



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y TECNOLÓGICAS

*TITULO DE LA TESIS: Obtención de ácido láctico por fermentación de
escobajo de uva*

**Tesis presentada para optar al Título
de: Licenciada en Tecnología de los Alimentos**

Mariana Soledad Albarracín Peláez

SAN JUAN, ARGENTINA, 17 de Marzo de 2023.

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciada en Tecnología de los
Alimentos**

**TÍTULO: OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR FERMENTACIÓN DE
ESCOBAJO DE UVA**

PRESENTADA POR: MARIANA SOLEDAD ALBARRACIN PELAEZ

COMITÉ DE TESIS

TRIBUNAL CALIFICADOR

El tribunal de tesis, conformado por:

Mg. Susana Mattar.
Lic. Daniela Ramírez.
Lic. Natalia Páez.

ACUERDAN OTORGARLE LA CALIFICACIÓN DE:

San Juan, Argentina, 17 de Marzo de 2023

Agradecimientos:

La elaboración de una Tesis es una carrera llena de obstáculos y ésta no ha sido la excepción, pero he salido victoriosa gracias al apoyo constante, las experiencias, y consejos de personas que directa o indirectamente provocaron un buen desarrollo personal y profesional en mí.

Agradezco a quienes me dieron su apoyo en la realización de la presente Tesis:

Mi directora Dra. María Carla Groff. y Codirectora Dra. Ing. Sandra. E. Noriega. Excelentes profesionales y personas, que me ayudaron, confiaron en mí y acompañaron en este largo camino e hicieron posible que pueda finalizar mi Tesis.

Agradezco al personal del Laboratorio de Control de Calidad Dr. Alberto Graffigna de la Universidad Católica de Cuyo, por su colaboración, ya que me permitieron el desarrollo de diferentes técnicas de laboratorio.

A mis padres, mis principales pilares porque sin ellos nada hubiese sido posible, por su amor, apoyo y por sobre todo su comprensión y paciencia.

A mi hermana Carla por su gran ayuda y por ser tan especial e incondicional.

A todas las personas que me estiman, y que hasta sienten suyo este logro. Por lo mucho que los aprecio, les brindo mi más sincero agradecimiento.

“A todos muchas gracias”

Resumen

El objetivo general de la presente tesis fue la obtención de ácido láctico a partir de una fermentación fúngica que utiliza como sustrato sólido el escobajo de uva. Se llevó a cabo la fermentación en estado sólido con el hongo *Rhizopus Oryzae* NCIM 1299, el cual posee un potente pool enzimático para hidrolizar la estructura lignocelulósica del escobajo. Es de suma importancia saber que la provincia de San Juan forma parte de un grupo de provincias cuya actividad económica principal es la industria vitivinícola, la cual produce gran volumen de subproductos leñosos, como escobajos y restos de poda, que constituyen importantes fuentes de bajo costo de una amplia gama de compuestos con varias aplicaciones. La elevada cantidad de residuo sólido que se obtiene, contiene alto contenido de materia lignocelulósica, formada por componentes monoméricos que pueden ser usados como sustratos de fermentación fúngica. El ácido láctico puede obtenerse por vía biotecnológica a partir de derivados de recursos renovables como azúcar, melaza, lactosuero, materiales amiláceos y lignocelulósicos, almidones, yuca, licor de maíz. Muchas investigaciones estudiaron los distintos factores que controlan la fermentación para producir ácido láctico, desde los microorganismos usados, como las bacterias ácido lácticas, rendimiento del proceso, sistemas batch, fedbatch y continuo, necesidades nutricionales y suplementos. En esta Tesis se caracterizó físico químicamente escobajo de uva de variedades tintas y blancas. Además se sometió el escobajo de uva a diferentes pretratamientos: soluciones con ácido clorhídrico (1 y 5% v/v) y soluciones con agua oxigenada (5 y 15% v/v), y se cuantificó el rendimiento en glucosa a partir de hidrólisis ácida y con agua oxigenada. Se obtuvo mayor rendimiento de glucosa con la hidrólisis ácida. Finalmente se realizó una fermentación batch de escobajo de uva sin pretratamiento y se cuantificó ácido láctico a partir de la fermentación fúngica. Como conclusión, se demostró que el escobajo de uva puede utilizarse como sustrato de fermentación del *R. oryzae* NCIM 1299 para la obtención de ácido láctico. Además, los resultados obtenidos en este trabajo son de gran interés en el área de la biotecnología, ya que se comprueba la obtención fúngica de ácido láctico para múltiples usos, a través de la revalorización de un residuo de la vitivinicultura.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	8
1.1	MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	9
2.	OBJETIVO GENERAL.....	12
3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4.	DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	13
5.	MARCO TEÓRICO.....	14
5.1	CONCEPTO DE BIORREFINERÍA.....	14
5.1.1	BIORREFINERIA EN EL MUNDO.....	20
5.1.2	BIORREFINERIA EN ARGENTINA.....	26
5.2	CARACTERÍSTICAS DE ÁCIDO LÁCTICO.....	36
5.3	PRODUCCION Y DEMANDA DE ACIDO LÁCTICO.....	42
5.4	PRODUCCION BIOTECNOLOGICA DE ÁCIDO LÁCTICO.....	45
5.5	<i>RHIZOPUS ORYZAE</i> COMO PRODUCTOR DE ÁCIDO LÁCTICO.....	50
5.6	PROCESO DE OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A ESCALA INDUSTRIAL ..	57
5.7	SÍNTESIS QUÍMICA DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	69
5.8	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....	71
5.8.1	FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.....	71
5.8.2	MÉTODOS DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	76
5.8.3	CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.....	78
5.8.4	ASPECTOS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.....	79
5.8.5	BIORREACTORES.....	79
5.8.6	APLICACIONES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.....	86
6.	ESTADO DEL ARTE.....	88
6.1	BIOPRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA: PROCESOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN.....	88
6.2	FERMENTACIÓN DIRECTA DEL ÁCIDO L(+)-LÁCTICO A PARTIR DE LA PULPA DE LA MANDIOCA MEDIANTE EL CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO DE <i>RHIZOPUS ORYZAE</i>	89
6.3	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR <i>RHIZOPUS ORYZAE</i> EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE RESIDUOS DE ANANÁ.....	89

6.4 FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS UTILIZANDO <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i>	90
7. MATERIALES Y MÉTODOS	92
7.1. CARACTERIZACION DE ESCOBAJO DE UVA.....	92
7.2. ESTUDIO DE PRETRATAMIENTOS HIDROLÍTICOS DE ESCOBAJO DE UVA.....	96
7.3. FERMENTACIÓN BATCH	96
7.3.1. PRETRATAMIENTO	96
7.3.2. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	96
7.3.3. FERMENTACIÓN	96
7.3.4. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA FÚNGICA.....	97
7.3.5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	98
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
8.1. CARACTERIZACION DE ESCOBAJO DE UVA.....	99
8.2. ESTUDIOS DE PRETRATAMIENTOS HIDROLÍCOS DE ESCOBAJO DE UVA.....	100
8.2.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA	100
8.2.2. HIDRÓLISIS CON AGUA OXIGENADA	101
8.3. FERMENTACIÓN BATCH	102
8.3.1. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.....	102
8.3.2. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA FÚNGICA.....	104
8.3.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	104
9. CONCLUSIONES	108
9.1. CARACTERIZACION DE ESCOBAJO DE UVA.....	108
9.2. ESTUDIO DE PRETRATAMIENTOS HIDROLÍTICOS DE ESCOBAJO DE UVA.....	108
9.3. FERMENTACIÓN BATCH	109
10. BIBLIOGRAFIA.....	110

1. INTRODUCCIÓN

En la presente Tesis se desarrollará de forma secuencial el tema “Obtención de ácido láctico por fermentación fúngica de escobajo de uva”. En el *ítem 1.1* se desarrollará la Motivación y Justificación que llevó a desarrollar el tema de Tesis propuesto. Allí se muestra las toneladas de residuos sólidos que la industria vitivinícola genera por año en San Juan, como así también se nombrarán los múltiples usos del ácido láctico, y los dos tipos de fermentaciones usadas para la obtención de ácido láctico: bacteriana y fúngica.

En el *Capítulo 2* se detallará el objetivo general de la Tesis, el cual será obtener ácido láctico a través de la fermentación en estado sólido del escobajo de uva utilizando *Rhizopus oryzae* NCIM 1299. Luego en el *Capítulo 3* se plantearán los objetivos específicos, es decir, las metas en cuanto a lo que se espera obtener con las fases teóricas y experimentales que se desarrollarán.

En el *Capítulo 4* se mostrará la difusión de los resultados de la Tesis que fueron presentados en Simposios y Congresos.

En el *Capítulo 5* se desarrollará el marco teórico, que dará una fundamentación teórica del objeto de estudio respecto al concepto de biorrefinería donde se destaca el gran potencial de las biorrefinerías aplicadas a los residuos sólidos urbanos, basadas en una economía circular. Luego se abordará sobre la biorrefinería en el mundo y la situación de la biorrefinería en Argentina. Posteriormente se detallarán las características del ácido láctico, donde se nombran además los usos y las industrias que lo aplican, detallando también el *Rhizopus Oryzae* como productor de ácido láctico. Luego se explicará cómo fue variando el precio por kilo toneladas de ácido láctico a lo largo de los años, describiendo además las grandes empresas dedicadas a la producción de ácido láctico, situadas en países desarrollados. También se analizará la producción biotecnológica de ácido láctico, dónde se detalla la síntesis de ácido láctico, las materias primas usadas, las características de las bacterias y la fermentación ácido láctica. Además se mencionarán las condiciones para obtener ácido láctico usando *Rhizopus oryzae*, los sustratos que se usan y las rutas de fermentación, además de la taxonomía, necesidades nutricionales y el uso industrial. Finalmente, en este *Capítulo* se detallarán los distintos métodos que se usan para la separación y recuperación de ácido láctico, con sus ventajas y desventajas.

Luego en el *Capítulo 6* se abordará sobre los trabajos que hay hasta el momento sobre la temática en estudio.

Posteriormente en el *Capítulo 7* se muestra la metodología a desarrollar en los experimentos a escala de laboratorio desarrollados. El *Capítulo 8* se refiere a los resultados y discusión obtenidos luego de llevar a cabo los experimentos, para luego finalmente en el *Capítulo 9* detallar las conclusiones obtenidas en la Tesis.

1.1 MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La provincia de San Juan forma parte de un grupo de provincias cuya actividad económica principal es la industria vitivinícola. Dicha industria genera por año aproximadamente 26,398 toneladas de residuos sólidos (INV, 2022). Estos residuos tienen un alto contenido de materia celulósica que hace que los mismos sean difíciles de procesar haciendo que la disposición descontrolada de los mismos genere un alto impacto ambiental en la región.

Los componentes monoméricos que forman parte de la estructura celulósica de estos residuos pueden ser utilizados como sustrato de fermentación. Se puede valorizar así un residuo y utilizar al mismo tiempo un sustrato de bajo costo. El ácido láctico, es un posible producto de fermentación. Es ampliamente utilizado en las industrias alimenticia, cosmética, farmacéutica, y química y es muy importante por su uso como monómero en la producción de ácido poliláctico, polímero completamente biodegradable. Puede producirse ya sea por fermentación biotecnológica o síntesis química. La primera ruta ha recibido un interés recientemente, debido al interés en el medio ambiente y la naturaleza limitada de fuentes de origen petroquímico.

Dos tipos de fermentaciones se han aplicado para la obtención de ácido láctico a partir de residuos de la agricultura: fermentación bacteriana y fúngica. Se ha demostrado que la producción de ácido láctico por bacterias tiene un rendimiento moderado, pero es una opción poco atractiva debido a los altos costos y la complicada recuperación del producto. En cambio, el hongo *Rhizopus oryzae* (*R. oryzae*) puede producir la forma pura L(+) del ácido láctico a partir de carbohidratos complejos presentes en los residuos de la agricultura. Entre las materias primas utilizadas para la producción de ácido láctico por

medio de la fermentación del hongo *R. oryzae* se encuentran: mazorcas de maíz, residuos de madera, melazas de caña y vinazas de remolacha, fibras de alfalfa, almidón de yuca, paja de trigo y residuos de patata; además de residuos generados en el proceso de producción de concentrados para alimentación animal, salvado de trigo, harina de trigo hidrolizada, jugos de dátiles, jugos de caña de azúcar .

En la producción de ácido láctico se usan mohos y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zymomonas*, *Saccharomyces* y *Kluiveromyces*, en particular *R. oryzae* debido que presenta la ventaja de que no requiere fuente de nitrógeno orgánico para su crecimiento, tiene la habilidad de producir directamente grandes cantidades de L(+)-ácido láctico a partir de almidón y puede separarse fácilmente del medio de fermentación en el proceso de recuperación y purificación (Serna-Cock & Rodriguez de Stouvenel, 2005). Los mohos presentan la dificultad de que su forma física cambia durante la fermentación, y los micelios pueden provocar un aumento en la viscosidad del medio de fermentación, provocando un gran aumento en la demanda de oxígeno y resistencia a la transferencia de masa en el proceso fermentativo (Serna-Cock & Rodriguez de Stouvenel, 2005).

Las variables que afectan la forma física del crecimiento del hongo son el pH del medio, la agitación, la aireación, el nivel de inóculo y la concentración de sustrato, por lo tanto estas variables son las que deben ser manipuladas para disminuir la viscosidad en el medio de cultivo (Serna-Cock & Rodriguez de Stouvenel, 2005).

En la producción biotecnológica de ácido láctico, con bacterias o con hongos, se utilizan como sustratos, sacarosa proveniente de azúcar de caña y remolacha azucarera, lactosa proveniente de lactosuero y dextrosa procedente de almidón hidrolizado, la sacarosa refinada y glucosa son los más utilizados pero debido a que el azúcar puro es de alto costo se han investigado otros sustratos para disminuir los costos de producción. Materiales celulósicos, licores sulfíticos, granos dañados, sustratos amiláceos disponibles en la forma de desechos agrícolas y porciones comestibles de granos y tubérculos, sirven como materia prima alternativa para su producción de ácido láctico. Por otro lado podemos nombrar los siguientes sustratos no puros utilizados para la obtención de ácido láctico: mazorcas de maíz, residuos de madera, melazas de caña y remolacha, fibras de alfalfa, almidón de yuca, paja de trigo y residuos de patata adicionados de residuos

generados en el proceso de producción de concentrados para alimentación animal, jugos verdes y pardos, salvado de trigo, jugos de caña de azúcar verde (Serna-Cock & Rodriguez de Stouvenel, 2005).

La producción biotecnológica, basada en la fermentación por bacterias u hongos de sustratos ricos en carbohidratos, depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del mismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado, y la formación de subproductos (Serna-Cock & Rodriguez de Stouvenel, 2005).

En la producción por fermentación al utilizar bacterias se busca que estas sean preferiblemente termófilas, que fermenten rápida y completamente sustratos baratos, con mínima adición de nutrientes nitrogenados, que crezcan a pH bajos, que presenten poca producción de biomasa y una despreciable cantidad de subproductos (Serna-Cock & Rodriguez de Stouvenel, 2005).

Los residuos lignocelulósicos necesitan un pretratamiento para poder convertir la lignina y celulosa en azúcares reductores que luego se convierten en ácidos carboxílicos.

En esta Tesis se presenta la obtención de ácido láctico a partir de escobajo de uva. Según el texto de Gimenez y col. (2013) el escobajo de uva es uno de los residuos industriales más abundante de la región de Cuyo de Argentina, generado en el procesamiento de la uva para la producción de vinos, mostos y pasas, representando entre el 2.5 y el 5.5 % de la masa de uva industrializada.

De acuerdo a datos obtenidos en el Informe Anual de Cosecha 2021 del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) la cantidad de uva que ingresó a San Juan en el año 2021 fue de 527,970 ton (INV, 2022). Además, según el texto de Ruiz Moreno y col. (2015) el escobajo de uva representa alrededor del 5 % de los subproductos del vino. Es decir que con estos datos se obtiene la cantidad de escobajo de uva anual, con un valor de 26,398 ton, como se muestra a continuación:

100 % subproductos del vino----- 527,970 ton

5 % escobajo de uva-----26,398 ton

2. OBJETIVO GENERAL

- Obtener ácido láctico a través de la fermentación en estado sólido del escobajo de uva utilizando *Rhizopus oryzae* NCIM 1299, como una estrategia de revalorización del residuo de la industria vitivinícola.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una caracterización físico-química del escobajo de uva proveniente de uvas blancas y tintas.
- Llevar a cabo fermentaciones batch utilizando *Rhizopus oryzae* NCIM 1299 de escobajo de uva sometido a pretratamiento.
- Cuantificar el ácido láctico producido en la fermentación batch.

4. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de esta Tesis se presentaron en diferentes Simposios y Congresos, los cuales se detallan a continuación:

- “Obtención de Ácido Láctico a partir de la Fermentación fúngica de Escobajo de uva”. Albarracín, Mariana, Bustos; María Cecilia. I Congreso Binacional de Investigación Científica (Argentina—Chile) - V Encuentro de Jóvenes Investigadores. 22, 23, 24 de noviembre de 2017. San Juan.
- “Obtención de Ácido láctico a partir de la fermentación de escobajo de uva con *R. oryzae*”. M. Carla Groff, Mariana Albarracín, M. Cecilia Bustos, Diego Kassuha, Sandra E. Noriega. V Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas - CLICAP 2018- - Argentina. 11, 12 y 13 de abril de 2018. San Rafael, Mendoza.
- “Caracterización de biomasa regional, para su uso como sustrato sólido de fermentación con *R. oryzae*: escobajo de uva y alperujo”. M. Carla Groff, Mariana Albarracín, Sandra E. Noriega. Red Andina de Universidades (RADU). 30 de Mayo de 2018. San Juan.
- “Producción de ácido láctico por fermentación de escobajo de uva con *R. Oryzae*”. M. C. Groff, M. Albarracín, D. E. Kassuha, M. Gaido, S. E. Noriega. II Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del NOA y CUYO. ISBN 978-987-521-982-3. 3, 4 y 5 Octubre de 2018. San Juan.
- “Escobajo de uva: un sustrato sólido innovador para la obtención de ácido láctico en fermentación fúngica.”. M. C. Groff, M. Albarracín, M.C. Bustos, M. Gaido, D. E. Kassuha y S. E. Noriega. II Jornadas de Investigación, unidad de vinculación académica en agronomía, agroindustria y enología. 8 y 9 de Agosto de 2019. Campus Universidad Católica de Córdoba (UCC), Córdoba.
- “Cambio de morfología de *R. oryzae* en la fermentación sólida de escobajo de uva”. Groff, María C.; Rocío M. Gil, María C. Fernández P., Mariana Albarracín, Gustavo J.E. Scaglia y Sandra E. Noriega. 1º Congreso Latinoamericano de Ciencia, Tecnología y Sociedad. San Juan, 8 al 10 de Noviembre de 2022.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 CONCEPTO DE BIORREFINERÍA

Las biorrefinerías surgen como una posible solución para generar no sólo biocombustibles, sino múltiples productos de manera rentable y más sustentable, a partir de la biomasa. Entiéndase como biomasa al material orgánico de origen relativamente reciente y renovable, como plantas, leña, cultivos y residuos agrícolas, etc. (Martínez Hernández, 2015). Es decir que la biomasa puede ser de origen animal o vegetal, pero generalmente se compone de hidratos de carbono (biomasa vegetal) y lípidos y proteínas (biomasa animal) (Fernández Acosta, 2013). La utilización de biomasa como materia prima, se considera energía renovable porque es inagotable siempre que se gestione sosteniblemente. Cumple un papel muy importante en el tratamiento de residuos y en el aprovechamiento de terrenos. Esta fuente energética puede aprovecharse mediante su combustión directa a través de su transformación en biogás, bioalcohol, etc.

Respecto a los métodos de conversión de la biomasa en combustible pueden agruparse en dos tipos: conversión bioquímica, a partir de ésta se obtiene etanol y metano mediante la fermentación alcohólica y digestión anaerobia, y conversión termoquímica de la que se puede obtener gas pobre, carbón y jugos piroleñosos a partir de procesos de gasificación y pirólisis (Fernández Acosta, 2013).

Presenta un importante interés medioambiental y es que, siempre que se obtenga de una forma renovable y sostenible (es decir que el consumo no circule a mayor velocidad que la capacidad del bosque, la tierra, etc. para regenerarse) se considera la única fuente de energía que aporta un balance de CO₂ favorable, debido a esto la materia orgánica durante su crecimiento puede retener más CO₂ del que se libera en su combustión (Fernández Acosta, 2013).

Se puede concluir que la implementación de las biorrefinerías es un tema de gran importancia económica, ambiental y social. Ya que la biorrefinería aplicada a los residuos sólidos urbanos es un método con un gran potencial, que permite realizar el reciclaje y valorización de recursos en forma de subproductos de valor añadido o energía, basados en un modelo de economía circular (Triviño Pineda, Reyes, & Sánchez Ramírez, 2021).

Tipos de biomasa

A continuación, se nombran diferentes formas en que la biomasa puede clasificarse (Fernández Acosta, 2013):

- Biomasa natural: es aquella producida en la naturaleza sin que exista intervención humana.
- Biomasa residual: se define como aquella generada en cualquier actividad humana, generalmente en los procesos agrícolas, ganaderos y los del propio hombre, como pueden ser, basuras y aguas residuales.
- Biomasa producida: cultivada con el fin de obtener biomasa que pueda ser transformada en combustible, en vez de producir alimentos, ejemplo de ésta puede ser la caña de azúcar, destinada a la producción de etanol para carburante.

Quedan excluidos del término de biomasa todos aquellos productos agrícolas que sirvan de alimentación al hombre y a los animales domésticos, así como también los combustibles fósiles.

Ventajas y desventajas del uso de la biomasa

Algunas ventajas que pueden presentarse son; que es una fuente renovable, ya que se considera la única fuente de energía que aporta una cantidad de CO₂ favorable, de manera que la materia orgánica puede retener durante su crecimiento más CO₂ del que es liberado en su combustión, no depende de ninguna fuerza (como en la eólica), los combustibles que se producen a partir de la biomasa tienen varios usos (pueden sustituir a la gasolina para el transporte), puede reconstituir tierras degradadas, se evita la contaminación del medio aprovechando los residuos orgánicos, se logra la ausencia de emisión de azufres e hidrocarburos altamente contaminantes (lluvia ácida), también, se obtienen productos biodegradables a partir de ella (Fernández Acosta, 2013).

La biomasa se ha ido potenciando como fuente energética y hoy es responsable del 6 % de la generación de electricidad a nivel mundial, esto demuestra un gran interés por el uso de ese combustible renovable, ya que protege al medio ambiente (Fernández Acosta, 2013).

También se pueden nombrar algunos inconvenientes ya que solamente puede aprovechar residuos orgánicos, para conseguir un buen aporte energético es necesaria gran cantidad de biomasa y como consecuencia ocupar grandes extensiones de tierra en el caso del cultivo energético, menor costo de producción de la energía proveniente de los combustibles fósiles, menor rendimiento de los combustibles derivados de la biomasa respecto de los combustibles fósiles (Fernández Acosta, 2013).

