fehling B*, las cuales producen el ion Cu^{2+} debido al complejo de iones tartrato en medio básico (OH^-) de color azul-verdoso a Cu^+ que precipita en forma de Cu_2O rojo ladrillo.

Manifestando la presencia de azúcares reductores (aldosas: glucosas, ribosa, eritrosa, etc.), ya que realiza un reacción redox en el grupo aldehído del azúcar es oxidado a grupo ácido por el Cu^{2+} que se reduce a Cu^+ .

Este método utiliza dos diluciones, una que es *Fehling A* en donde se adiciona $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y se disuelve con agua destilada en un balón aforado de 100 mL; *Fehling B* donde se prepara al 15% sal de *Rochelle* (tartrato de sodio y potasio) en solución acuosa al 5% de NaOH. Se toma 10 mL de suero y es aforado en un balón de 100 mL y se realiza una solución de glucosa el 0.5 % como patrón en un balón aforado. Se toman 5 mL de las soluciones de *Fehling A* y *B* en erlenmeyers de 100 mL y se añade 20 mL de agua destilada con 2 ó 3 gotas de azul de metileno. En una bureta de 50 mL se va adicionando la solución patrón de glucosa mientras la solución de *Fehling* está en calentamiento y observar igualmente se realizó para el suero y se observó la coloración.

El método es utilizado para caracterizar el suero y encontrar la cantidad de lactosa presente que se va a fermentar, además es utilizado durante la fermentación para encontrar la cantidad de sustrato consumido.

Método de diluciones y conteo en placa. El método de diluciones consta de adicionar a tubos de ensayo con 9 mL de solución de agua peptona al 0,1%; se adiciona a un primer tubo de ensayo 1 mL de caldo fermentativo durante las horas de fermentación, luego realizando una dilución en serie tomando 1 mL del tubo anterior y adicionándolo a uno siguiente se procede a sembrar en placas de *Petri* lo que facilita el conteo en placa encontrando el número de colonias por el factor de dilución dando UFC/mL en la Figura 1 se ilustra el procedimiento.

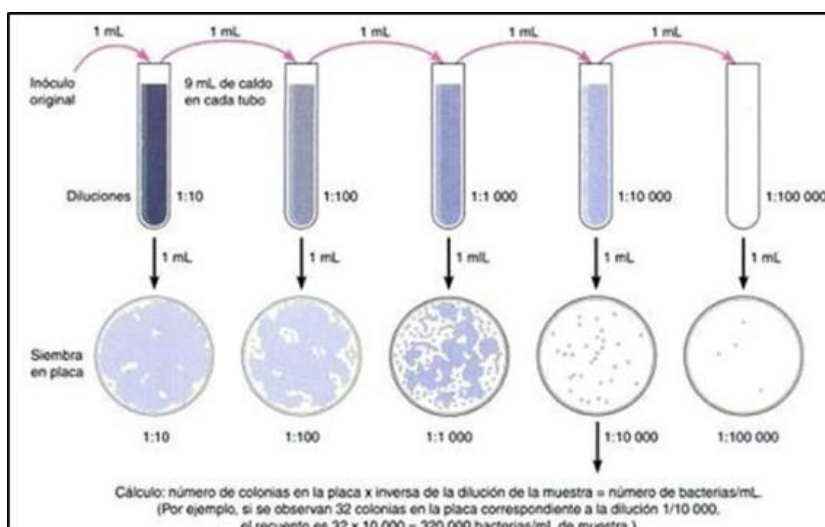


Figura 1. Procedimiento del método de diluciones para el conteo en placa.
Fuente: Lección 18. Medidas directas del crecimiento microbiano, Universidad Nacional a distancia (UNAD), extraído de: <<http://goo.gl/XT6pWh>>

Espectroscopia infrarroja: Este método utiliza el espectro electromagnético de la parte infrarroja, donde la rotación y vibración de las moléculas tienen niveles energéticos que al ser sometidas las muestras por haces de luz infrarrojos estos excitan a los electrones de las moléculas o de los enlaces de las moléculas, si la frecuencia irradiada es igual a una de las frecuencias incluidas en las ondas componentes del rayo, hay absorción de los haces de luz. Lo que permite determinar la cantidad de energía absorbida en diferentes longitudes de onda. Cuando se escanea el espectro con un rayo monocromático, este cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, se utiliza una transformada de *Fourier* para medir todas las longitudes de onda a la vez y así encontrar un espectro

de transmitancia o absorbancia, el cual muestra a cuales longitudes de onda la muestra absorbe el IR, y permite una interpretación de qué enlaces están presentes.

Este método sólo funciona con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica.

Para determinar el polímero con el método se pasa una muestra del ácido poliláctico, la cual debe estar molida en una suspensión de nujol en un mortero con unas gotas de sal de bromuro de potasio (KBr) y se realiza la medición en la muestra al irradiarse con el rayo infrarrojo y demostrar los enlaces presentes y los grupos funcionales que tiene dicha molécula.