Procesos de transformación de la biomasa

Dentro de las conversiones de la biomasa se destacan principalmente dos, en las que pueden emplearse métodos diferentes, éstos se nombran en la figura a continuación (Fernández Acosta, 2013):

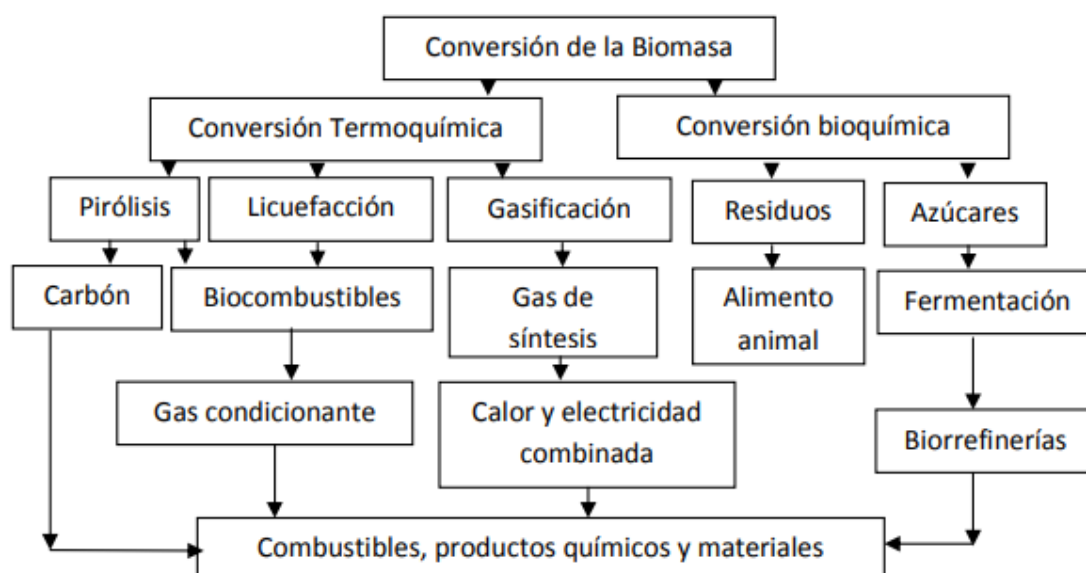


Figura 1: Conversiones de la biomasa.

Fuente: Fernández Acosta (2013).

Procesos de transformación bioquímica: Los procesos de transformación biológica son aquellos producidos por microorganismos, que están presentes en la biomasa, o se añaden durante el proceso. El proceso de fermentación alcohólica, para la obtención de etanol-combustible, originó el concepto de biorrefinería. Mediante la fermentación de la biomasa pueden generarse compuestos bioderivados (butanol, ácido láctico, ácido acético, glicerina, etc.). También la fermentación metánica es otro método

biológico, consiste en la digestión anaerobia de la biomasa por bacterias. Se suele utilizar para la transformación de la biomasa húmeda, en los fermentadores, o digestores.

Procesos de transformación termoquímicos: Consisten en la transformación de la biomasa en energía o combustibles, en presencia de reacciones químicas irreversibles, a partir de elevadas temperaturas en condiciones variables de oxidación. Se utiliza ésta tecnología en aquellos casos en los que la biomasa, por su estado sólido y seco, se transforme en energía con una elevada velocidad de reacción. Los procesos termoquímicos pueden dividirse en varias categorías:

- **Combustión:** Es aquella forma en la que se logra de manera más directa el aprovechamiento energético de la biomasa. Como producto principal se genera calor; éste puede emplearse directamente (fines domésticos: cocción, calefacción; fines industriales: calor de procesos, generación de energía eléctrica o mecánica, etc.) o utilizarse para generar energía eléctrica mediante un ciclo de vapor convencional. Se considera la biomasa lignocelulosa con un bajo contenido en humedad, la más adecuada para la aplicación de la combustión con fines energéticos. La combustión se puede emplear para generar la energía para los procesos de una biorrefinería, utilizando tanto la materia prima de partida, como así también los efluentes generados en otros procesos de conversión. Se pueden nombrar distintos tipos de combustión, como la combustión completa, combustión neutral, combustión incompleta con defecto de aire y combustión con exceso de aire.
- **Gasificación:** Proceso que genera una combustión que presenta condiciones de defecto de oxígeno, con producción de monóxido y dióxido de carbono, hidrógeno y metano, en proporciones que van a depender de la composición de la materia prima y las condiciones del proceso. Este proceso consiste en una oxidación parcial a temperaturas entre 700 y 1500 °C, para lograr un buen rendimiento de la mezcla gaseosa resultante. Se recomienda que la biomasa empleada debe tener una elevada relación carbono/nitrógeno, bajo contenido en azufre y un contenido de humedad menor a 40 %. Se emplea un comburente que puede ser aire, oxígeno, vapor de agua y/u oxígeno e hidrógeno. Dentro de los distintos tipos de

gasificaciones existen la gasificación con aire, con oxígeno y/o vapor de agua y gasificación con hidrógeno.

- Licuefacción: Es un proceso termoquímico usado para la obtención de combustibles líquidos a bajas temperaturas y altas presiones. Presenta algunas desventajas: trabaja a elevadas presiones, inconvenientes en el bombeo de la alimentación a esas presiones, utilización de hidrógeno y elevados costos ya que es un proceso presurizado. Pero también los combustibles líquidos presentan ventajas sobre la biomasa como tal, una de ellas es la elevada densidad energética, su transporte brinda mayor economía y presenta estabilidad en su almacenaje. Respecto a la licuefacción hidrotérmica se basa en la hidrogenación indirecta de la biomasa y puede considerarse una variante de la pirólisis.
- Pirólisis: Se define como la descomposición de la materia orgánica debido a la acción del calor y ausencia de oxígeno. Se considera como el proceso inicial, en el cual se somete el residuo previamente a su combustión o su gasificación. La pirólisis comienza a los 275 °C y se completa a los 450 °C. En cuanto a la naturaleza y composición de los productos finales, estas dependen de las propiedades de la biomasa tratada, de la temperatura y presión a la que se lleva a cabo la operación, y de los tiempos del material en el reactor, etc. Las materias primas usadas para desarrollar esta técnica son principalmente los subproductos agrícolas y forestales y los residuos sólidos urbanos. Se puede decir que la pirólisis es un buen método para la obtención de energía a partir de biomasa seca y para poder convertir los residuos sólidos urbanos en compuestos de interés económico (Fernández Acosta, 2013).

En el trabajo de Martínez Hernández (2015), se define a la Biorrefinería como:
“...una planta industrial que transforma la biomasa en vapor, electricidad, biocombustibles, químicos, plásticos y otros productos de alto valor agregado. Su propósito es aprovechar cada fracción de la biomasa, mediante la integración de procesos físicos, químicos, termoquímicos y bioquímicos, para generar múltiples productos; y cuando esto se hace a partir de una misma materia prima, los costos de producción y de capital se distribuyen entre los productos, haciendo su manufactura

mucho más rentable”. En la siguiente figura se muestra un esquema general del proceso implicado en una planta de bioprocesamiento:



Figura 2: Concepto de biorrefinería.
Fuente: Martínez Hernández (2015).

El objetivo es crear una economía circular que recicle tanto nutrientes como otros insumos auxiliares, lo que reduciría su impacto en el medio ambiente y los ecosistemas, permitiendo, a la vez, el ahorro de recursos no renovables. Se deben tener en cuenta ciertos procesos que pueden emplearse como una alternativa viable para el tratamiento de residuos sólidos urbanos mediante el concepto de biorrefinería, focalizado en el aprovechamiento de los residuos sólidos urbanos con un impacto ambiental, social, económico y técnico positivo (Martínez Hernández, 2015).

Algunas de las ventajas ambientales en cuanto a la biorrefinería están basadas en la disminución del uso de la tierra y la protección del agua, suelo y ecosistemas, con esto, se logran beneficios ecológicos como la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero. Respecto al sector social se genera un mayor número de empleos, desarrollo del sector y demás. La biorrefinería se refiere a procesos bioquímicos que se encargan de utilizar materia residual a base de biomasa como materia prima para la producción de biocombustibles, productos químicos y nutrientes (Triviño Pineda, Reyes, & Sánchez Ramírez, 2021).

Respecto al grado de integración, las biorrefinerías pueden clasificarse, como: Biorrefinerías de primera generación, Biorrefinerías de segunda generación y Biorrefinerías de tercera generación (Fernández Acosta, 2013):

- Se definen a las *biorrefinerías de primera generación* como aquellas en las que existe poca flexibilidad en las capacidades de procesado y donde se producen mayormente biocombustibles y algunos coproductos. Presenta un grado de integración casi inexistente. Algunos ejemplos de este tipo de biorrefinerías son las plantas de producción de etanol a partir de cereal por procesos de molienda seca y las plantas de fabricación de biodiesel mediante el proceso de transesterificación de aceites vegetales.
- Respecto a la *biorrefinería de segunda generación*, son susceptibles de conectar líneas de productos industriales con las unidades existentes de producción agrícola. Al contrario de una biorrefinería de primera generación, ésta tiene la capacidad de producir gran variedad de productos finales bajo demanda. Estos productos pueden ser: almidón, jarabe de maíz con alta concentración de fructosa, etanol, aceite de maíz, piensos de gluten de maíz y harina. Como conclusión se puede decir que las biorrefinerías de segunda generación consisten en plantas que acoplan la producción de algunos coproductos a la de biocombustible.
- Las *biorrefinerías de tercera generación*, partiendo de biomasa de origen agrícola o forestal, producirían, mediante tecnologías múltiples, líneas de productos (biocombustibles, productos químicos, plásticos, etc.). Estas instalaciones se encargan de aprovechar todas las posibilidades que brinda la biomasa, reduciendo la generación de residuos.

5.1.1 BIORREFINERÍA EN EL MUNDO

Unión europea

La Unión Europea (UE) estima que en un futuro, en cada uno de sus estados miembros, 10 % de su energía provenga de fuentes renovables, para esto se desarrolló un diseño de biorrefinería integrada para el procesamiento sustentable de biomasa (Gómez Millán, 2015). Existe un programa de investigación llamado EuroBioRef, cuyo objetivo

es transformar biomasa a partir de cultivos de segunda generación (materiales lignocelulósicos y aceites vegetales) en productos comerciales. Este es un programa que incluye treinta socios (industriales, académicos, así como pequeñas y medianas empresas) de quince países en una cadena de trabajo que incluye: producción de cultivos, pretratamiento de biomasa, fermentación y procesos enzimáticos, procesos catalíticos y termoquímicos asistidos por un análisis de ciclo de vida y una evaluación económica de la cadena de valor (Gómez Millán, 2015).

Se estima poder demostrar un aumento económico con el uso de biomasa de segunda generación, evitando la producción de residuos, desarrollando nuevas tecnologías de reactores para disminuir costos en la elaboración de productos secundarios de menor valor agregado como olefinas (utilizadas en la producción de polímeros en la industria del plástico) y compuestos fenólicos (usados en el procesamiento de madera y plásticos, así como en la industria química) (Gómez Millán, 2015).

En la UE, cada uno de los países miembros son responsables de implementar la investigación. El Programa de Investigación Estratégica de SusChem fue publicado oficialmente en 2006 y establece la necesidad, entre otras, de aumentar la disponibilidad de químicos sostenibles provenientes de biomasa. Se destacan dos proyectos en esta área: la biorrefinería integrada, la cual fue enfocada a la construcción de plantas piloto, y la biorrefinería de demostración, la fábrica rápida, flexible y del futuro, enfocada a la construcción de instalaciones piloto para lograr la máxima integración de tecnologías existentes para el diseño de nuevos procesos en biotecnología industrial (o biotecnología “blanca”), nuevos materiales y química sostenible (o química “verde”), entre otros.

Considerándose las áreas prioritarias de SusChem, se aprobó Biorefinery Euroview, un proyecto madre para observar detalladamente y evaluar aquellas actividades de desarrollo tecnológico de las biorrefinerías, así como también sus implicaciones para el sector agrícola y forestal. El proyecto BIOPOL existe en forma paralela, para evaluar el estatus técnico, social, ambiental, político y de implementación de los resultados de investigación en biorrefinerías y sus implicaciones en los sectores agrícola y forestal. Se han tenido en cuenta temas referidos a la biomasa como materia prima, su uso potencial, los avances en la conversión bioquímica y termoquímica, y los análisis económico, técnico

y ambiental. Se han llevado a cabo eventos organizados por la parte gubernamental y por el sector industrial, como la Conferencia Europea sobre la Investigación en Biorrefinerías 2006 en Helsinki y la Conferencia sobre Biorrefinerías de Madera del Norte en Estocolmo 2008 y Helsinki 2009, organizada por las empresas STFI-Packforsk, Solander Science Park, Processum Sostenible (Fernández Acosta, 2013).

En Europa, países como Suecia y Finlandia utilizan principalmente residuos de la industria forestal para producir biocombustibles y calefacción, así como también se encargan de fabricar pulpa (para la producción de cartón, textiles a base de celulosa, entre otros) y papel. Se suele utilizar mayormente biomasa local, esto depende del tipo de materia prima que se tenga en mayor cantidad en la región y de los productos principales requeridos (Gómez Millán, 2015).

América Latina

En América Latina los gobiernos y la comunidad científica se han puesto el foco en la exploración y producción de biocombustibles, principalmente bioetanol y biodiesel. En cuanto a la producción de químicos a partir de productos renovables ha sido un tema de interés secundario. Cabe destacar desafortunadamente que muchas de las iniciativas generan polémica debido a un mal planeamiento agro-industrial, falta de previsión de los efectos de importación/exportación o a su falta de sostenibilidad.

Debido a la escasez de fondos, falta de incentivos y de políticas fiscales que promuevan entre el sector productivo el interés en las biorrefinerías, prácticamente ningún país latinoamericano cuenta con una estrategia nacional que considere la producción centralizada. Estos países pueden beneficiarse a partir de la producción local de biocombustibles, pero se necesita de un adecuado marco legal sobre bioenergía, cuyo fin sea proteger a las comunidades rurales (ámbito social) y ecosistemas (ámbito ambiental) de la explotación proveniente de grandes firmas transnacionales. A excepción de los casos de Brasil (1975), Guatemala (1985) y Honduras (1988) las legislaciones son todas del siglo XXI. Dentro de los países latinoamericanos que cuentan con alguna legislación para biocombustibles, se muestran en la tabla siguiente (Fernández Acosta, 2013).

Tabla 1: Países Latinoamericanos con legislaciones para biocombustibles

Países	Año
Nicaragua	2002
Perú	2003
Colombia	2004
Costa Rica	2004
Ecuador	2004
Paraguay	2005
Bolivia	2005
Argentina	2006

Fuente: Fernández Acosta (2013).

Recientemente se han consolidado similares legislaciones en Chile, Cuba, El Salvador, México, Panamá, República Dominicana, Uruguay y Venezuela. Pero a pesar de ser legislaciones nuevas, ninguna contempla la producción de químicos renovables o adopta el concepto de las biorrefinerías.

Por otro lado, el país latinoamericano con una tecnología favorable para el establecimiento de biorrefinerías es Brasil. La obtención de energía a partir de caña de azúcar se remonta a 1975 con el Programa Nacional de Alcohol, con el que se obtuvo un gran avance en la sustitución de gasolina por alcohol, a partir de esto se logró que el 96 % de los vehículos en el mercado funcionen con 100 % de bioetanol en 1985 (Fernández Acosta, 2013).

Se puede destacar, que Brasil es un país con gran producción de caña de azúcar, muy utilizada como biomasa para la elaboración de bioetanol (Gómez Millán, 2015).

En Chile se realizaron dos congresos internacionales en 2006 y 2009 (Congreso Latinoamericano de Biorrefinerías). El principal tema que se trató fue el de biorrefinería forestal, además se trataron temas como la transformación bioquímica, termoquímica y química o física. Además de la biorrefinería forestal, también se llevaron a cabo grandes estudios que trataban sobre la producción de biocombustibles a partir de microalgas.

Estados Unidos

En Estados Unidos, se puede destacar que la industria de los combustibles ha crecido en los últimos años y también las tecnologías para producirlos. El principal objetivo fue aumentar la eficiencia con que se llevaba a cabo los procesos de producción. En abril de 2014, comenzaron a funcionar 25 biorrefinerías integradas que trabajan en diferentes escalas, la mayoría de ellas utiliza maíz como materia prima, aunque en menor cantidad puede emplearse, sorgo, residuos agrícolas, caña de azúcar, suero láctico, celulosa, residuos leñosos, almidón, trigo y cebada (Gómez Millán, 2015).

Una de las ventajas que tienen en común, tanto EE.UU como la UE, así como Canadá y Japón, es el desarrollo de biorrefinerías. Es decir que estos países consideran, el desarrollo de biorrefinerías como una estrategia nacional a 20 años. A partir de esto se logra aprovechar mejor los recursos e incrementar las probabilidades de cubrir las prioridades nacionales (Fernández Acosta, 2013).

México

México se considera uno de los líderes latinoamericanos que genera más emisiones de CO₂ (siendo éste, uno de los principales gases causantes del efecto invernadero), por lo que es necesario lograr disminuir los efectos del cambio climático; de esta forma, los bosques ayudarán a la adaptación al cambio climático y a minimizar sus efectos (Gómez Millán, 2015).

En México son enormes los recursos de biomasa, especialmente la basura (alrededor de 30 millones ton/año) y también los residuos agrícolas y agroindustriales (71 millones ton/año), además se pueden nombrar los forestales (3,6 millones ton/año). Respecto a la biomasa, se puede definir como una fuente de energía, pero, para lograr un aprovechamiento realmente sustentable, deben recuperarse algunas fracciones con el objetivo de darles un valor agregado, en lugar de quemar la biomasa por completo (Martínez Hernández, 2015).

Actualmente la enorme posibilidad nacional e internacional para producir energía y combustibles mediante tecnologías sustentables, limpias y eficientes, puede lograrse con las biorrefinerías. El objetivo principal será promover la industrialización de las

biorrefinerías, para lograr alcanzar las metas nacionales y mundiales, de manera de satisfacer la gran demanda de energía, disminuir la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero, además de diversificar materia prima y crear nuevos mercados y oportunidades (Gómez Millán, 2015).

Proyectos de Biorrefinería en el mundo

Existen actualmente ejemplos de plantas productoras de biocombustibles a partir de biomasa. Se pueden incluir éste tipo de plantas en biorrefinerías de primera generación, aunque también existen grandes proyectos sobre biorrefinerías de segunda generación alrededor del mundo como (Fernández Acosta, 2013):

Islandia: Se trata de una planta de demostración a escala piloto que se encarga de procesar 20 mil ton/año de lignocelulosa; obteniéndose etanol como producto principal y se utiliza como coproductos lignina, proteínas y fertilizante. Consiste en una biorrefinería basada en la producción de 7 millones litros/año de etanol lignocelulósico, rentable y sostenible. Dentro de las ventajas que más se destacan se pueden nombrar la disposición en el propio país de un mercado de energía renovable (geotérmica) eficiente y rentable, la buena organización sin necesidad de subsidios de los mercados de biomasa para procesar y de los productos generados.

Suecia: Chemrec y Domsjö Fabriker, dos importantes biorrefinerías forestales, utilizan 70 % de madera local como materia prima, y luego producir diversos productos como electricidad, lignosulfonatos para alimento animal y biofertilizantes. Además se encargan de procesar aceite residual de procesos de cocción.

Reino Unido: Una empresa muy reconocida es British Sugar, que procesa remolacha y genera como producto principal betaína (para acuacultivos), y como coproductos bioetanol, CO₂, energía térmica y carbonato de calcio, destinados al cultivo de tomate. Otra biorrefinería es Cargill/Cerestar, ubicada en Manchester, encargada de fabricar derivados de almidón a partir de trigo.

España: Una empresa ubicada en Alicante es BFS (Bio Fuel Systems). A partir de fitoplancton producirán hidrocarburos, y de esta forma obtener la misma gama de productos que se obtienen del petróleo fósil.

Francia: BIOHUB: Es un consorcio industrial, que se encarga de desarrollar químicos basados en materias primas agrícolas en biorrefinería.

Alemania: Biowert: Biorrefinería verde en Brensbach, esta empresa tiene como fin procesar desperdicios de pasto y residuos municipales de jardinería. Con esto se obtienen componentes proteínicos para forraje y fertilizante natural.

Holanda: Greenmills, Amsterdam; tiene como materia prima aceites vegetales que se usan para producir biodiesel.

5.1.2 BIORREFINERIA EN ARGENTINA

Se considera a la biorrefinería como un procesamiento sustentable de biomasa en una visión de productos comercializables y energía, es decir, es una estructura productiva que abarca procesos de conversión de biomasa y equipamiento apropiado para producir combustibles, energía y productos químicos de valor agregado. Esto implica una gran oportunidad de desarrollo para nuestro país, orientada hacia la producción vegetal y animal, así como también hacia el incremento de la calidad de la actividad agroindustrial (Dagnino, de Castro, Campestrini, & Chamorro, 2019).

Respecto a las biorrefinerías industriales, se han identificado como las rutas más convenientes para la creación de una bioeconomía sustentable. Los procesos agrícolas generan residuos del agro y foresto industria, por lo que no requieren servicios (energía o agua) adicionales para llevarlos a cabo. Algunos ejemplos de residuos agrícolas incluyen a la paja de arroz, cáscara de arroz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, rastrojo de algodón, etc., y se pueden utilizar como pienso para animales, combustible doméstico y como combustible para calderas en industrias. A partir de un proceso de biorrefinería que se aplica a residuos lignocelulósicos, se obtiene el aprovechamiento de la biomasa. La separación de los componentes principales, celulosa, hemicelulosas, lignina e inorgánicos, pueden utilizarse como materia prima para la producción de bioproductos de alto valor agregado, como por ejemplo bioalcoholes, fibras, resinas, ácidos orgánicos, azúcares, antibióticos, vitaminas, etc. Estos se usan en fabricación, plásticos, alimentos, construcción (Dagnino, de Castro, Campestrini, & Chamorro, 2019).

Un residuo que abunda en la región noreste de Argentina (provincias de Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Formosa y Chaco) es la cáscara de arroz. En cuanto a la producción de arroz en Argentina, alcanzó aproximadamente las 1,558,100 toneladas en 2015, de las cuales el 20 % fue cáscara de arroz, cuya composición es 34.1 % de celulosa, 14.6 % de hemicelulosas, 19 % de lignina, 15 % de inorgánicos y 8% de extractivos solubles en agua y etanol. Los polímeros de xilanos de hemicelulosas pueden convertirse en subproductos como jarabe de xilosa (azúcar), furfural, xilitol (edulcorante), compuestos de furano y polímeros de furano. En cuanto a la xilosa (pentosa) se aplica en productos como, aditivos alimentarios, detergentes, y también como edulcorante en forma de polvo cristalino. El xilitol y el furfural derivan de la xilosa; el xilitol es usado como edulcorante de alimentos y en productos farmacéuticos. El furfural, se utiliza como extractante en el refinado de aceites, así como también como fungicida o nematocida. Existen diferentes fracciones de biomasa disponibles, dependiendo de la distribución del producto de la biorefinería. Por ejemplo, en el proceso de prehidrólisis, cuyo objetivo es retener la celulosa, se obtiene licor compuesto por hemicelulosa, azúcares y lignina. Uno de los usos de este licor sería para la producción furfural (Dagnino, de Castro, Campestrini, & Chamorro, 2019).