Difracción de rayos X: Es una técnica experimental para el análisis de materiales, en donde los rayos X son difractados por los electrones que rodean los átomos por ser su longitud de onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico. Al incidir el haz de rayos X, este contiene información sobre la posición y tipo de átomos encontrados en su camino. Los cristales, gracias a su estructura periódica, dispersan elásticamente los haces de rayos X en ciertas direcciones y los amplifican por interferencia constructiva, originando un patrón de difracción. Mediante detectores especiales se puede observar y medir la intensidad y posición de los rayos X difractados, y su análisis posterior por medios matemáticos permite obtener una representación a escala atómica de los átomos y moléculas del material estudiado.

Esta prueba se realiza en un difractómetro *MagixPro PW-2440 Philips*, la muestra es puesta sobre una celda de vidrio (amorfo) y permite que el haz de rayos X incida sobre la muestra. Puesto que el PLA se ha venido estudiado su cristalinidad por su periodicidad en el monómero, la difracción de rayos X permite demostrar la presencia de este.

RESULTADOS

Fermentación y crecimiento microbiano: En la fermentación se realizó el método de diluciones para conteo en placa con el fin de observar el crecimiento microbiano de la simbiosis propuesta entre los microorganismos *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*. Se realizó la comparación del comportamiento del crecimiento en dos sustratos que son suero desproteínizado y suero sin desproteínizar en la Tabla 3 se muestra los resultados obtenidos en el conteo en placa por los factores de dilución cada 24 horas. El número inicial de colonias es tomado de la siembra del inóculo y se realizó hasta una dilución de 10^4 e igualmente se realizó para la siembra de 24 horas, se realizaron diluciones de 10^5 en la siembra de 48 horas y posteriormente a

las de 72 y 96 horas, se realizaron diluciones de 10^6 para poder realizar el conteo, véase Tabla 5, esto puede darse puesto que las dos bacterias se tardan en adaptarse al medio. En la Figura 1 se puede observar la tendencia en las dos curvas donde es similar pero una es de mayor crecimiento que la otra, para este caso la fermentación realizada del suero sin desproteínizar tiene un mayor crecimiento en biomasa con respecto al desproteínizado esto puede estar influenciado a la presencia de proteínas del suero, las cuales brindan una fuente de nitrógeno necesario como nutriente para el crecimiento microbiano. En esta misma grafica evidencia un periodo de latencia en el crecimiento microbiano durante la fermentación.

Tabla 3. Conteo microbiano.

	<i>Suero Desproteínizado</i>		<i>Suero sin Desproteínizar</i>	
Horas	UFC/mL R1	UFC/mL R2	UFC/mL R1	UFC/mL R2
0	2.500	3.000	7.500	8.500
24	10.000	10.500	18.500	245.000
48	575.000	635.000	1.380.000	1.475.000
72	15.550.000	1.610.0000	17.600.000	19.350.000
96	15.600.000	16.200.000	17.600.000	19.500.000

Tabla 5. Promedio de conteos microbianos.

	<i>SUERO SIN PROTEINAS</i>	<i>SUERO CON PROTEINAS</i>
Horas	UFC/mL	UFC/mL
0	2.750	8.000
24	10.250	131.750
48	605.000	1.427.500
72	15.825.000	18.475.000
96	15.900.000	18.550.000

En la Figura 1 se puede observar la tendencia en las dos curvas donde es similar pero una es de mayor crecimiento que la otra, para este caso la fermentación realizada del suero sin desproteínizar tiene un mayor crecimiento en biomasa con respecto al desproteínizado esto puede estar influenciado a la presencia de proteínas del suero, las cuales brindan una fuente de nitrógeno necesario como nutriente para el crecimiento microbiano.

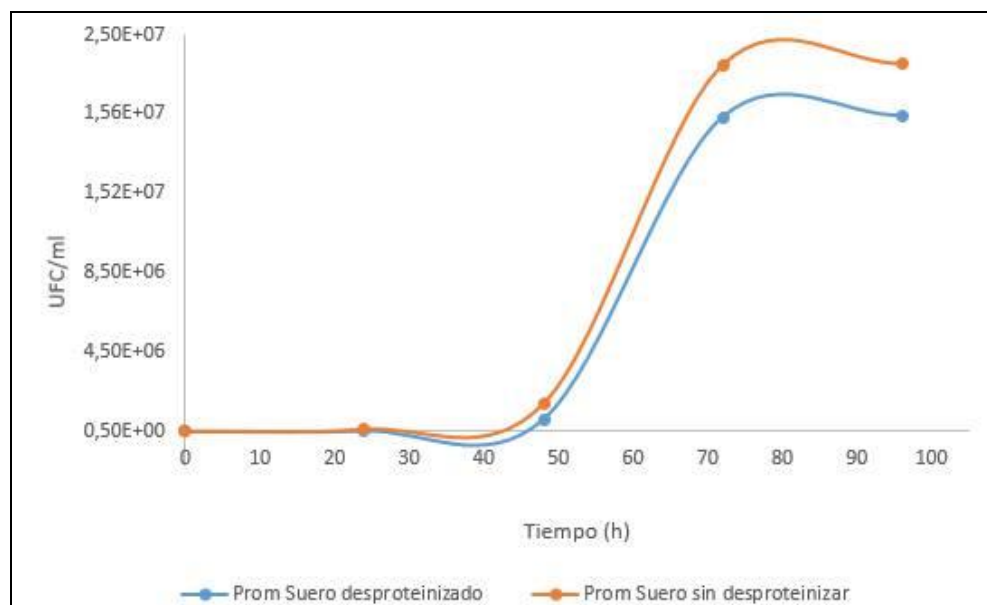


Figura 1. Promedio del crecimiento microbiano del suero sin desproteínizar y del suero desproteínizado

La producción de ácido láctico al finalizar la fermentación fue de 11,05 y 9,81 g/L como se puede observar en la Tabla 6 para los diferentes tipos de suero.

Tabla 6. Producción promedio de ácido láctico de los dos tipos de suero.

<i>Horas</i>	<i>Prom RS g/L</i>	<i>Prom RC g/L</i>
0	2.511	2.511
24	4.6125	4.9725
48	6.9975	7.83
72	8.19	9.0225
96	9.81	11.0475

Se realizan cálculos para el crecimiento microbiano con un ajuste lineal utilizando logaritmo natural para encontrar la velocidad específica de crecimiento estas fueron para el suero desproteínizado $0,0757 \text{ h}^{-1}$ y para el suero sin desproteínizar de $0,088 \text{ h}^{-1}$ donde se puede apreciar que la velocidad específica según la ley de velocidad son similares para ambos tipos de sustrato siendo ligeramente mayor la del suero sin desproteínizar. Se procede a realizar los cálculos de los parámetros cinéticos que permiten predecir el comportamiento de la producción de ácido láctico de los microorganismos trabajados. En el presente trabajo se reporta un rendimiento para lactosuero desproteínizado del 22,12% y para el suero sin desproteínizar arroja un rendimiento del 24,78%, también se evidencia un consumo de azúcar del 93% para ambos tipos de sustrato.

Como se mencionó anteriormente se encontró un ajuste con la ecuación de *Hanes* donde esta presenta la velocidad en cada tiempo y el sustrato consumido (la velocidad para cada tiempo se determina multiplicando la cantidad de microorganismos y las velocidades específicas encontradas de la ley de velocidad), se encuentran un valor de R^2 de 0,9181 para suero desproteínizado y un R^2 de 0,8961 para suero sin desproteínizar como se pueden apreciar en la Figura 3, donde se puede determinar que el ajuste de *Hanes* fue el más adecuado para los datos iniciales del crecimiento microbiano y consumo de sustrato.

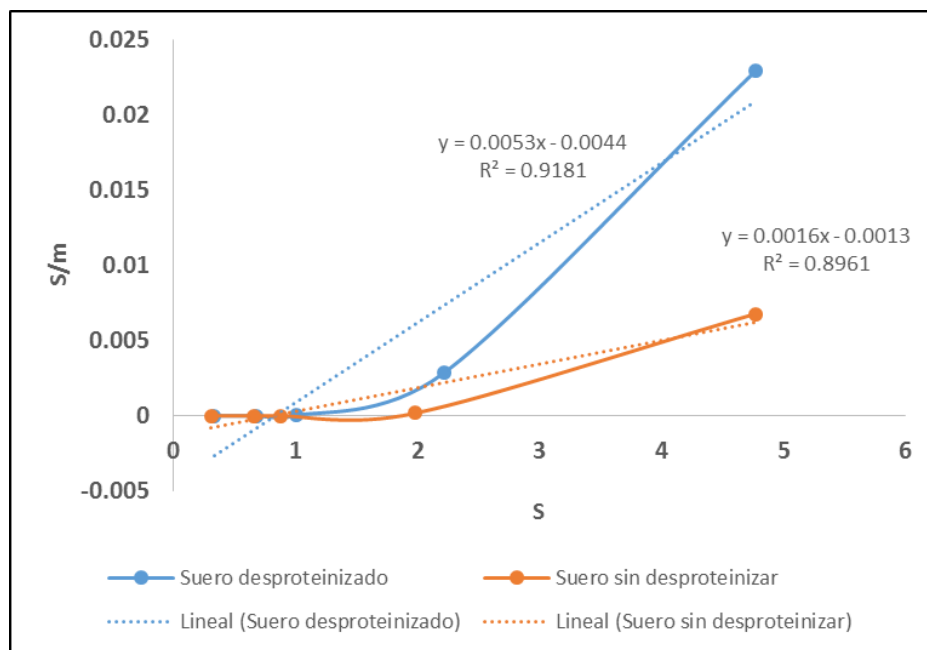


Figura 32. Ajuste lineal método *Hanes*.