Otra fuente importante de materias primas es la biomasa lignocelulósica, ya que es renovable y poco contaminante y además puede usarse para producir biocombustibles, biomateriales y bioproductos, similares al petróleo. Los residuos de la agro y foresto industria disponibles en la región Noroeste Argentino constituyen una alternativa importante para la biorrefinería. Se llevan a cabo procesos de fraccionamiento para separar los diferentes componentes de la biomasa (extractivos, celulosa, hemicelulosas, lignina, inorgánicos), y luego poder aprovecharlos. Se busca obtener: ácidos levulínico y láctico a partir de las hemicelulosas de la corteza y el aserrín de pino; xilitol a partir de las hemicelulosas de bagazo de caña y aserrín de eucaliptus.

Las biorrefinerías que se encargan de aprovechar y lograr la valorización de los residuos lignocelulósicos, se ubican en zonas rurales donde se llevan a cabo actividades agroforestales y serían un gran estímulo para las economías rurales de las diversas regiones de nuestro país. Los residuos podrían ser dependiendo de la temporada,

agroindustriales (bagazo de caña, cascarilla de arroz, paja de trigo, etc.) o forestales (aserrín, corteza, etc) (Area & Vallejos, 2016).

En Argentina actualmente, está comenzando, el aprovechamiento de los residuos de la industria de la madera para la generación de energía. Estos residuos lignocelulósicos presentan una composición entre 65-80 % de hidratos de carbono (celulosa y hemicelulosas) y 20-35 % de compuestos fenólicos (lignina y extractivos). Se realizan procesos de fraccionamiento para separar los diferentes componentes de la biomasa y lograr su aprovechamiento. Por ejemplo, con la porción de extractivos de la corteza y el aserrín de pino se pueden producir derivados de la oleoresina (insumos de la industria de pinturas, perfumería, etc.), y con los de eucaliptus y pino se pueden producir taninos (Area & Vallejos, 2016).

Los procesos de fabricación de pulpa obtenidos a partir de la industria papelera (procesos no degradativos), consisten en tratamientos de disolución usando agua o solventes orgánicos y aditivos (catalizadores y diversos reactivos) y además producen celulosa o lignina como producto final. Los procesos se basan en la diferencia de solubilidad del solvente elegido, como así también en las condiciones de proceso para lograr separar la celulosa, hemicelulosas y lignina como sustancias parcialmente despolimerizadas, que pueden ser degradadas en etapas posteriores. Se han desarrollado, además, nuevos métodos para la degradación simultánea de polisacáridos y la despolimerización parcial de la lignina (procesos degradativos). Cabe aclarar que en estos procesos se utilizan catalizadores, reactivos, enzimas y microorganismo para lograr un mayor grado de la hidrólisis y degradación. En la figura 3 se describen y nombran los bloques de construcción para bioproductos y biomateriales con mayor potencial a partir de residuo de las agro y forestoindustrias (Area & Vallejos, 2016).

TIPO DE RESIDUO	COMPUESTOS EXTRAIBLES	PRODUCTOS SEGÚN EL PROCESO DE CONVERSIÓN
FORESTOINDUSTRIA: • Corteza • Costaneros • Aserrín • Virutas • Despuntes • Chips y astillas • Podas	Celulosa	NO DEGRADATIVOS: rayon, celofan, nanofibras/ nanocristales de celulosa, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa DEGRADATIVOS: etanol, ácido láctico, sorbitol, glutamato, monosódico, ácido glutámico, HMF, ácido levulínico, ácido láctico
	Hemicelulosas	NO DEGRADATIVOS: filmes, polímeros DEGRADATIVOS: etanol, xilitol, butanol, 2,3-butanodiol, furfural
	Lignina	NO DEGRADATIVOS: combustible, dispersantes, emulsificantes, secuestrantes, aditivos, adhesivos, co-reactivo de polímeros y resinas. DEGRADATIVOS: vainilina, dimetilsulfuro (DMS), dimetilsulfóxido (DMSO), gas, aceite y carbón.
AGROINDUTRIA: • Bagazo • Cascarilla • Pajas • Podas (frutales, vid)	Extractivos	NO DEGRADATIVOS: Adhesivos DEGRADATIVOS: Epóxidos

Figura 3: Bloques de construcción para bioproductos y biomateriales con mayor potencial a partir de residuos de la agro y forestoindustrias.

Fuente: Area & Vallejos (2016).

En cuanto a los azúcares hemicelulósicos extraídos de la corteza y el aserrín de pino están compuestos de hexosas (glucosa, galactosa, manosa, etc.), mientras que las hemicelulosas de aserrín de eucalyptus, bagazo y otros residuos agrícolas se componen de pentosas (xilosa y arabinosa). A partir de las hexosas se pueden obtener ácidos orgánicos, entre ellos se pueden nombrar ácidos levulínico, láctico, succínico, entre otros; e hidroximetilfurfural, mientras que en el caso de las pentosas se pueden convertir a xilitol, furfural, etc. Se han obtenido diversos productos provenientes de los azúcares de la celulosa y hemicelulosas y de los compuestos fenólicos de la lignina. Algunos compuestos derivados de los azúcares pueden ser: etanol, furfural, hidroximetil furfural, ácido láctico, ácido succínico, ácido levulínico, sorbitol y xilitol.

Se debe destacar que los ácidos levulínico y láctico son compuestos químicos con importantes propiedades multifuncionales, por lo que presentan gran potencial industrial. Esta producción industrial se basa principalmente en aquellos derivados del petróleo y en azúcares de primera generación. Se puede nombrar al xilitol, edulcorante que se utiliza en productos farmacéuticos y de higiene oral, además puede ser usado en panificados, mermeladas, gelatinas, refrigerantes y helados. También se utiliza en la prevención o tratamiento de enfermedades como diabetes, obesidad, osteoporosis y fibrosis quística. El xilitol puede obtenerse a partir del proceso de reducción química de la xilosa o también a

partir de la conversión biotecnológica de medios que contienen xilosa (Area & Vallejos, 2016).

- **Ácido levulínico:** Es uno de los productos químicos de mayor potencial ya que es un compuesto químicamente versátil ya que tiene propiedades de una cetona y un ácido. La producción de ácido levulínico se basa en el proceso de degradación de las hexosas (deshidratación). La conversión de las hexosas a ácido levulínico presenta un rendimiento de 60-65 % debido a la producción de ácido fórmico. El ácido levulínico crudo presenta una pureza de 75 % pero puede purificarse aún más hasta 98%. Se ha descubierto que la utilización de MTHF (Metiltetrahidrofurano) como solvente resulta eficiente para la extracción y recuperación de ácido levulínico y ácido fórmico. El ácido levulínico presenta varios usos, como se muestra en la siguiente figura: polímeros, resinas, sustancias saborizantes (γ -valerolactona), pesticidas (ácido D-amino levulínico, ácido difenólico) y aditivos para combustible (metiltetrahidrofurano) con varias aplicaciones industriales potenciales (Area & Vallejos, 2016).

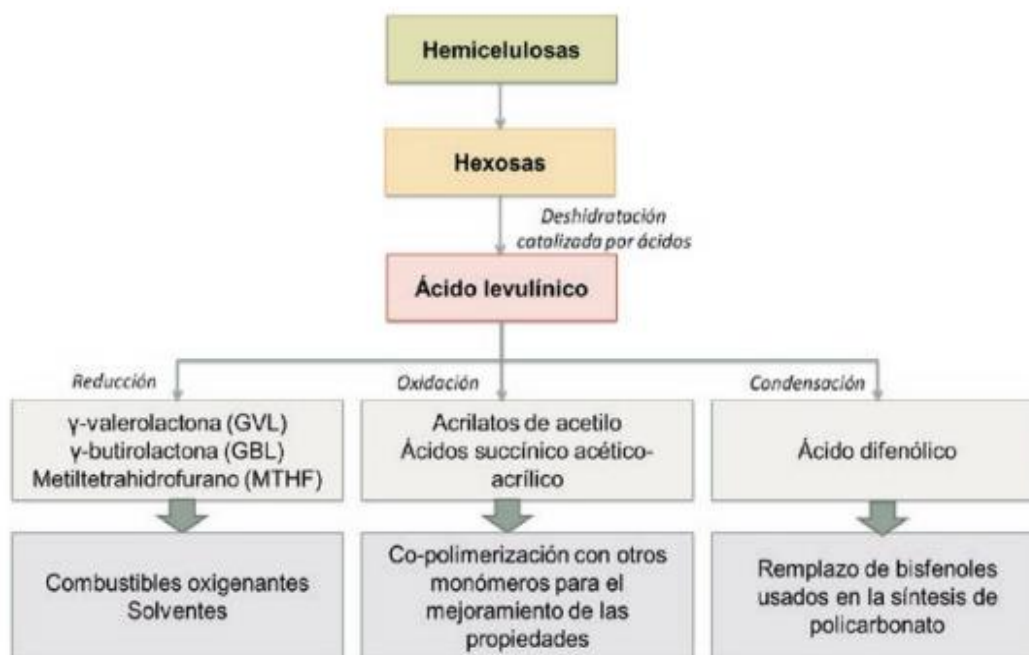


Figura 4: Producción y derivados del ácido levulínico.

Fuente: Area & Vallejos (2016).

Como puede observarse en la figura 4 la γ -valerolactona (GVL) se obtiene a partir del ácido levulínico por hidrogenación catalítica con altos rendimientos (95-99 %). Este compuesto puede mezclarse con gasolina (10 %) ya que presenta baja presión de vapor, en comparación con otros compuestos oxigenados como el etanol. También presenta características como, elevada densidad de energía en comparación con el etanol, estabilidad química baja, no forma peróxido ni genera problemas de corrosión. Mediante distintos procesos el GVL puede usarse también para la producción de polímeros.

- Ácido láctico: Este ácido y sus derivados son usados ampliamente en la industria alimenticia, química, farmacéutica, del plástico, textil, agricultura y alimentación animal entre otros, destacando el ácido poliláctico como una de las aplicaciones con mayor importancia en medicina, electrónica y bioplásticos. En la actualidad el ácido láctico es comercialmente producido por la fermentación de hexosas (azúcares) provenientes de la biomasa; y de esta forma se produce ácido láctico enantioméricamente puro, usado para la producción de ácido poliláctico (APL). El APL es un polímero biodegradable y principalmente se aplica en envases de alimentos y bebidas.

Para la producción de ácido láctico se usan bacterias, éstas utilizan la vía de la glicólisis para la transformación de la glucosa y la isomerización a un derivado de fructosa, y la reacción aldólica de esa fructosa genera dos fragmentos de C3, que se convierten a piruvato y por último se reducen a lactato. El ácido láctico formado produce una disminución del pH del caldo de fermentación, por este motivo se adiciona una base para que los microorganismos puedan resistir la acidez y sigan metabolizando el azúcar. Como base generalmente se usa hidróxido de calcio, es decir que el producto inicial es lactato de calcio. Para lograr la purificación del lactato de calcio a ácido láctico crudo, se debe adicionar ácido sulfúrico, además de realizarse también la esterificación con metanol a lactato de metilo, seguido de destilación e hidrólisis. Como alternativa para la extracción del ácido láctico se utilizan solventes (Area & Vallejos, 2016).

Algunos inconvenientes del proceso basado en la fermentación de hexosas son: la baja productividad espacio-tiempo a causa del mayor volumen de equipamiento

por realizar el trabajo a bajas concentraciones de azúcares y productos y los elevados tiempos de conversión por fermentación; por su baja productividad se incrementa el costo de la separación y la necesidad de varias etapas de purificación (Area & Vallejos, 2016).

Otra de las formas de obtener el ácido láctico es por vía química mediante la degradación alcalina de azúcares, usando hidróxido de calcio, por ejemplo. Este proceso no se usa comercialmente debido a que el ácido láctico que se formó es racémico y no sería útil para la síntesis de APL. A partir del ácido láctico, se pueden obtener de una serie de productos químicos de gran importancia industrial, como se observa en la figura 5. Las conversiones catalíticas del ácido láctico comprenden la oxidación a ácido pirúvico, la reducción a 1,2-propanodiol, o la esterificación para producir ésteres de lactato, como se muestra a continuación:

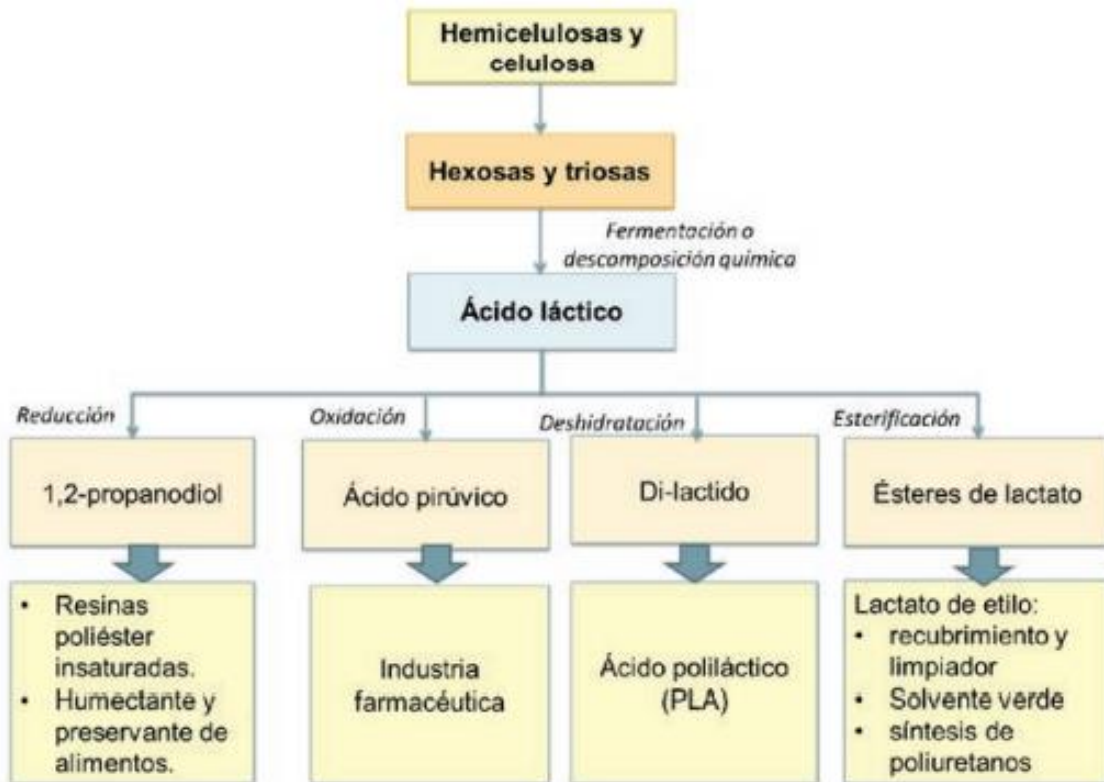


Figura 5: producción y derivados del ácido láctico.

Fuente: (Area & Vallejos, 2016).

- Xilitol: Este producto se produce debido a la reducción química o biológica de la xilosa proveniente de hidrolizados hemicelulósicos derivados de materiales lignocelulósicos ricos en xilanos (ver figura 6). Es muy importante que la xilosa presente una elevada purificación para evitar así la presencia de otros azúcares que genera subproductos indeseables. En cuanto a la solución obtenida como resultado, se concentra y por otra parte el xilitol es recuperado por cristalización, obteniéndose un producto que contiene una pureza de 99.7 % y un rendimiento de 50-60 % con respecto a la xilosa inicial. Respecto a los costos de producción de estos procesos, son elevados debido a la dificultad de las etapas de purificación que se llevan a cabo para eliminar los subproductos.

Respecto a la producción biotecnológica de xilitol está basada en la hidrogenación de la xilosa por algunas especies de levaduras (*Candida*, *Saccharomyce*, *Pichia*, entre otras). Algunas ventajas que presentan estos procesos químicos son: se realizan en condiciones menos severas de presión y temperatura, y además generan menos cantidades de subproductos. Se desarrollan procesos biotecnológicos rentables y compatibles con el medioambiente, a partir del uso de materiales lignocelulósicos de bajo costo (residuos agroforestales).

Otra propiedad importante es que el xilitol es un monómero multifuncional no tóxico, capaz de formar distintos tipos de enlaces a partir de reacciones de copolimerización con ácidos policarboxílicos. Por ejemplo: a partir de la policondensación del xilitol con ácido cítrico se obtienen polímeros biodegradables solubles en agua y mediante la reacción de acrilación de este polímero se obtiene un hidrogel elastomérico (Area & Vallejos, 2016).

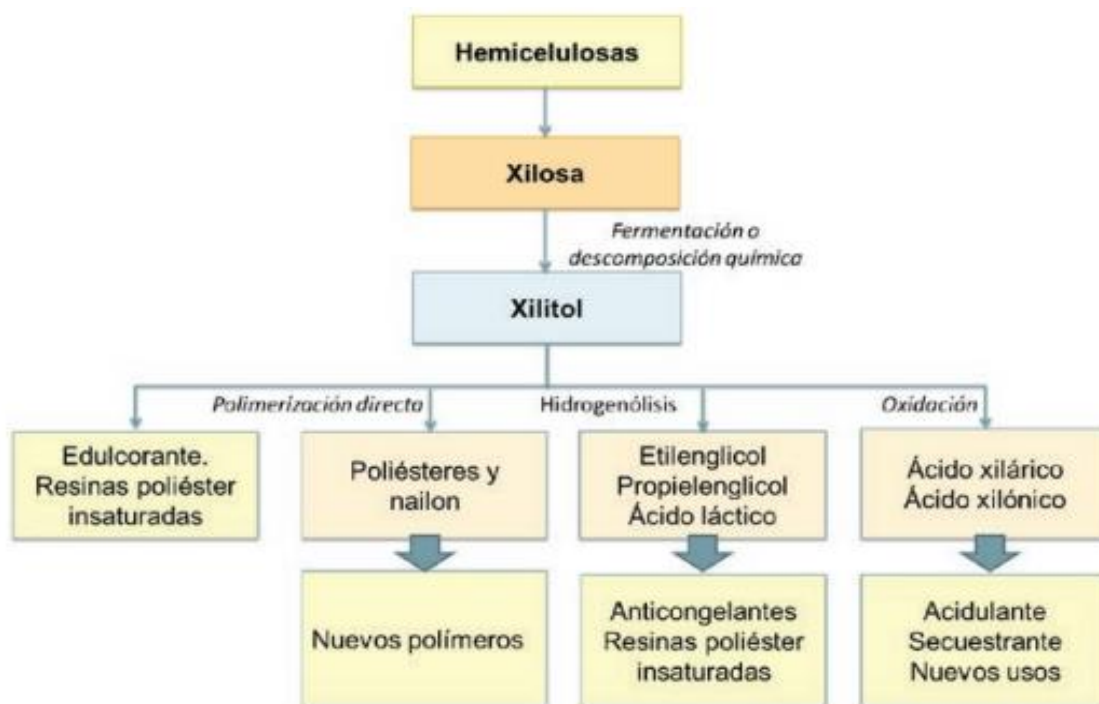


Figura 6: Producción y derivados del xilitol.

Fuente: Area & Vallejos (2016).

Como se puede observar en la figura 6, a partir de la oxidación del xilitol se obtiene ácido xilónico muy usado como acidulante, secuestrante, y en otras aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y agrícola. Por otro lado la conversión de xilitol a etilenglicol y propilenglicol (polioles) se lleva a cabo a partir de reacciones de hidrogenólisis (rendimientos de 80 %) que pueden aplicarse como anticongelantes y también en síntesis de resinas de poliuretano insaturadas.

Por otro lado, se puede mencionar la producción de azúcar y etanol a partir de caña de azúcar, que se afectada mayormente por la variabilidad de la actividad agrícola, cuyo rendimiento depende en mayor medida de las condiciones climáticas y las características del laboreo.

Respecto a la actividad sucroalcoholera hay que resaltar que la provincia de Tucumán es una de las principales productoras de caña de azúcar del país con 15 ingenios azucareros, 12 destilerías y 5 plantas deshidratadoras de etanol (acopladas a las plantas azucareras). En el proceso, la caña de azúcar se somete a una molienda, para obtener jugo (agua y sacarosa principalmente), éste luego se usa para la obtención de azúcar blanco o

crudo (P1), o es fermentado para producir etanol (P2). En la P1 se genera un subproducto azucarado, llamado melaza, que además se utiliza para la obtención de etanol (P3). Tanto en la P1 como en la P2 se genera bagazo, un material lignocelulósico que se aplica en el proceso para la producción del vapor necesario (P4). En la siguiente figura se muestra la relación antes mencionada entre productos y tecnologías (Wheeler, Machín Ferrero, Jeger, Salas Tonello, & Mele, 2018).

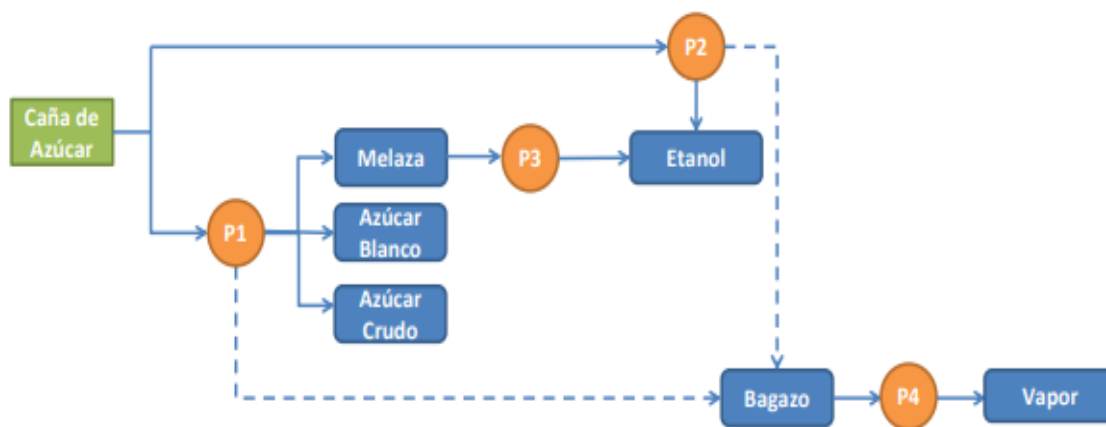


Figura 7: Diagrama de flujo de los materiales en la industria de la caña de azúcar. En la línea de trazo se muestra el bagazo.

Fuente: Wheeler, Machín Ferrero, Jeger, Salas Tonello, & Mele (2018).

Con respecto a la rentabilidad de la actividad, se ve afectada por variación de los rendimientos de la etapa agrícola. Cuando es elevada la cantidad de caña de azúcar, aumenta el stock de azúcar (el etanol es fijo) y por lo tanto el precio de este insumo disminuye, como consecuencia afectará las ganancias del conjunto (campo-industria). Cabe aclarar que el sector enfrenta una posible disminución de la demanda de azúcar. Por lo tanto esto requerirá un esfuerzo extra para manejar los recursos de manera eficiente, para lograr cumplir con las demandas del mercado y mantener la rentabilidad del sector.