Se presenta a continuación los parámetros encontrados con el ajuste del método de Hanes, véase Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros calculados.

<i>Parámetros cinéticos</i>	<i>RS</i>	<i>RC</i>
$\mu_{\max} \text{ h}^{-1}$	188.679	625
km	0,8301	0.8125

Separación. Luego de realizar el proceso descrito de separación en el embudo de decantación para el suero con proteínas se observa una emulsión en medio de las dos fases de interés, esto puede ser formado por las proteínas no reaccionantes, el agua y el éter dietílico, como no había forma de determinar que posee esa fase debido a la falta de equipos para analizar se procedió a retirar al momento de determinar la cantidad de volúmenes. La Tabla 8 muestra a continuación los volúmenes al iniciar y finalizar la extracción líquido–líquido según balance de materia calculado.

Tabla 8. Volumen de los compuestos en la extracción al: iniciar y finalizar.

<i>Tipo de suero</i>	<i>Suero fermentado</i>	<i>Éter dietílico</i>	<i>Éter y ácido</i>	<i>materia orgánica</i>
RS (mL)	250	250	220	150
RC (mL)	250	250	220	250

Las pérdidas de materia en el suero con proteínas son de 130 mL donde pueden estar en la emulsión ya mencionada y debido a que el éter dietílico a condiciones normales de temperatura y presión se volatiliza. La concentración de ácido láctico después de finalizar la extracción es de 8,74 g/L, luego se elimina el disolvente por medio del rota evaporador, obteniendo un volumen de ácido láctico de 10 mL, de esta cantidad de volumen se tomó 1 mL para realizar la prueba de espectroscopia infrarroja.

Mientras que las pérdidas en el suero sin proteínas son de 30 mL donde puede ser por volatilidad del disolvente, la concentración en este tipo de suero de ácido láctico fue de 7,75 g/L, después de retirar el disolvente se obtuvo un volumen de ácido láctico de 11 mL, donde 1 mL se utiliza para realizar la prueba de espectroscopia infrarroja.

Una vez obtenidos los valores de concentración para ambos tipos de suero después de la extracción se proceden a realizar los porcentajes de recuperación los cuales son: para el suero sin desproteinizar del 79,1% y para el suero desproteinizado del 78,9%.

Realizando un balance de masa como se muestra en la Figura 4 y utilizando las densidades de cada una de las sustancias presentes se encuentran las composiciones y fracciones másicas de cada corriente como se puede ver en la Tabla 9.

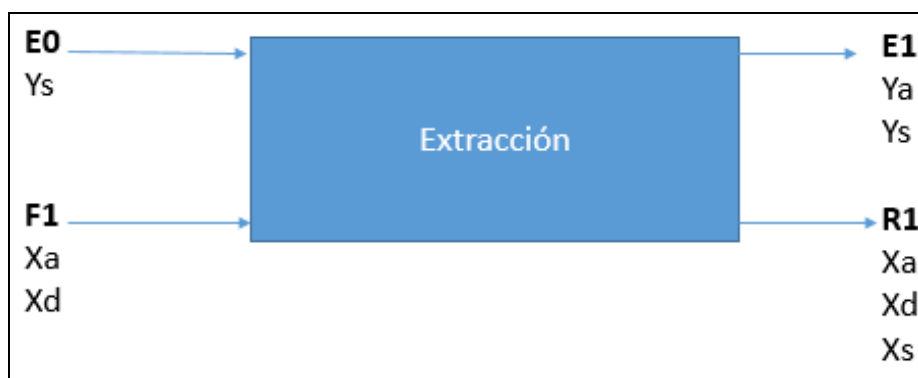


Figura 4. Balance de materia.

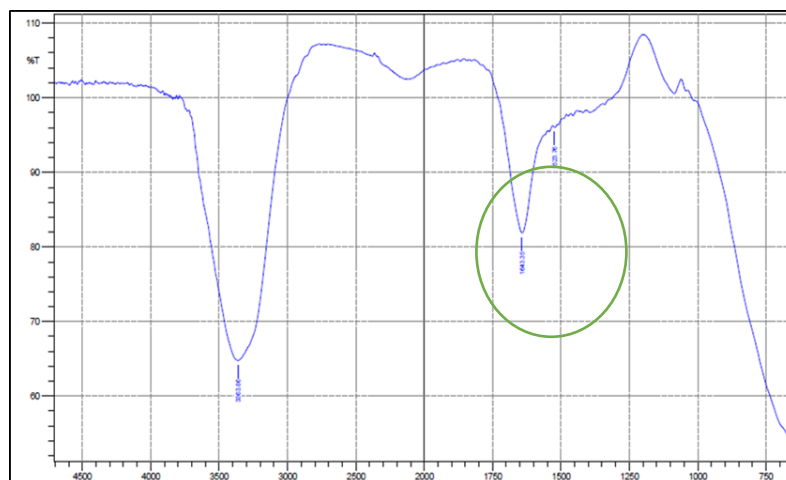
Tabla 9. Balances de masa para los dos tipos de sustrato.