Para realizar la actividad de la caña de azúcar se llevó a cabo la selección de ciertos procesos que logran responder al elevado valor de mercado. Estos procesos son los de producción de biobutanol, polihidroxibutirato, ácido cítrico y de cogeneración de electricidad por combustión de bagazo (Wheeler, Machín Ferrero, Jeger, Salas Tonello, & Mele, 2018):

- Polihidroxibutirato (PHB): Este producto es un termoplástico biodegradable y biocompatible, y presenta interés tanto económico como ambiental.
- Biobutanol: Este bioproducto es de gran interés para la industria química y también como combustible. Se obtiene a partir de la fermentación de sustratos azucarados y luego sometidos a un proceso de destilación de la mezcla obtenida (butanol, acetona, etanol, agua).
- Ácido cítrico: Es un insumo que presenta múltiples aplicaciones, sobre todo en la industria alimenticia. Una de las formas de obtenerlo es a partir de la fermentación de melazas o sustratos azucarados.
- Cogeneración: Puede definirse como un tipo de tecnología que se encarga de generar la producción simultánea de vapor y electricidad a partir de la quema del bagazo, al unirse a una instalación encargada de procesar caña de azúcar.

5.2 CARACTERÍSTICAS DE ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico, ácido 2-hidroxi-propanoico, se caracteriza por tener un carbono asimétrico, que da lugar a la actividad óptica. Se conocen dos isómeros ópticos, el D(-) láctico y el L(+) láctico y una forma racémica que está constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-). Respecto a la configuración L(+) se considera la forma metabolizada por el organismo humano. Todas las formas del ácido, ópticamente activas y racémicas se encuentran en estado líquido y son incoloras y solubles en agua. En cuanto al estado puro, son sólidos muy higroscópicos de punto de fusión bajo. Las dos formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y también pueden producir polímeros que presentan diferentes propiedades, teniendo en cuenta la composición (Serna-Cock & Rodríguez-de , 2005).

El ácido láctico es un ácido carboxílico que presenta gran potencial en el mercado, y puede utilizarse para producir ácido acrílico, polímeros biodegradables, ácido pirúvico, etc. Es importante tener en cuenta para la producción de ácido láctico ciertos factores como el pH, la temperatura, la concentración de nitrógeno (Triviño Pineda, Reyes, & Sánchez Ramírez, 2021).

El ácido láctico es de gran importancia en la industria farmacéutica como electrolito y fuente de minerales; en la industria cosmética como antimicrobiano y rejuvenecedor de la piel; además en la industria química se usa como neutralizante, solvente y agente limpiador y también en la industria alimentaria como acidulante por su suave sabor ácido, como conservantes en aceitunas y encurtidos y como antimicrobiano. Además, es usado en una gran variedad de alimentos procesados como caramelos, productos de panadería, sopas, lácteos, cerveza, jaleas, mermeladas, mayonesas y huevos procesados (García, Arrázola, & Durango, 2010). También se utiliza como agente saborizante, regulador de pH e inhibidor de bacterias residuales en el procesamiento de alimentos como dulces, panes, refrescos, cervezas y otros productos. También se considera un ingrediente importante en los alimentos fermentados, como es el caso del yogur, la mantequilla y los alimentos enlatados. Otra de las aplicaciones del ácido láctico es en la industria del curtido de pieles, también en procesos de decapado, en la industria textil se usa como mordiente (fijador) para el teñido, y tiene la capacidad de reemplazar al etilenglicol en anticongelante, esto produce mayor eficiencia y menor costo (Komesu, Wolf Maciel, Rocha de Oliveira, da Silva Martins, & Filho, 2017).

Se conocen dos formas ópticas activas, donde el ácido L(+) láctico es el más usado, ya que los humanos podemos metabolizar. Para purificar ácido L(+) láctico, se utilizan procesos de separación, concentración y secado, de las cuales el 85 % de la demanda se aplica en alimentos y el 15 % restante en la industria no alimentaria. Algunas aplicaciones que han surgido de ácido L(+) láctico, tales como monómeros o plásticos biodegradables, presentan un gran potencial de expansión en el mercado. Respecto a la producción biotecnológica de ácido láctico presenta ventajas como el bajo costo de los sustratos, bajas temperaturas de producción y también bajo consumo de energía (García, Arrázola, & Durango, 2010).

El ácido láctico se puede convertir en etanol, propilenglicol y polímeros acrílicos. Ácido láctico, sus derivados, sales y ésteres se utilizan como disolventes, emulsionantes y plastificantes. En la industria farmacéutica, el ácido láctico se utiliza en implantes, pastillas, diálisis, suturas quirúrgicas. En la industria cosmética, el ácido láctico se utiliza en la fabricación de productos de higiene y estética por sus efectos hidratantes,

antimicrobianos y de rejuvenecimiento de la piel. También se utiliza en productos de higiene bucal. Han sido desarrolladas nuevas aplicaciones para el ácido láctico, como la producción del polímero APL biodegradable y biocompatible disolventes y productos químicos oxigenados. En cuanto a la producción de polímeros representa la mayor parte de la demanda de ácido láctico (39 %). Respecto a las aplicaciones de polímeros, se elimina el agua del ácido láctico y luego se polimeriza para obtener el polímero termoplástico biodegradable, el APL. Se ha conocido una creciente demanda de derivados del APL para sustituir a los materiales plásticos convencionales, y también para su uso en materiales para dispositivos médicos. El ácido láctico L(+) genera un alto rendimiento de lactida, y también produce polímeros con un alto peso molecular, alto grado de cristalinidad y alta resistencia a la tracción. Una de las características principales de estos polímeros es que son transparentes, lo que es importante para las aplicaciones de envasado; presentan una larga vida útil ya que se degradan lentamente por hidrólisis (que puede mejorarse mediante el ajuste de la composición y el peso molecular); y presenta características similares a las de los polímeros obtenidos a partir de combustibles fósiles. Los polímeros de ácido láctico presentan una ventaja y es que pueden producirse a partir de carbohidratos renovables.

Aunque la demanda de APL ha aumentado en los últimos tiempos, su capacidad de producción actual, de 450 millones de kg al año, queda reducida por los 200,000 millones de kg de plásticos totales que se producen al año. Principalmente este volumen bajo de producción, se debe, costos de fabricación elevados. El costo de fabricación del ácido láctico, a escala industrial, es inferior a 0.8 dólares/kg, ya que el precio de venta del APL debe disminuir aproximadamente a la mitad de su precio actual de 2.2 dólares/kg para poder competir con los plásticos basados en combustibles fósiles.

También el ácido láctico se usa en la fabricación de disolventes verdes, que son ecológicos. Los derivados químicos del ácido láctico incluyen el glicol de propileno, el óxido de propileno, el ácido acrílico y los ésteres de acrilato. Sin embargo aunque existe una importante gama de aplicaciones, el uso del ácido láctico presenta una limitación por los costos finales de producción, relacionados a los procesos posteriores, responsables de

aproximadamente 30 % al 40 % de los costos totales de producción del ácido láctico (Komesu, Wolf Maciel, Rocha de Oliveira, da Silva Martins, & Filho, 2017).

Respecto a la producción biotecnológica se basa en la fermentación por bacterias u hongos de sustratos ricos en carbohidratos y presenta además la ventaja de formar enantiómeros D(-) o L(+) ópticamente activos. También en la producción biotecnológica se tiene en cuenta el tipo de microorganismo que se usa, como así también la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono y de nitrógeno, el modo de fermentación empleado, y la formación de subproductos. Cuando se lleva a cabo la producción por fermentación con bacterias deben ser preferentemente termófilas, además deben fermentar rápida y completamente sustratos baratos, agregando cantidades mínimas de nutrientes nitrogenados, como así también es necesario que crezcan en condiciones de bajos valores de pH, presentar poca producción de biomasa y una mínima cantidad de subproductos. Para la producción de ácido láctico las bacterias que pueden utilizarse son cocos y bacilos gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo, que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (Lb), *Canrobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Weissella*. La mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros presentan una tolerancia ácida, esto les da ventajas sobre otras bacterias; la temperatura óptima de crecimiento está en un rango de 20 a 45 °C. Las bacterias del ácido láctico presentan además complejos requerimientos nutricionales, ya que les resulta difícil sintetizar aminoácidos y vitamina B. En la producción de ácido láctico se usan mohos y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Zygomonas*, *Saccharomyces* y *Kluiveromyces*, en particular *R. oryzae* debido que presenta la ventaja de que no requiere fuente de nitrógeno orgánico para su crecimiento, puede producir grandes cantidades de L(+) ácido láctico a partir de almidón y puede separarse de manera sencilla del medio de fermentación en el proceso de recuperación y purificación. Los mohos presentan la dificultad de que su forma física cambia considerablemente durante la fermentación, y los micelios pueden ocasionar un aumento en la viscosidad del medio de fermentación, provocando un gran aumento en la demanda de oxígeno y resistencia a la transferencia de masa en el proceso fermentativo,

de esa forma aumentando los tiempos de fermentación e incrementando la demanda de oxígeno y resistencia a la transferencia de masa en el proceso fermentativo, lo que aumenta los subproductos formados, especialmente etanol, y disminuye los rendimientos.

Las variables que afectan la forma física del crecimiento del hongo son el pH del medio, la agitación, la aireación, el nivel de inóculo y la concentración de sustrato por lo tanto estas variables son las que deben ser manipuladas para disminuir la viscosidad en el medio de cultivo. En cuanto a la producción biotecnológica de ácido láctico, con bacterias u hongos, se suele utilizar como sustratos, sacarosa proveniente de azúcar de caña y remolacha azucarera, como así también lactosa proveniente de lactosuero y dextrosa procedente de almidón hidrolizado. Materiales celulósicos, licores sulfíticos, granos dañados y porciones comestibles de granos y tubérculos son ejemplos de materia prima alternativa para la producción de ácido láctico. Se pueden nombrar como ejemplo de sustrato no puros utilizados en la obtención de ácido láctico a: mazorcas de maíz, residuos de madera, melazas de caña y remolacha vinazas, fibras de alfalfa, almidón de yuca, paja de trigo y residuos de patata (Serna-Cock & Rodríguez-de Stouvenel, 2005).

Los residuos lignocelulósicos necesitan un pretratamiento para poder convertir la lignina y celulosa a azúcares reductores que luego son convertidos a ácidos carboxílicos. Los pretratamientos utilizados se pueden clasificar en (Mtui, 2009):

1. Pretratamiento mecánico: consiste en la reducción de tamaño de los desechos lignocelulósicos por debajo de un tamiz #20. Se usa este tamaño ya que ha demostrado dar los más altos rendimientos en la degradabilidad del material celulósico.
2. Pretratamiento físico: consiste en el tratamiento a elevadas temperaturas o con irradiación. El tratamiento del material celulósico sometido a temperaturas de hasta 1100 K bajo atmosferas inerte y oxidante, provoca la pérdida de humedad y la descomposición de hemicelulosa, celulosa y lignina. Irradiación con microondas de hasta 700 W con diferentes tiempos de exposición ocasiona la pérdida de peso debido a la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina y la presencia de álcali mejora la velocidad de degradación.
3. Pretratamiento fisicoquímico: Dentro de los tratamientos fisicoquímicos más conocidos se pueden nombrar: tratamientos termoquímicos tales como explosión por

vapor, agua caliente, explosión de fibra de amonio y explosión por CO₂. En estos procesos, la biomasa picada, se trata con vapor saturado de alta presión, amonio líquido o CO₂ y luego la presión se reduce rápidamente, produciendo una descompresión explosiva en el material. La explosión por vapor se inicia exponiendo el material a temperaturas entre 160 a 260 °C (la presión correspondiente es de 0.69-4.83 MPa) por algunos segundos hasta minutos antes de llevar el material a presión atmosférica. Los procesos producen degradación de la hemicelulosa, y transformación de la lignina.

El agregado de H₂SO₄ o CO₂ en el proceso de explosión por vapor puede mejorar la hidrólisis enzimática, disminuir la producción de compuestos inhibitorios y llevar a una licuefacción más completa de la hemicelulosa, glucan, xilan, manan, galactan, y arabinan. A partir de estos pretratamientos se logran eficiencias de digestión más elevadas durante la producción de monosacáridos, oligosacáridos ácido láctico. En el pretratamiento con agua caliente, se utiliza agua caliente presurizada a presiones menores de 5 MPa y a una temperatura entre 170 a 230 °C por algunos minutos, seguido de descompresión hasta presión atmosférica.

4. Pretratamiento químico: Fuertes agentes oxidantes tales como H₂O₂ y ozono remueven lignina de manera efectiva sin producir residuos tóxicos y las reacciones pueden llevarse a cabo a temperatura y presión atmosféricas. Se ha investigado como materia prima paja de arroz, residuos de madera de abetos, desechos de caña de azúcar, mazorcas de maíz, mandioca y maní. La hidrólisis enzimática y la sacarificación de estos desechos se ve altamente mejorada cuando estos pretratamientos se llevan a cabo a temperaturas entre 120 a 200 °C y las concentraciones de álcali están comprendidas entre 0.5 y 2 M. La hidrólisis de residuos lignocelulósicos también puede llevarse a cabo utilizando acidos diluidos o concentrados.
5. Pretratamiento biológico: En este tratamiento se usan microorganismos (hongos o bacterias) o enzimas para la degradación del material lignocelulósico (Mtui, 2009).

Rhizopus oryzae productor de ácido láctico

El hongo *R. oryzae* posee actividad enzimática amilolítica, lo que le permite convertir almidón directamente a L(+) ácido láctico. La fermentación fúngica tiene algunas ventajas con respecto a que el *R. oryzae* requiere solo un medio simple para producir L(+) ácido láctico, pero también requiere una aireación vigorosa porque el *R. oryzae* es un aerobio obligado. En las fermentaciones fúngicas, las bajas tasas de producción por debajo de 3 g/l.h se deben probablemente a bajas velocidades de reacción a causa de una transferencia de masa limitada. El bajo rendimiento en producto de la fermentación fúngica se atribuye parcialmente a la formación de subproductos, tales como ácido fumárico y etanol (Wee, Kim, & Ryu, 2006).

El reactor de tanque agitado ha sido uno de los reactores más utilizados en la fermentación fúngica, pero el hecho de que la morfología del hongo presenta cambios importantes durante el proceso fermentativo afectando el rendimiento de producción, hace que este reactor no sea una elección preferible. Se investigó el efecto de la aireación, pH, y contenido de CaCO₃ en la producción de ácido láctico a partir de glucosa por medio de fermentación fúngica (*R. oryzae*, ATCC52311) y pudieron deducir que una baja aireación del reactor condujo a la obtención de ácido láctico mientras que una alta aireación condujo a la formación de esporas. El pH no afectó la producción de ácido láctico mientras que el agregado de CaCO₃ aumentó la producción de este ácido significativamente (Dominguez & Vázquez, 1999).

5.3 PRODUCCION Y DEMANDA DE ACIDO LÁCTICO

El ácido láctico por lo general se vende en forma de solución al 88 %. El precio varía en función de la aplicación (por ejemplo, alimentos, productos farmacéuticos y APL). En 2011 se obtuvo información de un rango de entre 1.30 y 2.0 dólares/kg, actualmente se han alcanzado aproximadamente unos 3.0-4.0 dólares/kg. El precio del ácido láctico dependerá del precio de las materias primas de almidón y azúcar que se usarán en el proceso de fermentación (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell, & Maciel Filho, 2018).

Se obtuvo un requerimiento de 1.220 kilotoneladas de ácido láctico en 2016 por el mercado mundial. Considerando un crecimiento anual del 16.2%, se estima que esta demanda logre alcanzar las 1,960 kilotoneladas en 2025. Esto representaría 9,800 millones de dólares en el mercado mundial. Los estudios de mercado informaron que en este periodo el crecimiento más rápido y por lo tanto mayor, será el de los medicamentos y los perfumes América Latina y Asia. En América Latina el mercado de ácido láctico está experimentando un importante crecimiento (19.2% anual) esto se debe al crecimiento de la industria cosmética en Brasil y Argentina (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell, & Maciel Filho, 2018).

La demanda de APL, al igual que el ácido láctico, debería crecer hasta alcanzar los 6.500 millones de dólares en todo el mundo en 2025. Esto se debe a la tasa de crecimiento del mercado del APL en Asia-Pacífico, del 22.4 % anual, debido a la presencia de varias fábricas de alimentos y bebidas, así como de cosméticos, principalmente en India y China (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell, & Maciel Filho, 2018).

Según otra fuente (<http://www.wtva.com>) el mercado del ácido láctico representó 1,275 millones de dólares en 2014, y en el año 2022 se alcanzaron 4,129 millones de dólares. Esto se vio reflejado en un crecimiento anual del 16.9 % de 2015 a 2022. Se espera que alcance las 1,844 kilotoneladas en 2024, lo cual representaría un crecimiento anual del 12.9%. A partir de un estudio referido a los diferentes usos de los residuos alimentarios se pudo concluir que una biorrefinería que produce plastificante y ácido láctico sería económicamente viable, con beneficios anuales de unos 422,699 dólares.

Resumiendo, se puede decir, que desde los años 90 el ácido láctico ha ido ganando terreno en el mercado por su importante aplicación. Grandes empresas situadas en países desarrollados se han dedicado a su producción y uso en varias áreas industriales. Entre ellas, destacan las siguientes (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell, & Maciel Filho, 2018):

Corbion - Purac (Países Bajos)

En esta empresa se produce ácido láctico. Se encarga de suministrar a diferentes sectores, desde el alimentario, el químico, el de los plásticos (a base de APL), el

biomédico. Se produce L(+) ácido láctico y D(-) ácido láctico con elevada pureza para su uso en los sectores farmacéutico y del APL. La empresa se ha dedicado a trabajar en la producción de ácido láctico para obtener APL a partir de materias primas de segunda generación. Respecto al mercado de Corbion se divide en ventas netas: 74.2 % para suministros de panadería, el 23.4 % para productos bioquímicos y el 2.4 % para otros usos (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell,, & Maciel Filho, 2018).

Galactic (Bélgica)

Es una empresa, que opera desde hace más de 20 años, se considera como una de los líderes en biotecnología, principalmente en los mercados de la alimentación, los piensos, el cuidado personal y sanitario y la industria. Respecto a la fermentación del ácido láctico, uno de los objetivos es crear soluciones sostenibles, innovadoras y saludables en el entorno de la seguridad alimentaria, la nutrición y la química verde (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell,, & Maciel Filho, 2018).

NatureWorks LLC - Cargill (EEUU)

Esta empresa se considera uno de los líderes mundiales en el suministro de ácido láctico, utilizando el brad Ingeo™, en Nebraska, EE.UU, tiene la capacidad de producir 140,000 toneladas de biopolímero Ingeo™ para la elaboración de envases rígidos y flexibles, productos de alimentación, salud y cuidado personal, productos duraderos para el hogar y electrodomésticos (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell,, & Maciel Filho, 2018).

Otros

ADM; B&G; BASF; Cellulac; Danimer Scientific; Direvo Industrial Biotechnology; Dow; ESUN; Futerro; Henan Jindan Lactic Acid Technology; Hisun Biomaterials; Jiuding Biological Engineering; Myriant; Musashino Chemical; Piaoan; Nantong Jiuding Biological Engineering; Pyramid Bioplastics; Shenzhen BrightChina Industrial; SynbraTechnology; Teijin; ThyssenKrupp Industrial Solutions; Tongjieliang; Uhde Inventa-Fischer; Yangtzelabre; Zhejiang Hisun Chemical son algunas de las empresas más conocidas con actividades en la producción de ácido láctico. Musashino

Chemical Laboratory, Ltd. en Japón se considera un gran productor de ácido láctico sintético, que produce un total de 7,000 toneladas al año, lo que puede verse reflejado en un 2 % de la producción mundial de ácido láctico (Alves de Oliveira, Komesu, Vaz Rossell, & Maciel Filho, 2018).

5.4 PRODUCCION BIOTECNOLOGICA DE ÁCIDO LÁCTICO

Respecto a la producción biotecnológica del ácido láctico, ésta genera gran importancia debido a los beneficios ambientales y al uso de recursos renovables.

Se llevaron a cabo investigaciones y en la mayoría se usaron bacterias ácido lácticas (BAL) y hongos filamentosos del género *Rhizopus*. El uso de los hongos presenta ciertas ventajas debido a las características amilolíticas y además a los bajos requerimientos en nutrientes. Existen varias formas en las que los hongos pueden crecer, estas son; micelio individual, granular, en flóculos en pellets esféricos.

Se estudió que cuando la morfología de *R. arrhizus* cambió de filamentosa a pellets, luego de 152 h disminuyó la productividad del ácido láctico de 75.3 % a 62.6 %. En un cultivo de *R. oryzae* se mejoró la producción de ácido láctico al ser inducido a la forma micelial. Respecto a la fermentación fúngica presenta la ventaja de requerir un medio simple para producir ácido láctico, pero además tiene grandes requerimientos de aireación.

Algunas de las características de las bacterias ácido lácticas es que son gram positivas, microaerofílicas y catalasa negativas. Como producto principal de la fermentación de los azúcares producen ácido láctico y pueden ser homofermentativos o heterofermentativos según la cantidad de ácido. Pueden encontrarse bacterias homofermentativas obligadas y facultativas; que dan lugar al ácido láctico como producto principal de la fermentación. Se pueden mencionar en este grupo: *Lb. caucasicus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* y *Lb. delbrueckii*. La mayoría de las especies que pertenecen a estos géneros presentan elevada tolerancia a pH menor a 5; en cuanto a la temperatura de crecimiento ésta en un rango de 20 °C a 40 °C. Se destacan por ser microorganismos de crecimiento rápido, metabolismo simple y relevancia industrial.

La mayoría de los *Lactobacillus* producen solamente una forma isomérica de ácido láctico; sin embargo, las formas isoméricas de lactato deshidrogenasa que se encuentran presentes en *Lactobacillus* producen el isómero de ácido láctico, debido a que la deshidrogenasa láctica es esteroespecífica; en cuanto a las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus* se encargan de producir únicamente isómeros D(-). Estudios afirmaron que algunos *Lactobacillus* producen formas racémicas donde el isómero que predomina depende de las variaciones en la aireación, el tipo de fermentación, la cantidad de NaCl, el incremento de pH y la concentración de sustrato. Las especies del género *Lactobacillus* producen una mezcla racémica que incluye ambos isómeros, además de las formas isoméricas L(+) y D(-), ya nombradas.

Las homofermentativas por lo general metabolizan la glucosa por la vía Embden Meyerhof, obteniendo como resultado dos moléculas de ácido láctico de cada molécula de glucosa. Cabe aclarar que solamente las bacterias ácido lácticas homofermentativas se encuentran disponibles para la producción comercial de ácido láctico. Respecto a la elección de un microorganismo, esto depende del carbohidrato a ser fermentado: *Lactobacillus delbreuckii ssp. delbreuckii* fermentan la sacarosa; *Lactobacillus delbreuckii ssp. bulgaricus* fermentan la lactosa; *Lactobacillus helveticus* puede fermentar lactosa y galactosa; *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovirus* fermentan almidón; *Lactobacillus lactis* tienen capacidad de fermentar glucosa, sacarosa y galactosa (García, Arrázola, & Durango, 2010).

Respecto a la síntesis de ácido láctico, puede llevarse a cabo tanto por rutas químicas como por rutas biotecnológicas. La materia prima que se utiliza en las rutas químicas puede ser biomasa o acetaldehído proveniente del petróleo. La síntesis a partir de fuentes no renovables se caracteriza por realizar la reacción en fase acuosa y alta presión, además requiriendo el uso de cianuro de hidrógeno, ácido sulfúrico y metanol. La síntesis a partir de biomasa aplica principalmente tecnologías de conversión hidrotermal en condiciones alcalinas. Ambas rutas de síntesis producen una mezcla racémica de D/L ácido láctico.