<i>Corriente</i>	<i>Suero sin proteínas</i>	<i>Suero con proteínas</i>
F1 g	256,1375	256,1375
Xa	0,03829974	0,03829974
Xd	0,96170026	0,96170026
E0 g	178,5	178,5
Ya	0	0
Ys	1	1
E1 g	211,2	144
Ya	0,03669034	0,0538125
Ys	0,96330966	0,9461875
R1 g	223,4375	290,6375
Xa	0,03468084	0,02666208

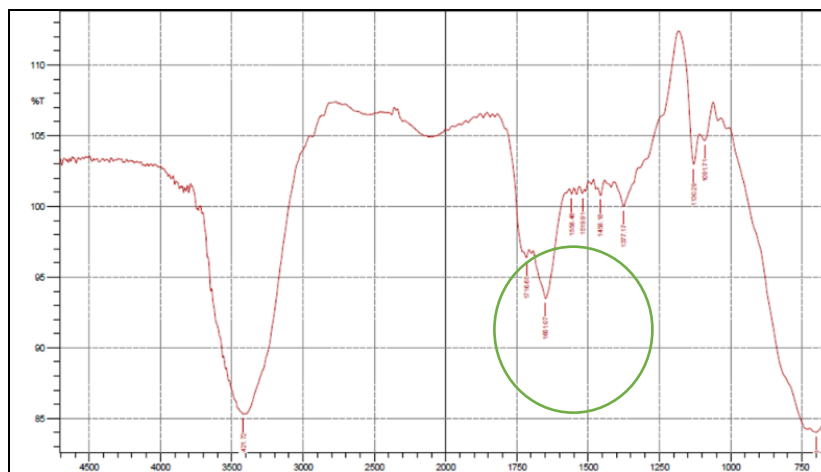
Xd	0,95927916	0,96729792
Xs	0,00604	0,00604

Para determinar la existencia de ácido láctico se realizó la prueba de espectroscopia infrarroja (FTIR), donde se determinan los grupos funcionales de la muestra, pero antes de esto se hizo pasar una muestra de ácido láctico comercial de grado analítico para tener un punto de comparación.

A una resolución de 1/cm se muestran los espectros obtenidos, estos se muestran a continuación en los espectros 1 y 2 los resultados obtenidos junto con la lectura de los grupos funcionales en la Tabla 10.



Espectro 1. Ácido láctico suero sin proteínas.

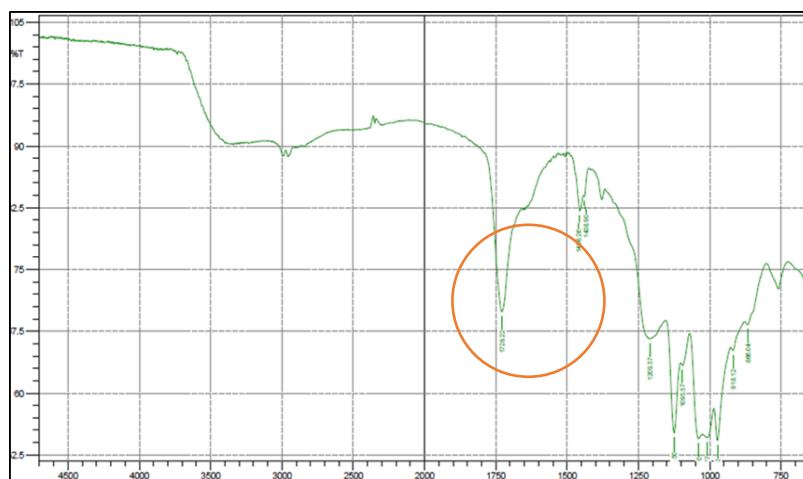


Espectro 2. Ácido láctico suero con proteínas.

El primer espectrograma está relacionado con el resultado de la fermentación sin proteínas y el segundo se refiere al resultado de la fermentación con proteínas. Donde el espectro de ácido láctico producido por el suero con proteínas tiene similitudes con el ácido láctico comercial, aunque se evidencian más picos esto puede ser debido a la presencia de trazas de éter en la muestra. La muestra proveniente del suero desproteinizado evidencia menores bandas así como estos dos espectros tienen similitud con el ácido láctico comercial, dejando claro la presencia de ácido láctico después de la etapa de fermentación y extracción ya descritas.

Tabla 10. Lectura de los grupos funcionales en función de la longitud de onda, λ .

Grupo	Longitud de onda 1/cm
O – H (ácido)	4.500 – 2.500
C – H	3.000 – 2.500
C = O (grupo carboxilo)	1.800 – 1.650
C – C; C – O	1.500 – 650

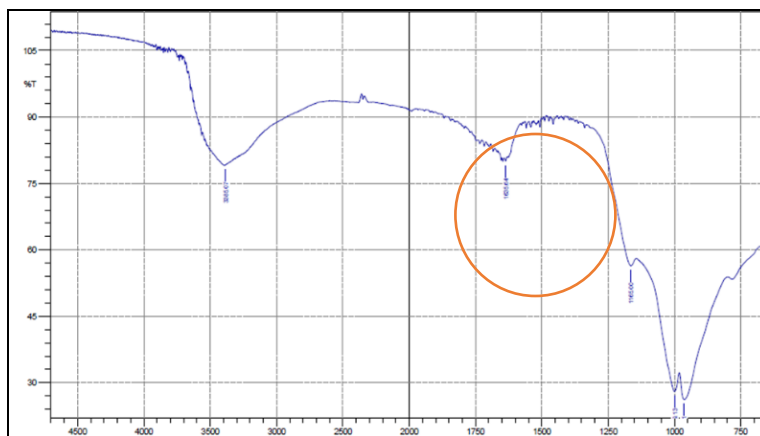


Espectro 3. PLA de ácido láctico comercial.

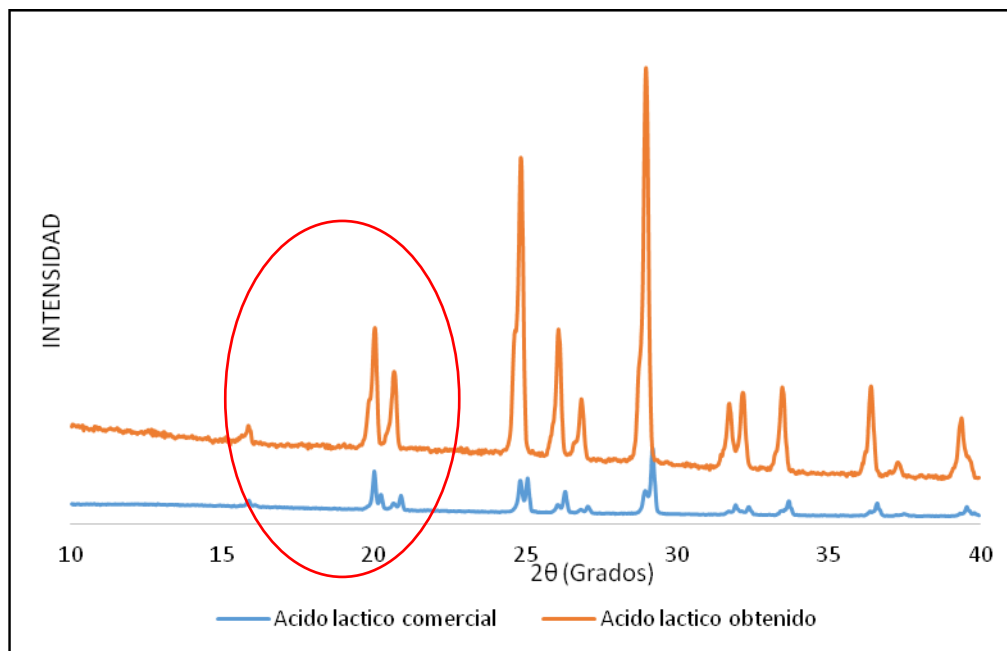
Polimerización: Una vez caracterizado el ácido láctico purificado se decidió mezclar el obtenido por el suero con proteínas y con el suero sin proteínas para así tener una cantidad mayor de ácido láctico y lograr la obtención del polímero, en el proceso de obtención de lactida fue más acelerada la reacción a comparación de la obtenida con ácido láctico comercial, como también es de

un color ámbar más oscuro, así como un fluido menos espeso que el anteriormente obtenido pero en características generales se puede afirmar que se produjo lactida.

Una vez obtenida la lactida se realizó la polimerización de este compuesto observando el precipitado blanco característico, al terminar la reacción se realizan procedimientos para obtener el polímero seco. Una vez obtenido se realiza el ensayo de espectroscopia infrarroja (FTIR), con el fin de determinar la presencia de los grupos funcionales del polímero, también se pasó por el espectrofotómetro un ácido poliláctico producido por este mismo método pero con un ácido láctico comercial al 85%. Se presentan los Espectro 3. y Espectro 4. del PLA producido por el ácido comercial y el ácido láctico producido y purificado (véase Tabla 10).



Espectro 4. PLA de ácido láctico producido y purificado.