Las rutas biotecnológicas usan biomasa como materia prima en la de síntesis de ácido láctico y además la conversión en ácido láctico se lleva a cabo por microorganismos mediante el proceso de fermentación. De acuerdo al tipo de biomasa, se requiere por un lado un pretratamiento y también sacarificación previa a la fermentación. Usando microorganismos específicos y aplicando las condiciones adecuadas de fermentación, se puede obtener ácido láctico D(-) o L(+) ópticamente puro. En la figura 8 se nombran los principales sectores demandantes de ácido láctico. En el caso de los sectores de alimentos y bebidas y cuidado personal utilizan el isómero L ya que el isómero D(-) puede resultar tóxico para el ser humano. En cuanto al sector de los polímeros, éste utiliza isómero D(-) o L(+) debido a que los plásticos que se construyen a partir de isómeros puros tienen propiedades superiores a los elaborados a partir de mezcla racémica. Respecto al sector de solventes y otros usos industriales, éste utiliza principalmente la mezcla racémica de ácido láctico debido a que no es tan importante la quiralidad en este tipo de aplicaciones (Vuan Lanusse, 2018).

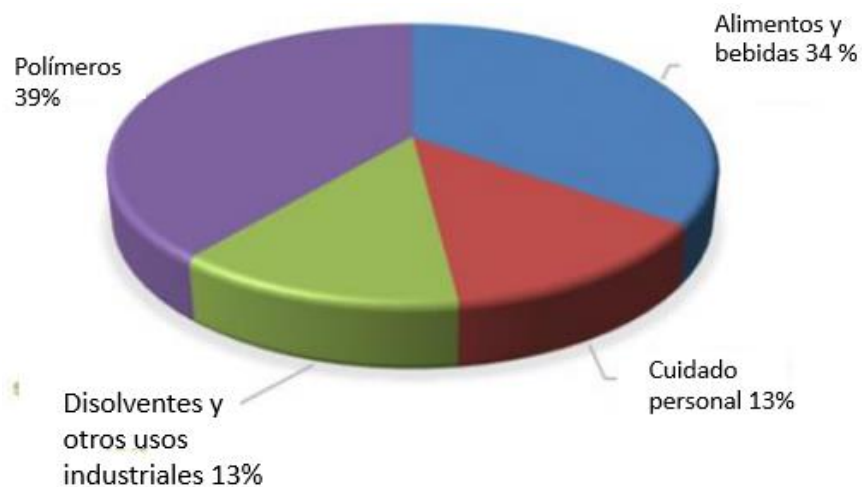


Figura 8: Principales sectores demandantes de ácido láctico.

Fuente: Adaptado de Vuan Lanusse (2018).

Se logra la purificación de ácido láctico, a partir de la adición de ácido sulfúrico al medio de fermentación, esto genera un gran volumen de desechos de sales de sulfato de calcio. Se plantea la producción combinada del ácido y sus derivados desarrollando los siguientes pasos: fermentación, purificación primaria, purificación secundaria y también las diferentes tecnologías de polimerización o conversión química. Respecto al proceso

de purificación primaria, este se lleva a cabo a partir de tecnologías avanzadas de desalinización y electrodiálisis para lograr obtener ácido láctico puro de manera eficiente y económica, sin obtener residuos de sales. Se obtuvo como resultado un proceso de fermentación eficiente y productos de oligómeros y polímeros del ácido láctico. El proceso de purificación secundaria y de productos lactato-derivados pueden expandir de manera potencial el mercado del ácido láctico y se usa mucho en actividades de transferencia de tecnologías para comercializar el proceso y los productos (Munilla & Carracedo, 2005).

Materias Primas para la producción biotecnológica de ácido láctico

Para que las bacterias crezcan en un medio de cultivo (mezcla de nutrientes que permiten el crecimiento de los microorganismos) deben reunir una serie de condiciones como la temperatura, la presión de oxígeno apta para crecer en el medio de cultivo y el grado de humedad, así, como también un grado de acidez o alcalinidad adecuado. Diferentes sustratos han sido usados para la producción fermentativa de ácido láctico con *Lactobacillus*; a partir de esto, usando un medio simple se obtiene un producto más puro, por lo tanto resultan menores costos de purificación.

Las materias primas usadas en la producción biotecnológica de ácido láctico deben presentar las siguientes características: baratas, poco contaminantes, elevada producción, alto rendimiento, subproductos formados, capacidad para ser fermentado con poco o ningún pre-tratamiento y disponibilidad durante todo el año. Para la producción económica del ácido láctico, han sido usadas materias primas baratas, como los materiales celulósicos, los amiláceos, el lactosuero y la melaza. Dentro de los materiales amiláceos (que son fuente de polisacáridos, principalmente almidón) se pueden nombrar el sorgo (4.08 % almidón), la paja de trigo (54 % almidón), el maíz, la yuca (27 % almidón), la papa, el arroz y la cebada. Cabe aclarar que estos materiales deben ser hidrolizados hasta azúcares fermentables previo al proceso ya que están formados por enlaces de glucosa $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$, aunque puede realizarse en simultáneo con la fermentación (García, Arrázola, & Durango, 2010).

Respecto a los materiales lignocelulósicos, estos consisten en celulosa, hemicelulosa y lignina. Es decir, se pueden nombrar como materiales lignocelulósicos con gran potencial como materia prima, el sarmiento de vid, hojas y jugo de caña de azúcar, Salvado de trigo, la paja de arroz, el salvado de arroz, los granos agotados de cervecería, son otros materiales importantes que sirven como materia prima (García, Arrázola, & Durango, 2010).

Un subproducto muy importante de la industria láctea, es el lactosuero, que está compuesto por lactosa, proteína, grasa, minerales, vitaminas, y ácido láctico. Existen dos tipos de suero, el dulce y el ácido que son usados en la producción de ácido láctico. Además, para la producción de ácido láctico también se usan desechos orgánicos derivados del procesamiento de alimentos como los residuos del procesamiento de zanahoria, bagazo, almidón y desechos de alimentos, desechos de manzana, desechos de piña, entre otros (García, Arrázola, & Durango, 2010).

Fermentación ácido láctica

La fermentación ácido láctica es el proceso de fermentación donde el producto final es el ácido láctico, y es llevado a cabo por las BAL, hongos, protozoos y en tejidos animales (García González, 2019).

Se han realizado estudios e investigaciones para la obtención de ácido láctico a partir de materias residuales y luego su transformación en productos químicos intermedios, disolventes, plastificantes y resinas. Los microorganismos que producen ácido láctico en general, pertenecen al género *Lactobacillus*. Se conocen dos clases de bacterias, las homofermentativas, que producen ácido láctico, en su mayor totalidad y las heterofermentativas, que son encargadas de producir subproductos. En la industria se utilizan las homofermentativas. Es posible además emplear cepas de hongos como *Rhizopus* que producen L(+) ácido láctico (Munilla & Carracedo, 2005).

Es importante aclarar que el ácido láctico obtenido por fermentación en estado sólido (FES), es un proceso que se define como el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en material sólido húmedo, que presenta ausencia de flujo de agua, esto lleva a la reducción de efluentes y por lo tanto disminuye la contaminación. Es

decir, es un proceso simple en el que se usan volúmenes pequeños y elevadas concentraciones de productos y, además, presenta fácil aireación (García, Arrázola, & Durango, 2010).

Se usan materiales como soporte, entre ellos se encuentran el salvado de trigo, paja de arroz, etc. Respecto a las cepas bacterianas que se usan, se pueden nombrar las siguientes: *Enterococcus faecalis* RKY1, *Lactobacillus amylophilus* GV6, *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542, *Lactobacillus delbrueckii*. En cuanto a los hongos filamentosos se usaron especies *Rhizopus arrhizus* 36017 y *Rhizopus oryzae* 2062 con rendimientos de $Y = 0.85-0.2$ g/g asociados con 1.5–3 g/l de biomasa micótica producidos entre las 36 y 48 h de fermentación. Se realizaron estudios comparativos de la cepa *R. oryzae* para evaluar la producción de ácido láctico en fermentación sumergida (FS) y FES, con lo cual se obtuvieron resultados y se demostró que la FES tuvo un nivel de producción mayor y los rendimientos fueron los siguientes: 93.8 y 137.0 g/l en FS y FES, respectivamente (García, Arrázola, & Durango, 2010).

Además, se han llevado a cabo investigaciones para la producción de ácido láctico de alta calidad con materias primas económicas como pueden ser las tusas de maíz, que pueden ser usadas en la producción de APL, que además requiere de un ácido láctico ópticamente puro. Se tiene en cuenta que la fabricación del ácido láctico por fermentación de carbohidratos puede producir el estereoisómero eficiente y deseado, independientemente del proceso químico que se llevó a cabo, pero cabe aclarar que el proceso de fermentación debe ser competitivo con el de síntesis química (Munilla & Carracedo, 2005).

5.5 RHIZOPUS ORYZAE COMO PRODUCTOR DE ÁCIDO LÁCTICO

Es necesario que en el proceso de fabricación de ácido láctico los microorganismos fermenten rápida y completamente sustratos de bajo costo, con la mínima adición de nutrientes nitrogenados y elevada estereoespecificidad, con valores reducidos de pH y elevadas temperaturas, que se obtenga poca biomasa y como así también cantidad despreciable de subproductos. Se obtiene ácido láctico por fermentación a partir de un

proceso de glicólisis: degradación de los carbohidratos y también por síntesis (Munilla & Carracedo, 2005).

Respecto a los sustratos que se emplean comercialmente, pueden ser los que se nombran a continuación; sacarosa del azúcar de caña y remolacha azucarera, suero de queso conteniendo lactosa y maltosa y dextrosa de almidón hidrolizado. La sacarosa refinada y la dextrosa son los más utilizados.

Dependiendo al ácido que producen las cepas de *Rhizopus* pueden dividirse en dos tipos, las cepas del tipo I, producen ácido L láctico, a su vez estos contienen los genes de dos lactato deshidrogenasa dependientes de NAD (LDHA y LDHB). Las cepas del tipo II producen ácido fumárico y L(+) ácido málico, y contienen a su vez el gen de la enzima LDHB. Con la cepa *R. oryzae* (tipo I) se han llevado a cabo numerosos estudios para la producción industrial de L(+) ácido láctico, ya que tiene grandes capacidades amilolíticas, xilanolíticas, pectinolíticas y celulosíticas, que son capaces de realizar la conversión de residuos poliméricos de la agricultura. Las células de hongos tienen la propiedad de presentar mayor resistencia osmótica a la acumulación de ácido láctico y además sobreviven a temperaturas de hasta 44 °C. En cuanto a la producción de ácido láctico por *R. oryzae* según estudios se ha demostrado ser sensible a la temperatura, en donde la temperatura óptima de producción varía en el rango de 27-35 °C (Munilla & Carracedo, 2005).

El *Rhizopus* es un organismo que se usa ampliamente, ya que se obtiene un producto final de calidad superior, produciendo ácido láctico en la forma química, que es la más conveniente para la fabricación de APL. Se ha estudiado la modificación genética del *R. Oryzae* para la mejora del rendimiento de la fermentación. El hongo *R. oryzae* puede llegar a producir altas cantidades de ácido láctico con la fermentación de glucosa. Se obtienen rendimientos con valores entre 60 - 80 %. Según estudios aproximadamente la mitad del ácido láctico producida en el mundo anualmente es por fermentación de la glucosa proveniente del almidón de maíz (Munilla & Carracedo, 2005).

También se debe destacar que las células de *Rhizopus* presentan menores requerimientos nutricionales que las bacterias ácido lácticas, pero debido a que son microorganismos aerobios, se requiere aireación. Esta última característica puede

considerarse una desventaja ya que el proceso industrial podría verse limitado por la transferencia de oxígeno afectando la pureza del ácido láctico, ya que se generan subproductos como etanol. *R. oryzae* produce etanol a partir de la conversión de piruvato en acetaldehído y dióxido de carbono a través de una enzima llamada piruvato descarboxilasa (PDC), luego se produce la oxidación de acetaldehído a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Meussen, Graaff, Sanders , & Weusthuis, 2012). En la figura 9 se describen las principales rutas de fermentación de *R. Oryzae* usando glucosa como fuente de carbono:

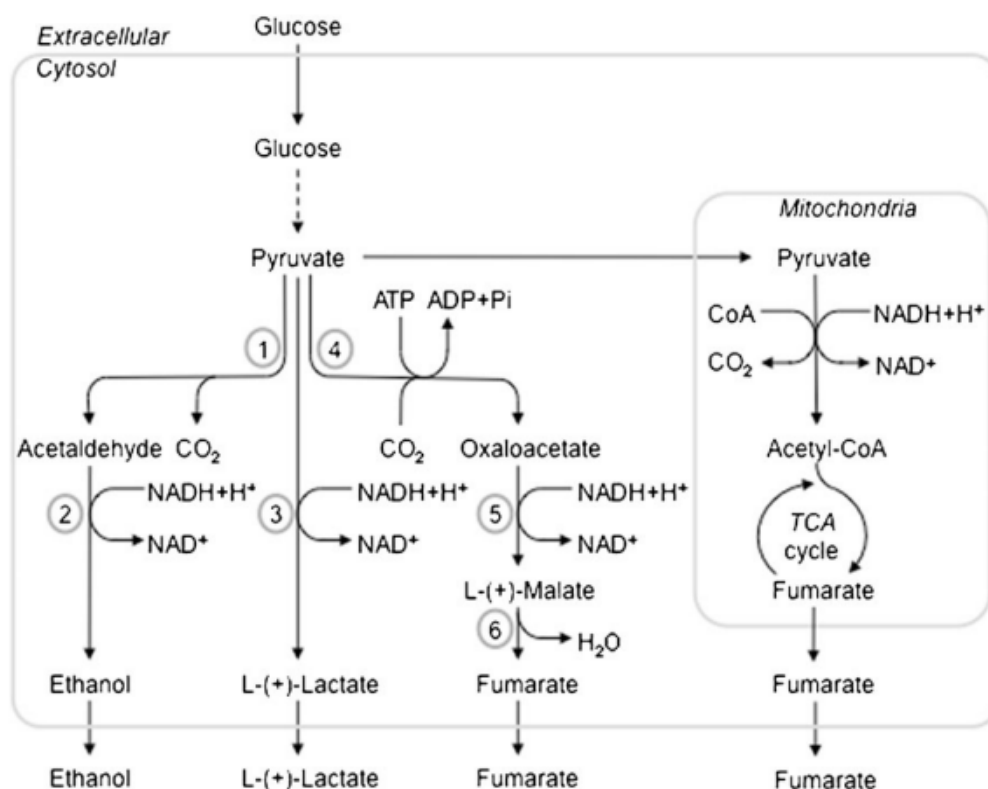


Figura 9: Descripción simplificada de las principales rutas de fermentación de *R. oryzae* con glucosa como fuente de carbono. Los números indican las enzimas clave de la vía: 1- Piruvato descarboxilasa (PDC); 2- Alcohol deshidrogenasa (ADH); 3- Lactato deshidrogenasa (LDH); 4- Piruvato carboxilasa (PYC); 5- Malato deshidrogenasa (MDH); 6- Fumarasa (FUM).

Fuente: Meussen, Graaff, Sanders , & Weusthuis (2012).

Según estudios pudo comprobarse que la transferencia de oxígeno se puede mejorar llevando a cabo un control de la morfología de crecimiento del hongo. Se han llevado a cabo distintas técnicas de inmovilización previas al proceso de fermentación,

para lograr ese control de la morfología. Pero, mediante la inmovilización también se ha detectado producción de etanol, aunque en cantidades menores. A partir de esto se pudo llegar a la conclusión que el etanol se genera debido al crecimiento celular y a partir de esto se puede decir que la pureza del ácido láctico y el proceso de purificación se ven afectados de forma negativa. Es importante tener en cuenta que el *R. oryzae* presenta un rango de pH entre 4 y 9, pero el pH óptimo de crecimiento y producción de ácido láctico es de 6.5. Sin embargo, pH superior a 4 presenta dificultad y costos al proceso de purificación. Se puede decir que este organismo, con cierto suministro de oxígeno, transforma la glucosa en piruvato, donde este último ingresa al ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT), generando ATP y NADH (mostrado en la figura anterior). Respecto a la energía y los cofactores generados en CAT, estos se encargan de facilitar la conversión de piruvato a ácido láctico a partir de las enzimas lactato deshidrogenasas. El proceso de fermentación con *R. oryzae* en determinadas condiciones, a diferencia de las bacterias ácido lácticas homofermentativas, da como resultado cuatro productos principales y de gran uso; ácido L láctico, biomasa celular, ácido fumárico y etanol (Vuan Lanusse, 2018).

Además, *Rhizopus oryzae* utiliza la xilosa a través del azúcar pentosa fosfato (hexosa monofosfato [HMP]). Un compuesto intermedio obtenido de la vía de la HMP es también el piruvato. Con elevada concentración de oxígeno en presencia de glucosa y de una alta concentración de oxígeno disuelto, el piruvato se convierte en lactato mediante un NAD^+ dependiente de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Se informó de que había tres enzimas LDH responsables de la reducción de piruvato a lactato y de la oxidación del lactato a piruvato. Estas tres enzimas fueron determinadas bajo diferentes condiciones de cultivo. Por otro lado, el metabolismo del piruvato en *R. oryzae* también implica el CAT que se lleva a cabo en la mitocondria y la vía citosólica separada para la formación de ácido fumárico, además se observa la presencia de las siguientes enzimas: piruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa y fumarasa. Se puede decir que las pentosas, incluida la xilosa, son metabolizadas a través de la vía HMP para obtener los nucleótidos y aminoácidos para llevar a cabo la síntesis de la biomasa celular (Yang, Enshay, & Thongchul, 2013).

Entonces se puede decir que además del almidón, la xilosa es el sustrato más abundante en la biomasa vegetal. Sin embargo, ha sido limitada la conversión de la xilosa en productos químicos, ya que los microorganismos tienen preferencia por la glucosa como fuente de carbono y energía. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se destaca que *R. oryzae* muestra preferencia por la glucosa en la fermentación del ácido láctico. En la fermentación de la mezcla de glucosa/xilosa, la glucosa era consumida fácilmente, mientras que, en el caso de la xilosa, esta se metabolizaba lentamente. Esto ocurrió ya que la glucosa y la xilosa fueron metabolizadas por diferentes rutas metabólicas. Respecto al catabolismo de la xilosa por *R. oryzae*, el primer paso es su conversión en xilulosa a través de la vía oxido-reductiva. Es decir, la xilosa se reduce primero a xilitol en presencia de la xilosa reductasa ligada a NAD(P), que luego es reoxidada por la xilitol deshidrogenasa para dar xilulosa. Luego, los pasos posteriores a la formación de xilulosa fosfato podrían llevarse a cabo a partir de una combinación de las vías HMP y EMP para producir el piruvato, mientras que solo la vía EMP se usa en el catabolismo de la glucosa. Se puede concluir que las vías metabólicas de la xilosa (pentosa) son más complicadas que las de la glucosa (hexosa). Esto podría explicarse debido a la lenta conversión de la xilosa, comparada con la glucosa (Yang, Enshay, & Thongchul, 2013).

El género *Rhizopus* incluye varias especies que son utilizadas industrialmente para la producción de enzimas (glucoamilasas, celulasas, tannasas), ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido fumárico), así como para la producción de alimentos tradicionales. *Rhizopus oryzae* se emplea industrialmente por su capacidad de consumir una gran variedad de fuentes de carbono (Londoño-Hernández, y otros, 2017).

Taxonomía

El filo *Zygomycota* es una división de los hongos que incluye alrededor de 1000 especies, se divide en dos clases, *Zygomycetes* y *Trichomycetes*. Los *Zygomycetes* abarcan una diversidad ecológica de clases de hongos, incluyendo saprobios y patógenos de plantas, patógenos de animales (sin incluir a los humanos) y otros hongos. El género *Rhizopus* se clasifica de la siguiente manera: Filo: *Zygomycota*, clase: *Zygomycete*, orden: *Mucorales*, familia: *Mucoraceae*, género: *Rhizopus*. Este género incluye *Rhizopus*

oligosporus, Rhizopus arrhizus, Rhizopus circinans, Rhizopus delemar, Rhizopus oryzae, Rhizopus microspores y Rhizopus stolonifer.

R. oryzae ha sido aislado de varios sustratos como por ejemplo una gran variedad de suelos, vegetales en descomposición, frutas, verduras y semillas. Debido a su rápido crecimiento, se lo conoce como colonizador primario o secundario, por invasión rápida de sustratos digeribles (es decir, sustratos ricos en azúcares simples) (Londoño-Hernández, y otros, 2017).

Necesidades nutricionales

R. oryzae utiliza principalmente glucosa como fuente de carbono y urea como fuente de nitrógeno. Aunque también se ha demostrado que *R. oryzae* puede utilizar otras fuentes de carbono, por ejemplo xilano para la producción de xilanasas, celulosa para la producción de celulasas, xilosa, glucosa y sacarosa para la producción de ácido láctico y manosa, galactosa, manitol, etanol, pectina de cítricos, goma guar, fructosa e inulina para la producción de varios productos. Ciertos estudios indicaron que las pentosas no son preferidas por este hongo como fuente de energía, ya que esta cepa fúngica prefiere las hexosas para procesos metabólicos (Londoño-Hernández, y otros, 2017).

Se han evaluado diferentes fuentes orgánicas como fuente de nitrógeno para el crecimiento microbiano, entre ellas el extracto de levadura, la triptona y proteínas, y fuentes inorgánicas como el sulfato de amonio, nitrato de potasio y nitrato de sodio. Aunque *R. oryzae* tiene preferencia por las fuentes de nitrógeno orgánico (Londoño-Hernández, y otros, 2017).

Se ha demostrado que *R. oryzae* crece a temperaturas de 7 °C a 45 °C, con el óptimo cerca de 37 °C. Su a_w mínima para el crecimiento es de 0.88. Además, puede crecer a pH entre 4 y 9 (Londoño-Hernández, y otros, 2017).

Uso industrial de R. Oryzae

La fermentación en estado sólido de materiales vegetales se considera una opción para producir alimentos de alta calidad. La fermentación de alimentos por hongos de sustratos de origen vegetal puede clasificarse en las siguientes categorías

- Fermentación en la que se lleva a cabo la proteólisis de los polímeros del sustrato por enzimas fúngicas, seguido de una fermentación sumergida (por ejemplo: salsa de soja o miso). En este tipo de procesos se suelen emplear especies de *Aspergillus*.
- Fermentación que produce sustitutos cárnicos texturizados a partir de sustratos como cereales o legumbres utilizando micelio para unir partículas (por ejemplo: tempeh, oncom). Las especies de *Rhizopus* se emplean por lo general en este tipo de procesos.

La fermentación también se utiliza para la producción de ácidos orgánicos. *R. oryzae* es un importante microorganismo para producir ácidos orgánicos. Las cepas de *R. oryzae* se dividen en dos grupos: productores de ácido láctico o productores de ácido fumárico. Sin embargo, las cantidades de ácido producidas dependen de las condiciones de fermentación.