Diffractograma 1. PLA producido de ácido láctico comercial y obtenido y purificado.

Se realizó un ensayo de difracción de rayos X que permite observar la cristalinidad del polímero obtenido tanto para el ácido láctico comercial como el producido y purificado (véase Diffractograma 1).

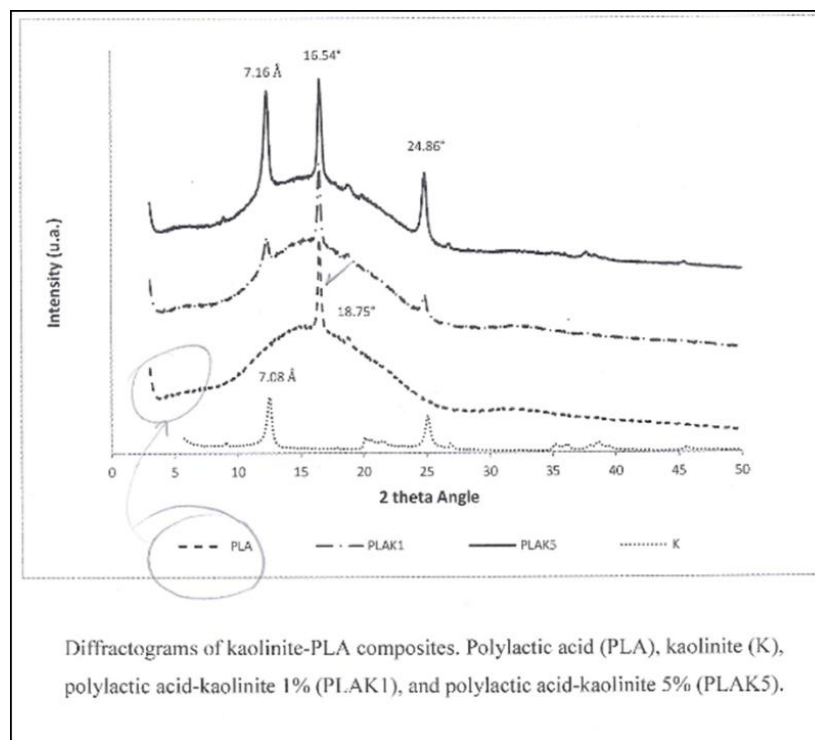
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante los resultados obtenidos en el conteo microbiano de la fermentación se comparan con la concentración bacteriana reportada por *Peralta et al.* [6] la cual es de 7.750.000 UFC/mL este valor fue obtenido a las 48 horas y realizado por el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii*, a comparación con lo obtenido en el presente proyecto se puede observar que el valor a ese tiempo es menor realizando un promedio de los dos tipos de sustrato, puesto que están los microorganismos trabajando en asociación.

También se realiza una comparación con un proceso similar pero en un suero desproteinizado y suplementado reportado por *Jackymec et al.* [7] donde obtuvieron 36,7 g/L de ácido láctico después de la fermentación, esto quiere decir que se obtiene una mayor concentración de producto al realizar la fermentación con suero desproteinizado y suplementado, también el hecho de eliminar las proteínas al comenzar la fermentación evita que al finalizar el proceso hallan dificultades en la eliminación de proteínas no reaccionantes como sucedió en este caso que no se eliminaron sino hasta la fase de extracción, la cual es recomendable hacerla con un medio lo más

clarificado posible para tener menos sustancias involucradas en esta fase y sólo tener a grosso modo agua y ácido láctico. El rendimiento calculado es comparado con el reportado por *Rojas et al.* [8] donde realizan una relación de gramos de producto con respecto a gramos de sustrato consumido el cual fue del 10%, mientras que en el presente trabajo se reporta un rendimiento para lactosuero desproteinizado del 22,12% y para el suero sin desproteinizar arroja un rendimiento del 24,78%, también se evidencia un consumo de azúcar del 93% para ambos tipos de sustrato.

La separación se realiza una comparación con el porcentaje obtenido por *Cuellar* [1] donde arroja un valor del 79,18% para éter dietílico. En el presente trabajo los valores de concentración para ambos tipos de suero después de la extracción se proceden a realizar los porcentajes de recuperación los cuales son: para el suero sin desproteinizar del 79,1% y para el suero desproteinizado del 78,9%, estos fueron valores cercanos y tienen una remoción significativa de ácido láctico de la fase orgánica. Ya que se quería observar la presencia del ácido láctico después de la separación en el espectrograma, estos se comparan con el espectro obtenido por *López et al.* [9] donde el ácido láctico manejado es de características similares en el espectro infrarrojo, en el cual las características en los grupos funcionales están presentes y son similares.



Difractograma 2. PLA con aditivos y puro. Fuente: *J. Cortes et al.*, 2016.

Además, como se mencionó anteriormente, se realiza otro espectrograma donde el espectro obtenido del polímero proveniente del ácido láctico comercial es de características similares en los picos de los grupos funcionales a lo reportado por *López et al.* [9] así como el polímero obtenido por el ácido láctico producido y purificado presenta los mismos picos en las bandas un poco reducidos pero se pueden considerar la presencia de estos grupos funcionales. Y con el fin de demostrar la obtención del PLA se realizan los difractogramas donde el difractograma del PLA producido por el ácido láctico comercial presenta un pico en el ángulo de cristalinidad característico, el cual está entre 15 y 20°, estos son comparados con lo reportado por *Pagés et al.* [10] se presentan más picos debido a la pureza del polímero puesto que difícilmente se logró secar y pueden existir residuos de metanol, cloruro de estaño o lactida que aún no ha reaccionado totalmente. En el estudio realizado por *Cortes* [11] donde se puede apreciar un pico representativo en 18,54°, el cual se presenta en el difractograma 3.

Del mismo modo se evidencia el pico representativo pero en una menor proporción para el polímero de ácido láctico producido y purificado, esto puede ser por la pureza de ácido láctico que se obtuvo. Además se observan otros picos en ambos difractogramas de los polímeros obtenidos, asociados a impurezas como lactida que no reacciona y no se logra retirar.

CONCLUSIONES

- Se reafirman los parámetros tomados de la vigilancia tecnológica que rigen la fermentación de lactosuero para la producción de ácido láctico por vía fermentativa utilizando los microorganismos propuestos, los cuales son: T = 42°C; pH: 5,5 y 150 rpm.
- El rendimiento obtenido de la fermentación arrojó un valor del 22 y del 24% donde el mayor valor hace referencia al suero con proteínas, siendo valores no significativos con relación al tipo de sustrato.
- El grado de purificación obtenido después de la extracción líquido-líquido usando éter dietílico fue de 78,9 y 79,1% siendo el mayor el suero con proteínas, donde la diferencia en los porcentajes de recuperación es despreciable.
- De acuerdo a los difractogramas y espectrogramas se determina la presencia del polímero ya que contiene el pico representativo de la cristalinidad y contiene los grupos funcionales correspondientes respectivamente, demostrando la obtención del ácido poliláctico.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cuellar JC "Evaluación de la separación de ácido láctico a partir de residuos de piña y bacterias ácido lácticas". Trabajo de grado. Bogotá D.C. Colombia. Fundación Universidad de América, 2014
- [2] Norma técnica colombiana NTC 4978. *Determinación de la acidez titulable – método de referencia. Leche y productos lácteos*. Bogotá D.C. Colombia. <https://tienda.icontec.org/producto/impreso-ntc-4978-leche-y-productos-lacteos-determinacion-de-la-acidez-titulable-metodo-de-referencia/?v=b05e2f2> (2001)
- [3] Norma técnica colombiana NTC 506. *Productos Lacteos. Leches Pasteurizadas*. Bogotá D.C. Colombia. Instituto Icontec. (2002)
- [4] Norma AOAC 1999. *Official Methods of Analysis. Biuret Method*. Maryland (USA): The association of analytical communities. (1999).
- [5] Norma técnica colombiana NTC 1779, *Método para determinación de azúcares totales expresados como reductores* Bogotá D.C. Colombia. Instituto Icontec (1997)
- [6] Peralta Barba MS, Palma Barrionuevo KC. *Estudio preliminar de la fermentación de suero lácteo empleando microorganismo Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Trabajo de grado. Guayaquil. Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral. (2014)
- [7] Jackymec M, Mora H, Paez G, Ferrer RJ, Mármol Z, Ramones E "Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato", Vol. 11. Revista científica *Revicyluz Serbiluz*. Maracaibo. Venezuela, 2001
- [8] Rojas MA, Montaña PL, BASTIDAS JM "Producción de ácido láctico a partir de lactosuero utilizando Lactobacillus del brueckii subsp. Bulgaricus y Streptococcus thermophilus", *Revista científica Scielo*, **44**, (2015)
- [9] López DA, Flores AV, Zubiaga JC, Garcia MA, Lopez MA, Carrillo RF "Estudio y Síntesis En La Producción De PLA (Ácido Poliláctico)". Trabajo de grado. Monterrey. México. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada del instituto Politécnico Nacional. Universidad del Noreste. (2007)
- [10] Pagés PC, Gómez-Perez J, Santana O, MasPOCH M "Procesado del ácido poliláctico (PLA) y de nano compuestos PLA/montmorillonita en planta piloto: Estudio de sus cambios estructurales y de su estabilidad térmica", *Afinidad*, **67**. No. 546 (2010)
- [11] Cortes J "Evaluación de adición de aditivos para permeado de empaques de PLA". Tesis de Maestría En estudio. Bogotá D.C. Colombia. (2016)