- Ácido láctico: es un producto utilizado como materia prima para la producción de polímeros biodegradables, disolventes ecológicos y productos químicos oxigenados debido a sus propiedades químicas. El ácido láctico puede producirse por síntesis química o por fermentación microbiana; sin embargo el ácido láctico L(+) o D(-) ópticamente puro sólo puede obtenerse mediante un proceso biotecnológico de fermentación con los microorganismos adecuados. Las fermentaciones con cepas de *Rhizopus* se prefieren a los sistemas de bacterias como *Lactobacillus spp*, debido a los requisitos nutricionales. Además, *Rhizopus* sólo sintetiza ácido láctico L(+) mientras que *Lactobacillus spp*. suele producir una mezcla de isómeros. Debido a que *R. oryzae* produce ácido láctico L(+) en medio con condiciones mínimas empleando diferentes fuentes de carbono, esto reduce el costo del proceso de fermentación y facilita las operaciones posteriores para la recuperación del producto. La cepa *R. oryzae IFO 4707* produjo el mayor contenido de ácido láctico L(+) (10 mg/g de materia fresca). En particular, *R. oryzae* requiere una alta transferencia de oxígeno para la producción de ácido.

Se estudió la producción de compuestos volátiles por *R. oryzae ATCC 34612* en diferentes sustratos (yuca, bagazo, orujo de manzana, soja y amaranto). Los compuestos detectados en las diferentes fermentaciones fueron acetaldehído etanol, 1-propanol, acetato de etilo, propionato de etilo y 3-metil butanol. Para mejorar las propiedades

organolépticas de los sustratos sólidos agrícolas, a través de la síntesis de compuestos volátiles, se usaron diferentes cepas de *R. oryzae*, *R. oryzae* ATCC 34612, *R. oryzae* NRRL 395, *R. oryzae* MUCL 28627 y *Rhizopus sp.* NRRL 25975 y diferentes sustratos como yuca, residuos de manzana, soja y amaranto. La producción de estos compuestos está relacionada con la composición de los residuos agrícolas y las condiciones de fermentación, como la aireación, la temperatura y el tiempo de fermentación (72-180 horas).

Cabe destacar también la producción de enzimas por *R. oryzae*. La mayoría se centran en la producción de amilasas, lipasas, celulasas, proteasas y tanasas, todas ellas clasificadas como hidrolasas. Las enzimas producidas por *R. oryzae* son termoestables y pueden funcionar en un amplio rango de pH (Londoño-Hernández, y otros, 2017).

5.6 PROCESO DE OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A ESCALA INDUSTRIAL

El ácido láctico es usado en una gran variedad de transformaciones químicas y productos. En todo el mundo se utiliza para aplicaciones en las industrias alimentarias, farmacéutica, textil, cosmética e industrias químicas.

Se conocen dos procesos utilizados en la producción de ácido láctico: la síntesis química y la fermentación de carbohidratos. La síntesis química produce únicamente una mezcla racémica de ácido láctico utilizando acetaldehído como compuesto inicial. Es preferible la fermentación para la producción de ácido láctico, ya que, en la fermentación, los sustratos para la obtención de ácido láctico son renovables y se utilizan materias primas económicas, como materiales amiláceos, la caña de azúcar, el suero de leche, glicerol y microalgas. Cellulac, Purac y NatureWorks están investigando formas donde se puede utilizar biomasa lignocelulósica como fuente de carbohidratos para la obtención de ácido láctico (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

Son necesarios varios pasos de purificación luego de la fermentación para obtener el producto final de ácido láctico. Las etapas de separación y purificación final requieren un costo de producción de hasta el 50 %. Además del alto costo de estas etapas, resulta complejo obtener ácido láctico de alta pureza, debido a la gran afinidad que tiene con el

agua, la descomposición a temperaturas elevadas y el proceso de recuperación que necesita de energía (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

Existen varios métodos para la recuperación de ácido láctico, como la precipitación, la destilación, la extracción con disolventes adsorción y procesos de separación por membranas (ósmosis inversa, electrodiálisis y ultrafiltración), etc. Además, existen inconvenientes para su aplicación industrial, algunos de éstos pueden ser, el alto costo de los equipos, la recuperación de disolventes y el elevado consumo de energía. Los procesos que actualmente se usan para la recuperación del ácido láctico son la precipitación, la extracción con disolventes y las separaciones con membranas. En la Tabla 4 se nombran los distintos métodos que se usan para la separación y recuperación del ácido láctico del caldo de fermentación (Komesu, Maciel, & Filho, 2017):

Tabla 4: Ventajas y desventajas de los procesos de separación de ácido láctico.

Proceso de separación	Ventajas	Desventajas
Precipitación	<ul style="list-style-type: none"> -Se aplica fácilmente en plantas industriales - Funcionamiento sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto consumo de ácido sulfúrico - Generación de yeso, esto requiere eliminación en vertedero - Baja pureza del producto
Extracción Líquido-Líquido	<ul style="list-style-type: none"> -No se genera yeso -Disminución del riesgo de descomposición térmica 	<ul style="list-style-type: none"> - El extractor debe ser regenerado por destilación o retroextracción - El producto con baja pureza - Los agentes de extracción presentan coeficientes de distribución desfavorables
Separación con Membranas	<ul style="list-style-type: none"> -Gran flexibilidad en la escala de producción - Alta selectividad -Altos niveles de purificación -Usa fermentadores convencionales, disminuyendo el costo de inversión en equipos 	<ul style="list-style-type: none"> -Alto costo de las membranas -Ensuciamiento de la membrana - Problemas de polarización - Dificultad de ampliación
Destilación Molecular	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce el riesgo de descomposición térmica - Altos niveles de purificación - No se usan disolventes - No se necesita más purificación 	<ul style="list-style-type: none"> -Difícil de ampliar - Requiere condiciones de alto vacío

Destilación con Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> - Integración y separación de la reacción en el mismo aparato - Elevados niveles de purificación - Menor consumo de energía 	<ul style="list-style-type: none"> -El proceso es complejo - Se aplica a las reacciones químicas reversibles en fase líquida - Las aplicaciones se limitan a sistemas donde las velocidades de reacción son elevadas y no hay variación de temperaturas para la reacción y la separación - Problemas de corrosión y separación debido al uso de un catalizador homogéneo
---------------------------	---	--

Fuente: Komesu, Maciel, & Filho (2017).

Neutralización y Precipitación de la sal con ácido

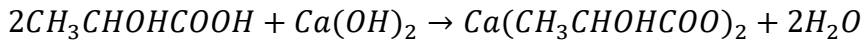
La separación, por precipitación es el proceso de purificación más usado en la producción de ácido láctico por fermentación. Se comienza añadiendo un exceso de carbonato de calcio o hidróxido de calcio al fermentador para lograr neutralizar el ácido producido, manteniendo el pH de 5 a 6, y produciendo una sal de calcio, el lactato de calcio. La neutralización se lleva a cabo porque las altas concentraciones de ácido láctico y el pH reducido tienen efectos inhibidores en el metabolismo celular debido a la alta forma protonada que presenta el ácido láctico. En el proceso, el caldo de fermentación es tratado con ácido sulfúrico para luego poder precipitar el sulfato de calcio o yeso, que luego se filtra. En cuanto al filtrado que contiene ácido orgánico libre se evapora y así poder obtener ácido láctico puro. A continuación, se muestran las reacciones químicas que intervienen: (Komesu, Maciel, & Filho, 2017)

*Producción de ácido láctico



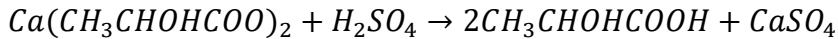
Glucosa → *Ácido láctico*

*Neutralización



Ácido láctico + hidróxido de calcio → lactato de calcio + agua

*Acidificación



Lactato de calcio + ácido sulfúrico → ácido láctico + sulfato de calcio

Como el objetivo es obtener un producto de pureza elevada, el ácido láctico debe esterificarse con metanol o etanol, y el éster luego se recupera por destilación, se hidroliza con agua, se evapora y el alcohol será reciclado. Una de las formas de obtener ácido láctico puro es mediante la conversión del lactato de calcio en lactato de zinc usando sulfato o carbonato de zinc, y el lactato de zinc se recristaliza y luego es disuelto en agua. Posteriormente, el zinc precipita como sulfuro de zinc usando una solución de sulfuro de hidrógeno. La solución de ácido láctico es sometida a un proceso de clarificación con carbón, se filtra y se evapora al vacío. Para esta operación la sal de zinc es la más usada y apropiada debido a que cristaliza mejor que cualquier otro lactato.

A partir de ciertos estudios e investigaciones se desarrollaron mejoras en el proceso, es decir estudiaron los efectos de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH y NaOH como neutralizadores para lograr la recuperación eficiente del ácido láctico. El estudio demostró que se usa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como agente neutralizador en la fermentación de arroz partido utilizando *Lactobacillus delbrueckii*. El $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es aplicado industrialmente en la producción de ácido láctico D(-) ya que el hidróxido de calcio se recupera fácilmente por precipitación y es más económico que el NaOH y el NH_4OH .

Además, es muy utilizado ya que el catión divalente (Ca^{+2}) resulta más eficaz para neutralizar los cultivos en comparación con los monovalentes (Na^+ y NH_4^+).

Se llevó a cabo la adición de metanol durante la acidificación del lactato de amonio con ácido sulfúrico. Se formó el lactato de amonio utilizando hidróxido de amonio para lograr la neutralización del caldo de fermentación. Mediante adición de ácido sulfúrico,

se obtuvo sulfato de amonio y ácido láctico. Al añadir metanol durante el proceso disminuyó la solubilidad del sulfato de amonio en el caldo, y debido a esto mejoró su separación por filtración, y facilitó la esterificación del ácido láctico con el metanol para formar lactato de metilo, esto se realizó a temperatura ambiente y se obtuvo un rendimiento superior al 80 %. Una vez obtenido el lactato de metilo, este se somete a destilación para obtener ácido láctico.

Cargill a partir de ciertos estudios, desarrolló un proceso alternativo en el que utilizó carbonato de sodio como agente neutralizador y para la extracción amina terciaria. Se formó lactato de sodio con la adición de carbonato de sodio, que luego se concentró y se extrajo con amina terciaria bajo presión de CO₂ para la obtención de una sal de bicarbonato de sodio que tiene la propiedad de precipitar y un extracto de amina. La extracción se realizó con agua caliente a 140 °C y 100 psig para producir una solución de ácido láctico y una mezcla de disolvente de amina regenerada que posteriormente será reciclada. Una vez que se sometió el ácido láctico a purificación, se utilizó luego para la fabricación de polímeros.

En el caso ZeaChem, Inc., se encargó de desarrollar un proceso en el cual, el caldo de fermentación es neutralizado con carbonato de calcio para obtener la sal de lactato que luego se sometía a acidificación con ácido nítrico, en donde se recuperaba el ácido láctico, produciéndose nitrato de calcio. Como se mencionó el ácido láctico se recuperaba del medio y por otro lado el nitrato de calcio reaccionaba con carbonato de amonio para producir nitrato de amonio y carbonato de calcio. Luego el nitrato de amonio se procesó como fertilizante (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

La separación de ácido láctico por precipitación presenta algunas desventajas que se nombran a continuación: Alto costo de reactivos, es necesario realizar procesos de filtración y separación, especialmente cuando se requiere un producto de mayor pureza. Desde el punto de vista medioambiental, otro gran inconveniente es que se generan grandes cantidades de aguas residuales. Además, para producir una tonelada de ácido láctico se genera aproximadamente una tonelada de sulfato de calcio.

En el texto de Komesu, Maciel, & Filho (2017) se resalta que se obtuvieron las primeras cepas de *Aspergillus* capaces de producir cantidades elevadas de ácido láctico

insertando genes de *R. oryzae* en una cepa de *A. brasiliensis* de tipo salvaje. Dicha cepa produjo 32.2 g/L de ácido láctico, con un rendimiento de 0.44 g/g a partir de glucosa en la fermentación, y se obtuvo un pH final de 3.2. Una de las principales ventajas de estas cepas es que pueden crecer a un pH bajo y además utilizar fuentes de carbono de bajo costo como la biomasa vegetal.

Extracción con disolventes o extracción líquido/líquido

Se puede decir que la extracción con disolventes es aquel proceso en el que uno o más solutos son eliminados de una mezcla líquida transfiriendo el o los solutos a una segunda fase líquida inmiscible formada, donde se introduce un disolvente. Por lo tanto, la separación está basada en la diferencia de solubilidad del soluto en las dos fases líquidas. También se deben tener en cuenta otros factores importantes como los coeficientes de distribución, ya que es un requisito fundamental de un buen extractor (se define este coeficiente como la relación entre la concentración del ácido láctico en la fase solvente y la fase acuosa), la facilidad de separación de la fase líquida, la selectividad del extractor y además es importante tener en cuenta la elección del disolvente con que se realiza la extracción (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

En cuanto al disolvente (o extractor), este se encarga de disolver parcialmente ciertas especies de la alimentación líquida, provocando al menos una separación parcial de los componentes presentes en la alimentación. Respecto a la elección del disolvente se deben tener en cuenta algunas características como: buena selectividad, estabilidad química, regenerabilidad, disminución de corrosividad, baja toxicidad y poca viscosidad. En el caso de presentar un extractor con elevada viscosidad, es necesario aplicar diluyentes, ya que también mejoran la capacidad de extracción del disolvente.

Se ha llevado a cabo una clasificación de los tipos de disolventes extractores como:

- Hidrocarburos convencionales, estos contienen oxígeno, como el octanol y la metil isobutil cetona.
- Disolventes oxigenados que presentan enlaces de fósforo, como es el caso de fosfato de tributilo.

- Aminas alifáticas que se caracterizan por tener alto peso molecular, como la dodecil amina.

De acuerdo a la clasificación anterior, los hidrocarburos convencionales que contienen oxígeno, se caracterizan por tener coeficientes de distribución muy bajos. Respecto a los disolventes oxigenados con enlaces de fósforo, no presentan coeficientes de distribución lo suficientemente altos, para poder extraer de manera adecuada el ácido láctico. Se puede decir entonces que los extractores del tercer tipo, las aminas de elevado peso molecular, son los más eficaces y apropiados.

Por otro lado, se llevó a cabo el estudio de la extracción de ácido láctico con algunos solventes, donde se pudieron observar y clasificar luego, en aquellos que presentan mayor afinidad con el ácido láctico y poca o ninguna afinidad con el agua. Estos solventes fueron éter etílico, acetato de etilo hexanol, alcohol isoamílico y furfural. Según los resultados, el éter etílico mostró la mayor selectividad, luego sigue el acetato de etilo, el hexanol, el alcohol isoamílico y el furfural. El éter etílico uno de los solventes que no era aconsejable para su uso como disolvente industrial, fue el éter etílico, ya que presenta importantes riesgos asociados a la manipulación. A diferencia del acetato de etilo que mostró un gran potencial de aplicación. No era significativa la diferencia de selectividad entre el hexanol y el alcohol isoamílico. Es decir que se eligió el alcohol como disolvente para la purificación del ácido láctico, ya que era el más adecuado y adaptable por sus propiedades (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

También se llevaron a cabo estudios referidos a la recuperación del ácido láctico usando como extracto tributilfosfato y dodecano como disolvente. Como el tributilfosfato presenta elevada viscosidad, era necesario usar un disolvente de baja viscosidad y que fuera insoluble en agua. Se obtuvieron buenos resultados, aunque era necesario reducir la viscosidad del tributilfosfato para evitar un elevado consumo de energía (impulsores y bomba). Sin embargo, cabe destacar que el uso de un disolvente que presenta baja miscibilidad en fase acuosa reduce la contaminación.

Se puede concluir entonces que la extracción con disolventes necesita de una gran superficie de intercambio para lograr una separación eficaz, sin embargo esto implica costos elevados de equipamiento y de recuperación de disolventes en las etapas de

extracción. Además, la alta toxicidad del extractor para los microorganismos, sería un inconveniente para su aplicación en la fermentación extractiva in situ. Es decir que generalmente la extracción líquido-líquido no se aplica en los procesos industriales ya que los agentes de extracción presentan coeficientes de distribución con características para los ácidos orgánicos (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

Separación con Membranas

Según el texto de Komesu, Maciel, & Filho (2017) los procesos de separación con membranas se caracterizan por el traspaso de solutos a través de una barrera física semipermeable cuyo objetivo es separar dos fases, evitando la transferencia de componentes de una fase a otra. Los procesos que utilizan membranas se aplican a diversos sectores de la industria: biotecnología, tratamiento de aguas, alimentación, farmacéutica, etc. Una de las principales ventajas de las membranas son la especificidad y al bajo consumo de energía. Dentro de los procesos de separación y purificación basados en membranas, los más conocidos son la microfiltración, la ultrafiltración y la tecnología de electrodiálisis.

Se puede definir la electrodiálisis como un método de separación, que aplica membranas de intercambio catiónico y aniónico permeables. Las membranas son colocadas entre el cátodo y el ánodo; cuando se aplica un potencial eléctrico entre los electrodos, los cationes migran hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo. En la electrodiálisis las membranas usadas son poliméricas, no porosas, con un espesor entre 10 y 500 μm . Uno de los usos de la electrodiálisis es la eliminación de las sales de las soluciones, como así también para concentrar las sustancias iónicas. Existe un tipo especial de electrodiálisis con membranas bipolares, que son capaces de disociar la molécula de agua en protones (H^+) e iones hidroxilo (OH^-). Estas membranas funcionan con un 80% de eficiencia. Para la separación del agua se utiliza la electrodiálisis con membranas bipolares, produciendo de esta forma ácido láctico concentrado, y el amoníaco se recicla luego. En la electrodiálisis es muy importante la etapa de desalinización, ya que brinda un funcionamiento eficiente y económico del proceso. La sal de lactato, en esta etapa, está dos veces o más concentrada. Posee un rendimiento de recuperación alto y el

consumo de energía es bajo. Es decir que para la purificación del ácido láctico, puede aplicarse la doble electrodiálisis, derivada de la fermentación sin generación de sal como residuo.

Cabe mencionar, además, que los procesos de separación por membrana presentan ciertas ventajas importantes como la gran flexibilidad en la escala de producción, esto dependerá de la demanda del mercado. Como así también las membranas, debido a su alta selectividad, garantizan altos niveles de purificación y separación; se adaptan a fermentadores convencionales, lo que permite la producción y la purificación simultáneas, disminuyendo el costo de inversión en equipos. Sin embargo presenta algunos inconvenientes como el alto costo de las membranas, la polarización y los problemas de ensuciamiento que limitan el uso de los procesos de electrodiálisis a gran escala (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

Se puede concluir que la precipitación es el método convencional para lograr la recuperación del ácido láctico, pero desde el punto de vista económico y medioambiental es poco atractivo, ya que genera residuos sólidos y ácido láctico de baja pureza.

A diferencia del anterior, la extracción con disolventes tiene la ventaja de no generar muchos residuos, pero requiere una gran superficie de intercambio, además debido a la recuperación del disolvente requiere alto costo y presenta también elevada toxicidad de los extractores; es decir que estos inconvenientes limitan su uso a gran escala (Komesu, Maciel, & Filho, 2017).

Destilación Molecular

Se puede definir a la destilación molecular como una operación unitaria poco convencional de transferencia de masa por difusión, que se lleva a cabo para la separación de mezclas líquidas homogéneas que tienen baja volatilidad, elevado peso molecular y son sensibles al calor. Puede considerarse un caso especial de evaporación, debido a que puede generarse vapor en la superficie del líquido con la diferencia de que casi no hay difusión de moléculas gaseosas a la fase líquida (no hay equilibrio vapor-líquido). Esto se logra cuando la superficie de evaporación caliente y la superficie de condensación fría se colocan cercanas una con la otra. Cabe destacar también que el proceso no implica el uso

de un disolvente como en la destilación extractiva, como consecuencia, el material del producto no se contamina y no se realiza, por lo tanto, una purificación posterior. Respecto al aparato de destilación molecular, este se caracteriza por tener dos configuraciones posibles: con centrífuga o con película descendente. Los dos diseños presentan el mismo principio de separación: una presión reducida, esto ayuda a que las moléculas se evaporen del evaporador caliente al condensador frío, y también la formación de una fina película líquida que facilita la transferencia de calor y masa. Respecto al destilador centrífugo, funciona utilizando la fuerza centrífuga, logrando la formación de una fina película de líquido que luego pasa a través del disco calentado y hace contacto con la superficie del condensador. Por otro lado, el destilador de película descendente, lleva a cabo su trabajo mediante la fuerza de gravedad para originar una fina película en el cilindro de evaporación. Se puede destacar que la destilación molecular es una técnica de separación que se usa en muchos procesos de purificación de productos químicos, petroquímicos y grasas, farmacéutica y alimentaria. Tiene numerosas aplicaciones como: recuperación de vitamina E a partir de aceites vegetales y residuos de petróleo; separación de bioaceite; obtención de monoglicéridos; recuperación de carotenoides del aceite de palma; entre otras.

Se puede concluir que el ácido láctico es un eficiente compuesto para el proceso de destilación molecular, ya que las bajas temperaturas de destilación y el bajo tiempo de permanencia reducen la descomposición del ácido láctico, brindando altas purezas y rendimientos. Además, se ha demostrado el gran interés industrial y el potencial de la destilación molecular para la producción de ácido láctico (Komesu, Wolf Maciel, Rocha de Oliveira,, da Silva Martins, & Filho, 2017).

Destilación con Reactivos

Se define como una operación unitaria en la cual la reacción química y la separación por destilación se llevan a cabo de manera simultánea en un equipo de destilación fraccionada. La destilación catalítica, es un término que también se utiliza para estos sistemas, que funciona con un catalizador, este puede ser homogéneo o heterogéneo, para que la esterificación sea más rápida. La destilación catalítica se clasifica respecto al

modo de funcionamiento: continuo y por lotes. Respecto al continuo puede utilizarse sobre todo en las industrias petroquímica y química a granel, mientras que el modo por lotes se utiliza en las industrias de productos especiales, farmacéuticas y biotecnológicas. La destilación reactiva se aplica mayormente a las reacciones químicas reversibles, pertenecientes a la fase líquida, en donde puede observarse que la conversión de los reactivos está limitada por el equilibrio de la reacción. Es decir que se ha propuesto esta técnica para la recuperación de ácido láctico altamente puro, ya que presenta varias ventajas como las que se nombran a continuación:

- Reducción de los costos de equipamiento en la esterificación, ya que normalmente necesita una etapa para la reacción y otra para la separación de los productos de la reacción.
- Mejor conversión de los reactivos, disminuyendo los costos de reciclaje.
- Buena selección de los productos deseados, disminuyendo la formación de subproductos.
- Reducción adecuada de la cantidad de catalizador requerida para el mismo grado de conversión.

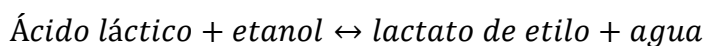
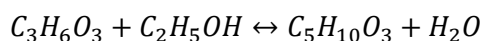
También existen varias dificultades y desventajas, algunas son:

- Limitación de volatilidad. Es decir que los reactivos y productos deben tener una volatilidad adecuada, para mantener altas concentraciones de reactivos y bajas concentraciones de productos en la zona de reacción.
- Requisito de tiempo de residencia. Ya que, si el tiempo de residencia de la reacción es largo, se requerirá una columna de gran tamaño y una gran capacidad de carga en la bandeja y puede ser más económico utilizar una disposición de reactor-separador.
- Escala de grandes flujos. Resulta complicado diseñar procesos de destilación por reactivos para caudales muy grandes, ya que surgen problemas de distribución de líquidos en las columnas empaquetadas.
- Irregularidades en las condiciones del proceso. Ya que muchas veces las condiciones óptimas de temperatura y presión para destilación, se alejan de ser

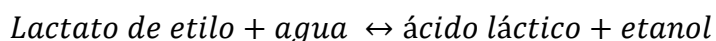
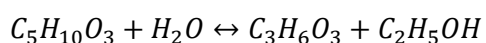
óptimas para la reacción y viceversa, lo que provoca ciertos desajustes en el proceso.

En el proceso de recuperación del ácido láctico se tiene en cuenta dos reacciones reversibles, la esterificación y la hidrólisis, catalizada por un catalizador ácido, según las siguientes reacciones estequiométricas:

Esterificación:



Hidrólisis:



De acuerdo a lo mencionado anteriormente, la reacción de esterificación o hidrólisis, por lo general es catalizada por un catalizador homogéneo como puede ser el ácido sulfúrico, el cloruro de hidrógeno anhidro, entre otros. Sin embargo, también se puede usar como catalizador, una resina sólida de intercambio iónico ya que presenta ventajas sobre los catalizadores homogéneos: baja corrosión, facilidad y buena separación para la mezcla de reacción, carencia de reacciones secundarias y, además, puede ser reutilizado. A su vez, es importante mencionar que se pueden usar diferentes tipos de alcoholes como reactivos en la reacción de esterificación, como el etanol, el butanol, el metanol y el 2-propanol. En el caso del etanol, es usado como reactivo para la síntesis de lactato y tiene la ventaja de que se produce a partir de recursos renovables. En cuanto al metanol y el butanol se caracterizan por ser los más económicos.

Respecto al funcionamiento de la columna de esterificación, el ácido láctico y el alcohol se introducen en la parte superior e inferior, respectivamente; una vez que ocurre la reacción, en el destilado se obtiene agua y lactato en el residuo. Las corrientes de destilado y de residuo son introducidas luego en la columna de hidrólisis. El agua se alimenta en la parte inferior y el lactato en la parte superior de la columna. Una vez realizada la hidrólisis, se recupera el alcohol en la parte superior, y el ácido láctico ya puro

es recuperado en el residuo (Komesu, Wolf Maciel, Rocha de Oliveira,, da Silva Martins, & Filho, 2017).

5.7 SÍNTESIS QUÍMICA DEL ÁCIDO LÁCTICO

De acuerdo a la Figura 10, la síntesis química del ácido láctico se basa en el lactonitrilo (Ghaffar, y otros, 2014). El cianuro de hidrógeno es añadido al acetaldehído, siempre y cuando exista una base, para producir lactonitrilo. La reacción se lleva a cabo a presión atmosférica en fase líquida. El lactonitrilo debe purificarse por destilación. Después se hidroliza a ácido láctico, ya sea por H_2SO_4 concentrado o por HCl a una temperatura de 100 °C, obteniendo como resultado ácido láctico y sal de amonio. Luego, el ácido láctico se esterifica con metanol para la obtención de lactato de metilo previo al proceso de purificación mediante destilación, y posteriormente se somete a hidrólisis con agua en presencia de un catalizador ácido para producir metanol (que luego se recicla) y ácido láctico. Se debe aclarar que el proceso de síntesis química genera una mezcla racémica de ácido láctico.

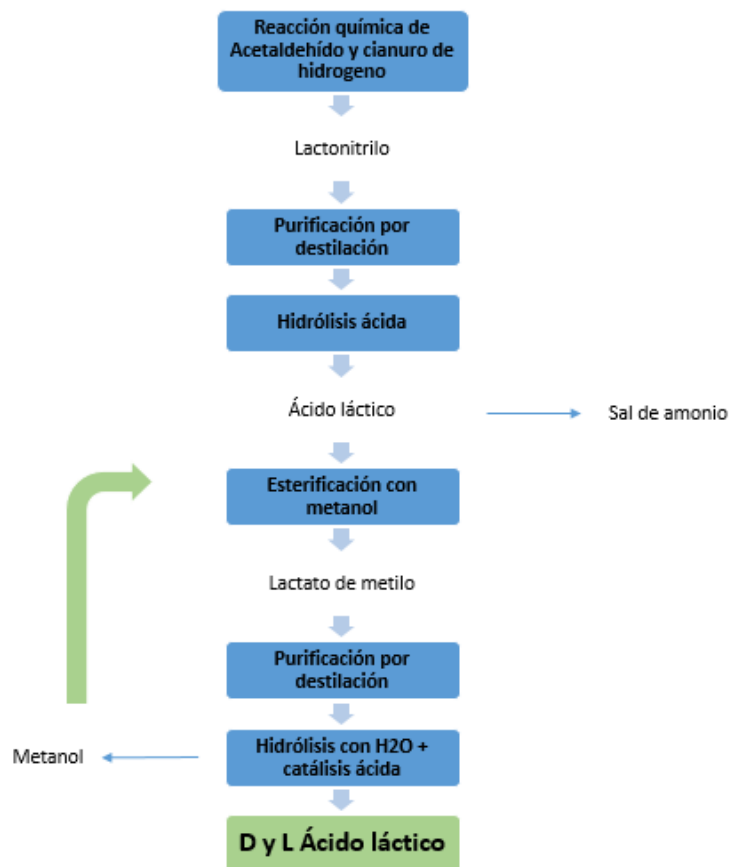
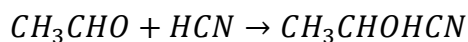


Figura 10: Síntesis química del ácido láctico

Fuente: Ghaffar y col. (2014).

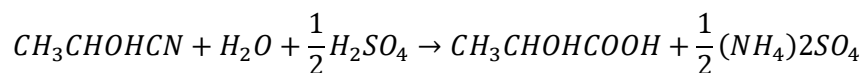
Según Ghaffar, y otros, (2014), las reacciones que intervienen en este proceso son las que se nombran a continuación:

(a) Adición de cianuro de hidrógeno como catalizador:



Acetaldehído + cianuro de hidrógeno → lactonitrilo

(b) Hidrolisis con H_2SO_4 :



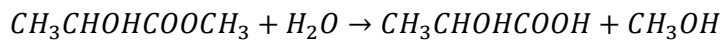
Lactonitrilo + ácido sulfurico → ácido láctico + sal de amonio

(c) Esterificación



Ácido láctico + metanol → lactato de metilo

(d) Hidrolisis con H₂O:



Lactato de metilo → ácido láctico + metanol

Cuando se obtiene ácido láctico debe purificarse por destilación (al vapor) para obtener ácido láctico de gran pureza. La síntesis de ácido láctico presenta dos etapas, siendo la primera etapa una esterificación, y la segunda etapa una hidrólisis, considerándose ambas reacciones muy eficientes. El ácido láctico sintetizado químicamente produce la mezcla racémica (50 % D(-) y 50 % L(+)), debido a esto no se garantiza el mejor punto de fusión para la producción de APL. El método para mejorar el proceso del APL se basa en la disminución del punto de fusión mediante la incorporación de pequeñas cantidades de enantiómeros de láctida que contiene, configuración opuesta en el polímero (es decir las mezclas de poli D(-) y poli L(+)) generan el mejor punto de fusión) (Juodeikienea , y otros, 2015).

5.8 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE PROCESOS DE FERMENTACIÓN

5.8.1 FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

En la figura 11 se muestra un proceso general de fermentación en estado sólido para obtener ácido láctico:

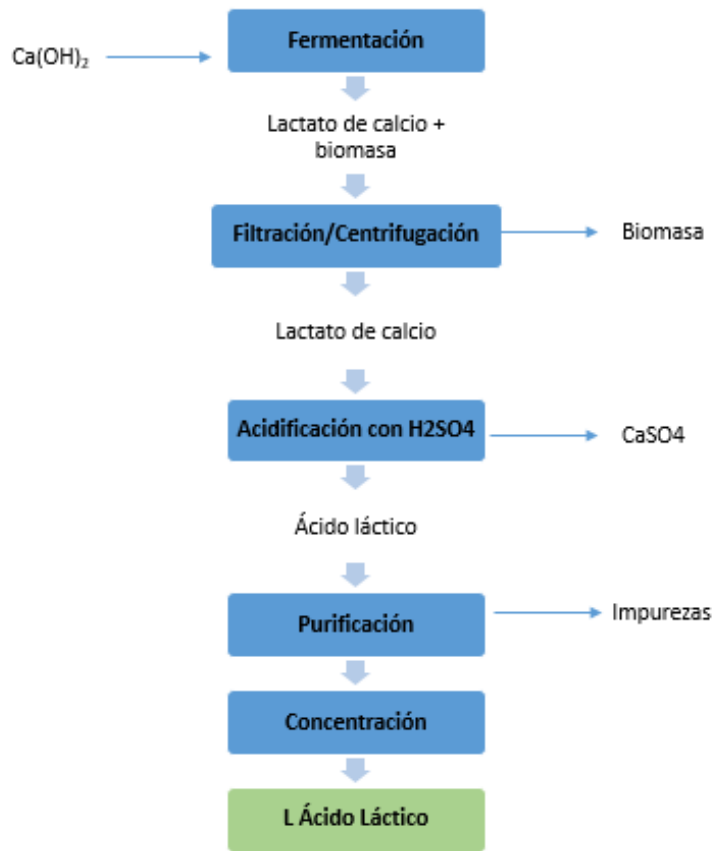


Figura 11: Esquema de fermentación en estado sólido.

Fuente: Adaptado de Komesu, Wolf Maciel, Rocha de Oliveira,, da Silva Martins, & Filho (2017).

Respecto a la fermentación microbiana la producción de ácido láctico representa más del 50 % de la producción mundial. Como se habló anteriormente presenta numerosas ventajas, en comparación con la síntesis química: produce isómero L(+) puro y usa recursos renovables, que servirán como sustrato de fermentación. El proceso de fermentación se basa en la degradación biológica del sustrato (glucosa) por un conjunto de microorganismos (biomasa), dando como resultado metabolitos tales como el etanol, el ácido cítrico y el ácido láctico. Como sustratos en la fermentación microbiana para la obtención de ácido láctico se utilizan las siguientes materias primas; almidones como el trigo, maíz, yuca, papa, arroz, lignocelulosa, suero de leche, remolacha azucarera. Al utilizar un producto de fermentación de gran pureza, como es el caso de la sacarosa de la caña de azúcar, se reducen los costos de purificación. Sin embargo, se tiene en cuenta que el uso de los residuos de las industrias alimentarias y de la caña de azúcar tiene importantes

ventajas desde el punto de vista medioambiental y económico. Resulta, además, importante nombrar parámetros para lograr la eficacia de la fermentación, como el pH y la temperatura del medio, las fuentes de nitrógeno y vitaminas, el modo de funcionamiento de la fermentación y la formación de subproductos.

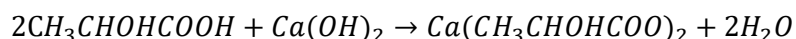
Una vez realizado el proceso de fermentación, el caldo de fermentación que contiene solución diluida de ácido láctico y/o sales de lactato, requiere de procesos de acidificación y purificación, para luego someterlo a un proceso de refinamiento.

Se conoce una clasificación del ácido láctico comercial según su composición: grados alimentarios (que presenta un contenido de ácido láctico del 25-90 %); grados farmacéuticos y cosméticos (90 % de contenido de ácido láctico); grados industriales (88 % - 90 % de contenido de ácido láctico); y grados especiales. (88 % - 90 % de contenido de ácido láctico).

Se realizaron una serie de pasos, luego del procesamiento del ácido láctico, para lograr estos niveles de pureza. Para la recuperación y purificación del ácido láctico se requieren los pasos que se nombran a continuación:

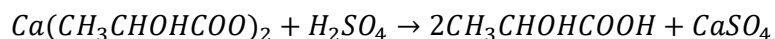
- Por un lado realizar la eliminación de la biomasa del caldo, mediante el proceso de filtración o centrifugación.
- Por otro lado se realiza la acidificación del caldo, convirtiendo las sales de lactato en ácido láctico. Además debe neutralizarse el caldo con bases ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH , NaOH y otras) durante el proceso de fermentación para llevar a cabo el control del pH, de modo que las sales de lactato se producen a partir del ácido láctico.

Neutralización:



Ácido láctico + hidróxido de calcio → lactato de calcio + agua

Acidificación:



Lactato de calcio + ácido sulfúrico → ácido láctico + sulfato de calcio

- Separar el ácido láctico de la sal inorgánica formada. Para realizar la separación puede llevarse a cabo por precipitación, extracción líquido-líquido e intercambio iónico. Para lograr la eliminación del ácido láctico presente en el caldo sin neutralizar, se realizan los siguientes métodos de separación; separación por membrana, adsorción e intercambio iónico.
- Concentración del ácido láctico, se puede llevar a cabo mediante extracción con disolventes, separación con membranas, evaporación, cristalización y el proceso de destilación.
- Eliminación de impurezas. Ciertas impurezas, como los azúcares residuales, ácido acético y ácido fórmico, se pueden eliminar mediante cromatografía e intercambio iónico.

En los procesos de producción de ácido láctico, se necesitan ciertos métodos de purificación eficaces para la viabilidad económica. Se puede decir que existe una gran diferencia entre el punto de ebullición del ácido láctico y el agua, por lo tanto, resulta casi imposible obtener ácido láctico puro; ya que el ácido láctico se caracteriza por tener gran afinidad con el agua y cuando la concentración de ácido láctico es elevada se forma un dímero. Una de las tecnologías usadas en la separación del ácido láctico es el proceso de precipitación, el cual funciona añadiendo al fermentador un exceso de carbonato de calcio o de hidróxido de calcio, que neutraliza el ácido y de esta forma mantener el pH entre 5-6, obteniendo lactato de calcio. Es importante realizar ésta neutralización ya que la fermentación es más eficaz con un pH cercano a la neutralidad, ya que el hongo no se adapta bien a las condiciones ácidas y en el caso de las bacterias hay un descenso en la producción de ácido láctico. Cuando se requiere un producto altamente puro el ácido láctico debe someterse a una esterificación con metanol o etanol y luego el lactato de metilo o de etilo son recuperados por destilación, posteriormente se rehidrata con cantidades mínimas de agua, después se evapora y por último el alcohol se recicla.

Sin embargo, la separación del ácido láctico por precipitación presenta algunas desventajas que se nombran a continuación: elevado costo de reactivos, requiere de proceso de filtración y otros procesos de separación, principalmente cuando se requiere un ácido láctico de gran pureza. Además, desde el punto de vista medioambiental, se

genera una gran cantidad de aguas residuales. Otro inconveniente es que al producir una tonelada de ácido láctico se genera aproximadamente una tonelada de sulfato cálcico de bajo valor, esto implica serios problemas de tratamiento de residuos.

Como se mencionó anteriormente otro método de purificación del ácido láctico es la extracción con disolventes o también llamada extracción líquido-líquido. En el proceso de extracción, uno o más componentes (solutos) de una mezcla son transportados a otro líquido inmiscible (disolvente). La función del disolvente es poder disolver ciertas especies de la alimentación líquida, logrando al menos una separación parcial de los componentes pertenecientes a la alimentación. Este método no genera residuos sólidos (yeso) a diferencia del método de precipitación. Pero requiere una gran área de intercambio para una buena separación, por lo tanto, necesita un equipo costoso y la recuperación del disolvente en las etapas de extracción. La extracción líquido-líquido no suele aplicarse en los procesos industriales, debido a que los agentes de extracción que se usan tienen coeficientes de distribución poco favorables para los ácidos orgánicos.

Otra forma de obtener ácido láctico puro, es mediante procesos de separación por membrana. Estos procesos se basan en la transferencia de solutos a través de una barrera física semipermeable que sirve para separar dos fases, impidiendo el transporte de componentes de una fase a otra. Los procesos de membrana incluyen la microfiltración, la ultrafiltración, la nanofiltración, la ósmosis inversa o en algunos casos, combinaciones de ellas. Cabe destacar que las membranas presentan alta selectividad, y esto garantiza altos niveles de purificación y separación. También se puede nombrar a la esterificación como otro método de separación y purificación del ácido láctico, como se explicó anteriormente. (Komesu, Wolf Maciel, Rocha de Oliveira,, da Silva Martins, & Filho, 2017)

También se puede definir a la fermentación como un proceso de producción de energía, en el que las moléculas orgánicas desempeñan el papel de donantes y aceptantes de electrones. La molécula que se va a metabolizar no posee toda su energía potencial extraída de ella. Por lo tanto, las bacterias lácticas se utilizan como un método económico para alimentos por medio de la fermentación y, generalmente, no se requiere calor, o muy poco, en la fermentación. En el proceso de fermentación por lotes, el cultivo se realiza

primero en una serie de recipientes de inóculo y después se transfiere al fermentador. El tamaño del inóculo suele ser del 5 al 10% del volumen de líquido en el fermentador. La fermentación suele mantenerse a 35-45 C y a un pH de 5 y 6,5 añadiendo una base adecuada, como el hidróxido de amonio.

5.8.2 MÉTODOS DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

La fermentación del ácido láctico depende de ciertos factores como las materias primas utilizadas, los nutrientes que se encuentran en el medio y los microorganismos usados. Tres son los métodos de fermentación que se conocen: la fermentación por lotes, la fermentación por lotes alimentados y la fermentación continua (Juodeikienea , y otros, 2015).

Fermentación por lotes

En la fermentación por lotes, todos los materiales que se usan, como fuente de carbono, el nitrógeno y demás, deben agregarse previo al comienzo del proceso de fermentación. Una característica favorable de la fermentación por lotes es que evita la contaminación, comparado con los otros métodos, y como es un sistema cerrado, se producen elevadas concentraciones de ácido láctico. Además, la fermentación por lotes presenta desventajas, como la baja productividad debido a la inhibición del sustrato o del producto.

Soccol, Marin, Raimbault, & Lebeault (1994) fueron capaces de producir 137 g/l de ácido láctico utilizando *R. oryzae* mediante FES, obteniéndose un rendimiento de ácido láctico de 0.97 g/g. Las ventajas de utilizar la FES, son la alta productividad, único recipiente de reacción, tiempo rápido de procesamiento y menos carga de enzimas. En los procesos de hidrólisis y fermentación, las materias primas deben primero someterse a un pretratamiento, para eliminar los compuestos innecesarios. Luego, las materias primas se someten a sacarificación enzimática y el hidrolizado que se formó es sometido a fermentación. En el caso de FS, las materias primas están sujetas a pretratamiento, debido a esto la productividad real disminuye. Ciertos estudios informaron que el *Lactobacillus*

rhamnosus, produjo un rendimiento de ácido láctico de 0.97 g/g por FES y cuando se realizó por el método FS, se obtuvo 0.81 g/g de rendimiento.

Fermentación Fed- batch

En este caso, las materias primas añadidas, como fuente de carbono, fuente de nitrógeno y otros componentes necesarios, deben agregarse durante el proceso de fermentación a intervalos regulares de tiempo sin remover el caldo de fermentación. Se lleva a cabo este tipo de fermentación para mantener una reducida concentración de sustrato, cuando se añaden nutrientes al cultivo de fermentación. Ding & Tan (2006) informaron que la producción de ácido láctico por *Lactobacillus casei* utilizando la fermentación fedbatch resultó ser más eficiente en la producción de ácido láctico que otros métodos.

Fermentación Continua

Esta fermentación se basa en la adición de medio de cultivo fresco al fermentador, retirando mientras el caldo existente, esto se realiza siempre a la misma velocidad. Se mantiene constantes las concentraciones de sustratos y productos. Dentro de las ventajas de la fermentación continua, es que previene la inhibición del producto final, menor frecuencia de parada, poca disminución de la productividad durante la fase de latencia, para lograr un alto rendimiento del producto el cultivo se realiza una sola vez, además se ahorra tiempo y esto implica menos trabajo. Por el contrario, algunos inconvenientes que presenta la fermentación continua son: la contaminación, se requiere un operador de campo con experiencia, esto implica altos costos. En el trabajo de Krishna, Nikhilesh, Tarun, Saibaba K V, & Gopinadh (2018) se informó de la producción de ácido láctico de 1.56 g/l/h utilizando *Enterococcus faecium* a partir de la fermentación continua. Además, se llevaron a cabo estudios de la producción de ácido láctico donde se usó *Bacillus coagulans* (cepa AD) con una productividad de 3.69 g/l/h utilizando la fermentación continua.

5.8.3 CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Se define la fermentación en estado sólido (FES) como el proceso en donde los microorganismos crecen en materiales sólidos en ausencia de líquido. La FES puede reemplazar a la fermentación sumergida, ya que se aplica para la producción de antibióticos, proteínas unicelulares, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, ácidos orgánicos, biopesticidas, biocombustibles y producción de aromas. Además, la FES presenta mayores ventajas respecto a la fermentación sumergida, como la alta productividad volumétrica, el bajo costo del equipo implicado, mejor rendimiento del producto, genera menos residuos y los procesos que requieren menos tiempo, etc. Sin embargo, la FES también tiene algunas desventajas, ya que hay algunos procesos en los que la fermentación en estado sólido no puede utilizarse, como es el caso de la fermentación bacteriana. El estado sólido ofrece grandes ventajas cuando se utilizan hongos. A diferencia de otros microorganismos, los hongos crecen normalmente en la naturaleza en sustratos sólidos como trozos de madera, semillas, tallos, raíces y partes secas de animales como por ejemplo la piel, los huesos y la materia fecal, es decir, en medio con poca humedad. En FES, la humedad necesaria para el crecimiento microbiano existe en estado absorbido. Sin embargo, se puede diferenciar la FES de la fermentación en sustrato sólido; ya que en esta el propio sustrato actúa como fuente de carbono y se produce en ausencia o casi ausencia de agua libre. Se debe destacar entonces que el objetivo de la FES es colocar los hongos o las bacterias cultivadas en contacto con el sustrato insoluble y obtener de esta forma la mayor concentración de nutrientes del sustrato para la fermentación (Bhargav, Panda, Ali, & Javed, 2008).

La producción de compuestos de interés industrial se realiza empleando la FES, ésta se considera eficiente para la producción de enzimas y otros compuestos como fenólicos, vitaminas, etc, y la fermentación sumergida (FS). En la FES se emplean sustratos procedentes de materiales vegetales, principalmente cereales y legumbres, y algunos residuos agroindustriales. Se sabe que los hongos, principales microorganismos usados en esta fermentación, producen varias enzimas para degradar las paredes celulares de las plantas y mejorar la composición química y la bioactividad de los sustratos empleados. La fermentación fúngica aplicada a los alimentos mejora la digestibilidad y la

disponibilidad de las proteínas, evitando el crecimiento de microorganismos patógenos y bacterias indeseables, mediante la producción de compuestos con actividad antibiótica (Londoño-Hernández, y otros, 2017).

5.8.4 ASPECTOS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Humedad y actividad del agua en la FES

La baja humedad del sustrato, en estado sólido, limita el crecimiento de los microorganismos, a diferencia de la fermentación sumergida. Sabiendo que el concepto de actividad de agua (a_w) está referido a un parámetro que mide el potencial hídrico, y caracteriza de esta forma el estado energético del agua. Es decir que la actividad del agua de los sustratos influye mucho en la actividad microbiana, ya que determina el tipo de organismos que pueden crecer en FES. También puede considerarse el a_w del medio como un parámetro fundamental para el transporte de masa de agua a través de células microbianas. Se descubrió que la actividad del agua óptima correspondía a un valor de 0.99 y por debajo de 0.90 no existía desarrollo del hongo, ya que cuando la actividad del agua es baja hay una pérdida de nutrientes esenciales para el crecimiento de los hongos. Por lo tanto, se consideró que una mayor a_w mejoró la transformación del sustrato en biomasa fúngica, ya que si la actividad de agua es reducida existe menor transferencia de masa y reducida disponibilidad de agua para los microorganismos.

Temperatura y transferencia de calor

El crecimiento de los hongos en la FES está muy influenciado por la temperatura. Durante la FES se genera una gran cantidad de calor que es proporcional a las actividades metabólicas del microorganismo. Los hongos pueden crecer en una amplia gama de temperaturas, desde 20 °C a 55 °C.

5.8.5 BIORREACTORES

En los procesos de fermentación, son muy importantes los sistemas de biorreactores para el crecimiento y cultivo de microorganismos. Sin embargo, existen factores que dificultan el crecimiento del producto en los biorreactores FES, como la temperatura, la humedad del lecho de sustrato, el tipo de sustrato utilizado, el tamaño del

biorreactor, la aireación, la tasa de refrigeración enfriamiento, la altura del lecho y la morfología de los hongos. Los biorreactores FES están equipados con un humidificador y pueden tener además una unidad de agitación (Bhargav, Panda,, Ali, & Javed, 2008).

Hay cuatro funciones principales del biorreactor, que son:

- Contener el sustrato
- Contener el microorganismo del proceso
- Proteger al microorganismo del proceso contra la contaminación y
- Controlar las condiciones ambientales para lograr el crecimiento óptimo y la formación de productos.

El biorreactor en los procesos FES, proporciona un entorno adecuado para el crecimiento de los microorganismos y la actividad biológica. La función principal de los biorreactores es contener los medios y estar bien cerrados, evitando de esta forma el ingreso de sustancias nocivas en el biorreactor (Manan & Webb, 2017). Existen biorreactores a gran escala y a pequeña escala:

- Biorreactores a pequeña escala: La FES a escala de laboratorio, se realiza en placas de Petri, frascos, matraces Erlenmeyer de boca ancha, frascos roux y frascos de rodillo. Son sistemas sencillos y los experimentos se llevan a cabo fácilmente. Existen varias formas de biorreactores a pequeña escala, un ejemplo son los biorreactores de columna que consisten en columnas pequeñas, que contienen aproximadamente 20 g de material sólido preinoculado, además estos biorreactores son útiles para la optimización del medio. Pero presenta la dificultad en la obtención del producto y en la escasa eliminación del calor. Otro de los biorreactores de columna son los Biorreactores ORSTOM, muy útiles para los procesos de escaldado debido al control automático de humedad relativa y temperatura. También se pueden nombrar los reactores de columna no agitados, existen biorreactores con agitadores como el reactor de tambor perforado y el mezclador horizontal de paletas (con o sin camisa de agua). Respecto a los biorreactores de tambor funcionan mezclando el sustrato sólido mediante rotación horizontal (con o sin deflectores), logrando una mezcla uniforme del inóculo con el sustrato, pero existe un inconveniente ya que la morfología de los hongos puede

deteriorarse fácilmente por el alto cizallamiento. Otro ejemplo de biorreactores a pequeña escala son los Biorreactores de lecho compacto, está compuesto por placas internas por las que circula agua fría a una determinada temperatura óptima. Se debe evitar la variación de la temperatura ya que retrasa el crecimiento inicial del cultivo utilizado.

- Biorreactores a gran escala: el funcionamiento de estos biorreactores depende de las características de diseño, de la susceptibilidad del sustrato y de la morfología de los hongos, del aumento de temperatura, del tamaño de las partículas, de la cantidad de sustrato utilizado y de la altura de la planta. En la FES se utilizan varios reactores como por ejemplo los biorreactores de bandeja, que tienen un funcionamiento sencillo y son de aireación forzada. En este caso las bandejas pueden estar construidas de madera, plástico o metal, pudiendo estar perforadas o no. Estas son colocadas una arriba de la otra, y para su buen funcionamiento se debe dejar espacios adecuados entre ellas y se colocan en una cámara que tiene aire circulante, y de esta forma mantener una temperatura constante. Otro ejemplo de biorreactores son los biorreactores de lecho compacto, que son modificaciones de reactores de columna a escala de laboratorio. Presenta un tamiz en el fondo que permite retener el sustrato. El paso de aire forzado a través del lecho genera aireación, lo que facilita su funcionamiento. En cuanto a las limitaciones que presenta este tipo de reactores, se puede mencionar el calor producido durante el proceso de fermentación dentro del lecho de sustrato. Sin embargo, cabe aclarar que la reducción del contenido de agua dentro del lecho de sustrato aumenta su endurecimiento, esto hace disminuir la penetración de los hongos en el lecho, por lo tanto, reduce la formación de productos. Debido a esto es ventajoso utilizar hongos termoestables. Otro biorreactor utilizado a escala industrial es el biorreactor de tambor rotatorio, el cual funciona mezclando el sustrato con el organismo cultivado, mientras que la rotación puede ser continua o intermitente dependiendo de la altura del lecho y la velocidad de rotación. Este tipo de biorreactores se caracterizan por ser mixtos. Sin embargo, se debe tener cuidado

ya que, con mayores tasas de cizallamiento y velocidad de rotación, puede ser destruida la fisiología de los hongos.

Por otro lado, también se pueden mencionar los reactores de lecho fluidizado, donde el sustrato sólido es fluidizado por un flujo de aire que circula hacia arriba. Es decir que el biorreactor funciona con el flujo de aire y la velocidad con la que el sustrato se mueve de manera ascendente. El biorreactor contiene una columna alta que se ensancha en la parte superior permitiendo desprender los sólidos de la corriente de gas. El mantenimiento de condiciones uniformes en todo el sustrato, sumado al aumento de la superficie, se consideran ventajas de este biorreactor (Bhargav, Panda,, Ali, & Javed, 2008).

Además, los biorreactores FES pueden clasificarse en cuatro grupos según el tipo de aireación y mezcla:

Grupo 1: aireación no forzada, sin mezcla/agitación (estática).

Biorreactores de bandeja: Son usados ampliamente en la FES tradicional. La fermentación se lleva a cabo en bandejas que se encuentran estacionarias, sin agitación mecánica. El fondo de la bandeja se encuentra perforado con malla, que permite sujetar el sustrato sólido y de esta manera se genera aireación normal. En el funcionamiento solo se admite cantidades limitadas de sustrato sólido a fermentar, debido a que deben usarse capas finas evitando de esta manera el sobrecalentamiento y manteniendo las condiciones aeróbicas. Las bandejas son colocadas una encima de otra con espacios entre ellas. Se diseñaron también biorreactores de bandeja de columna con aireación forzada, para lograr de esta forma controlar las condiciones ambientales en el lecho, manipulando la temperatura y el flujo del aire. La figura 12 muestra un esquema general de los fermentadores de bandejas múltiples (Manan & Webb, 2017):

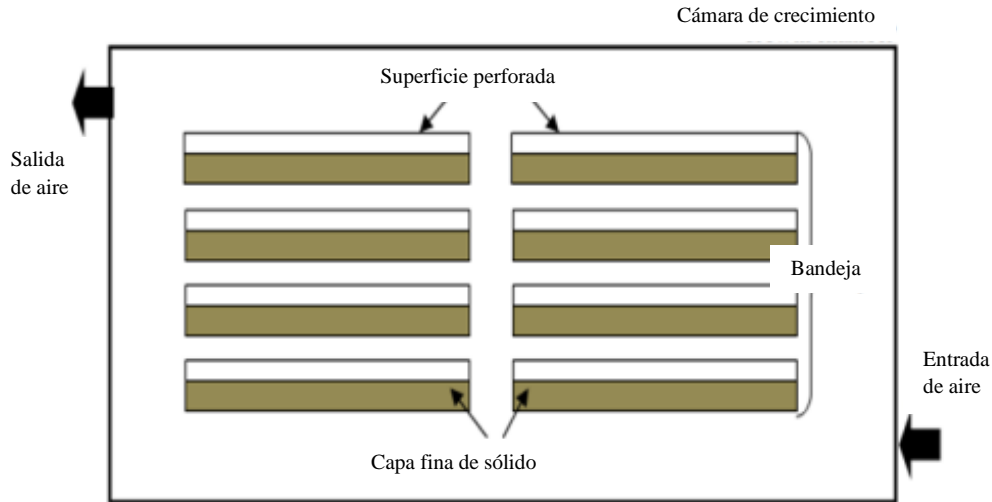


Figura 12: Esquema del biorreactor de bandeja.
Fuente: Adaptado de Manan & Webb (2017).

Grupo 2: aireación forzada, sin mezcla (estática)

Biorreactores de lecho compacto: Estos biorreactores se construyen con columnas de vidrio o plástico y, además, están formados por lechos no mezclados que presentan base perforada. Se aplica aireación forzada en el fondo de la columna, en ésta el aire pasa a través de un tamiz. Estos sistemas se utilizan para el desarrollo de productos con controles eficientes del proceso, especialmente para la eliminación del calor (Manan & Webb, 2017).

Su funcionamiento es apropiado para aquellos procesos de FES en los que no es aconsejable mezclar el lecho de sustrato en el transcurso de la fermentación, y que podrán ocurrir efectos perjudiciales para el crecimiento microbiano o la estructura física del producto final. Algunas de las características básicas de diseño de un biorreactor de lecho compacto son las que se nombran a continuación:

- La columna puede tener una sección transversal que no sea circular.
- La posición de la columna puede variar, es decir puede estar en posición vertical, horizontal o en cualquier ángulo
- La columna puede ser aireada desde cualquier punto, y en el caso de una columna vertical, el aire puede ingresar desde arriba o desde abajo.

- La columna puede estar cubierta por una camisa de agua para eliminar el calor o utilizar una placa de transferencia de calor insertada en el lecho.

La temperatura y la concentración de O_2 del aire que fluye dentro del lecho, variarán a lo largo del lecho hacia la salida. La temperatura aumenta a medida que aumenta la altura del lecho, y también aumenta a medida que disminuye el caudal de aire, excepto en la altura de lecho más baja. Para poder reducir la necesidad de una fuerte aireación, se desarrolló el biorreactor de lecho empacado Zymotis, para lograr la eliminación del calor mediante la inserción de placas internas de transferencia de calor muy próximas entre sí, de esta manera los gradientes de temperatura se reducen en este biorreactor. (Zulcali & Ali, 2011). La figura 13 muestra un esquema general de un fermentador de lecho compacto:

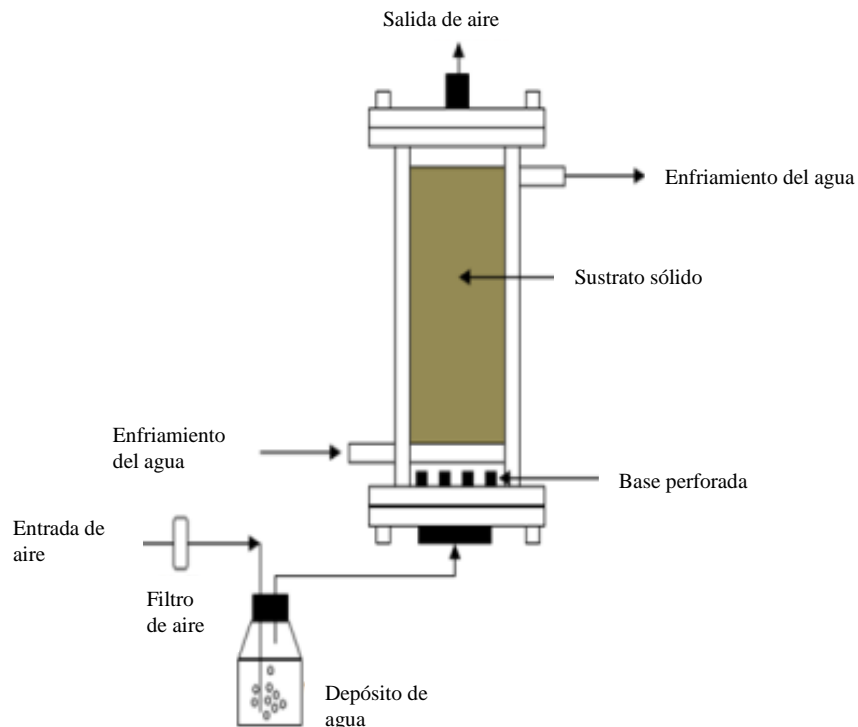


Figura 13: Esquema de un biorreactor de lecho compacto

Fuente: Adaptado de (Manan & Webb, 2017)

Grupo 3: aireación no forzada, con mezcla/agitación continua o intermitente

Dentro de este grupo se pueden nombrar los biorreactores de tambor rotativo: constan de un cilindro horizontal y su función es realizar una mezcla de forma intermitente sin aireación forzada, operando de forma continua o semicontinua. El tambor está semi

lleno con un lecho de sustrato, pero se debe tener en cuenta que el lecho fermentado no puede ser demasiado alto, para realizar buena transferencia de oxígeno y dióxido de carbono. Respecto al sustrato sólido, debe mezclarse de distinta forma para los distintos microorganismos. La mezcla formada puede ser continua intermitente o mixta, de esta forma se evita que se acumule el calor metabólico generado por la actividad microbiana. Es importante eliminar el calor metabólico del lecho, esto se consigue transfiriéndolo al espacio de cabeza por difusión o a través de la pared conductora al medio ambiente. Durante la mezcla intermitente, se observa que el crecimiento de los microorganismos es más uniforme y menos dañino para el micelio de los hongos. La mezcla continua podría afectar el crecimiento de los microorganismos (Manan & Webb, 2017). La figura 14 muestra un esquema del biorreactor de tambor giratorio:

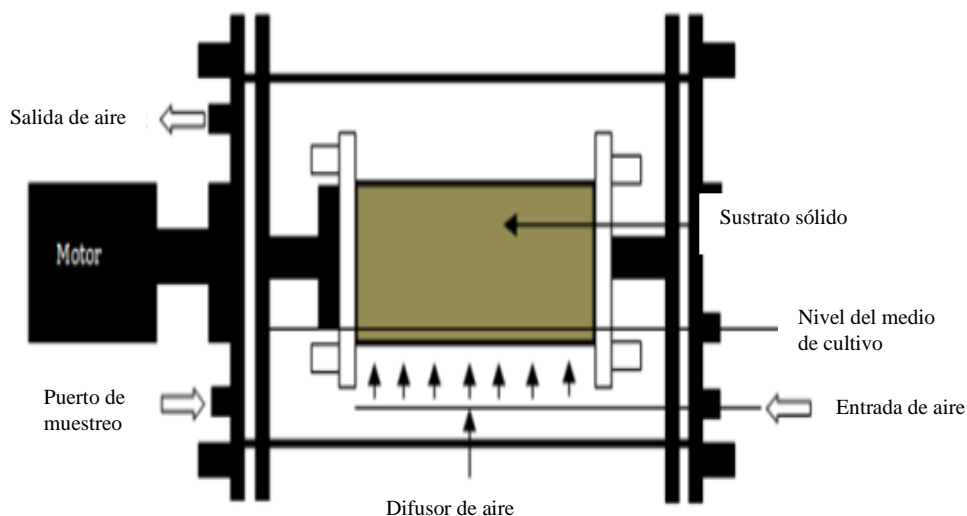


Figura 14: Esquema de un biorreactor de tambor giratorio.

Fuente: Adaptado de Manan & Webb (2017).

Grupo 4: aireación forzada, con mezcla/agitación continua o intermitente

Biorreactores de lecho fluidizado: Como se ve en la Figura 15, constan de una cámara vertical con una placa base perforada. Se aplica la aireación forzada en la cámara inferior a una velocidad adecuada para fluidificar las partículas de sustrato sólido y de esta manera provocar la mezcla. Además, el biorreactor consta de un agitador, que rompe los aglomerados (grumos) que pueden formarse. Debido a la expansión del lecho se requiere un espacio de cabeza suficiente. Este biorreactor de lecho fluidizado proporciona un buen

manejo de mezcla de gases, sólidos y líquidos. Además, se controla sin dificultad la temperatura y el enfriamiento del lecho de sustrato. El siguiente esquema muestra el diseño del biorreactor de lecho fluidizado (Manan & Webb, 2017):

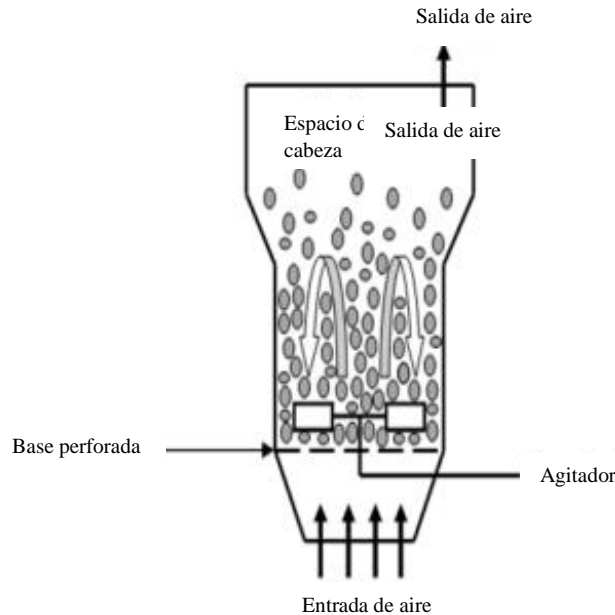


Figura 15: Esquema de un biorreactor de lecho fluidizado gas-sólido
Fuente: Adaptado de (Manan & Webb, 2017)

5.8.6 APLICACIONES DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Producción de enzimas por FES

La producción de enzimas es una de las aplicaciones más importantes de la FES. Es importante tener en cuenta ciertos factores para el rendimiento de la producción de enzimas como el tipo de cepa, las condiciones de cultivo, la naturaleza del sustrato y la disponibilidad de nutrientes. Se debe controlar la actividad del agua para una obtener una buena producción de enzimas. Para la producción de enzimas en FES, se consideran los sustratos agroindustriales. Algunas de las enzimas producidas por FES son proteasas, lipasas, celulasas, pectinasas, amilasas, etc. (Bhargav, Panda,, Ali, & Javed, 2008).

Producción de ácidos orgánicos en FES

También la fermentación es importante para la producción de ácidos orgánicos. Estos ácidos son comunes en alimentos y bebidas debido a sus propiedades principales:

solubilidad, calidad higroscópica y su capacidad de quelación. Algunos de los ácidos producidos mediante FES son el ácido cítrico, el ácido láctico, el ácido gálico, el ácido fumárico, el ácido linoleico y el ácido kójico (Bhargav, Panda,, Ali, & Javed, 2008).

6. ESTADO DEL ARTE

6.1 BIOPRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARA DE NARANJA: PROCESOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN

En el trabajo de Domínguez Espinosa, Gil Horán, & Pacho Carrillo (2008) realizaron estudios que estuvieron basados en el aprovechamiento de la fracción sólida de la naranja, como sustrato de biorreacción en fase sólida para la producción de ácidos orgánicos, principalmente L(+) ácido láctico. En este estudio la cepa que usaron fue *R. oryzae* NRRL 1710, para producir L(+) ácido láctico, en algunos procesos comerciales. La biotransformación en estado sólido de cáscara y bagazo de naranja con *R. oryzae* para obtener la producción de ácido láctico, la llevaron a cabo en un biorreactor horizontal de capacidad de 1 litro. Los residuos sólidos de naranja fueron cortados y después secados a 50 °C hasta lograr una humedad de 12 %. Luego molieron la cáscara seca y la tamizaron. Posteriormente adicionaron sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) como fuente de nitrógeno y carbonato de calcio (CaCO₃) como regulador de pH para ajustar el pH inicial a 5, a los lotes de harina de naranja. Además, se inocularon con una solución de esporas de *R. oryzae* correspondiente a 10⁷ esporas/ml (1ml/10g de sustrato sólido), para luego ser incubados durante 192 horas (8 días) a 30 °C. Una vez listo el medio e inoculada la cepa, la cáscara fue homogeneizada nuevamente.

Realizaron la determinación del ácido láctico por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En cuanto a la extracción del ácido de la materia sólida biotransformada, llevaron a cabo tres técnicas (prensado mecánico, centrifugación y filtración al vacío). Una vez realizada la biorreacción, obtuvieron ácido láctico en forma de lactato de calcio, con pH 3.4 y alto grado de hidrólisis. El rendimiento másico obtenido de ácido láctico en la biotransformación fue de 8.2 mg/g sólido seco equivalente al 0.82 % (Domínguez Espinosa, Gil Horán, & Pacho Carrillo, 2008).

6.2 FERMENTACIÓN DIRECTA DEL ÁCIDO L(+)-LÁCTICO A PARTIR DE LA PULPA DE LA MANDIOCA MEDIANTE EL CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO DE *RHIZOPUS ORYZAE*

En el estudio de Phrueksawan, Kulpreecha, Sooksai, & Thongchul (2012) se muestra que *R. oryzae* NRRL 395 utiliza la pulpa de yuca para obtener ácido láctico, en el cultivo por fermentación en estado sólido. Tuvieron en cuenta que el valor del pH sea 6. Además, observaron un aumento del título de lactato en agua inicial, debido al mayor grado de hinchamiento e hidrólisis del sustrato. En las condiciones óptimas, *R. oryzae* convirtió la pulpa de mandioca en ácido láctico a un título de 206.20 mg/g de pulpa seca inicial. Usaron dos enzimas comerciales, celulasa y glucoamilasa y se añadieron al sustrato de pulpa sólida de mandioca para la producción de ácido láctico. Con la ayuda de estas enzimas el título de lactato fue de 463,18 mg / g de pulpa seca inicial. La pulpa de mandioca fue pretratada e hidrolizada por ácidos o enzimas, en el cultivo sumergido. Antes de utilizarla en la fermentación la pulpa de mandioca se esterilizó en autoclave. Respecto al hongo se pregerminó, en un medio que contenía 20 g/l de glucosa y 2 g/l de extracto de levadura antes de inocular en el sustrato de pulpa de yuca. El cultivo se incubó a 30 °C, 150 rpm durante 4 h. Realizaron una combinación de pretratamiento con celulasa y glucoamilasa durante el proceso de fermentación, lo que aumentó aún más el rendimiento hasta un 83 %, debido a la conversión de lactato a partir del almidón presente en la pulpa de mandioca. A partir de este estudio se confirmó que es necesario el pretratamiento de la pulpa de mandioca previo al cultivo en estado sólido de *R. oryzae*, obteniendo además un alto rendimiento de lactato.

6.3 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR *RHIZOPUS ORYZAE* EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE RESIDUOS DE ANANÁ

En el estudio de Aziman, Tumari, & Zain (2015) se estudia la utilización de los residuos sólidos del ananá en la fermentación en estado sólido para la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae*. Los residuos sólidos de ananá se secaron al calor en una incubadora a 60 °C durante 7 días y luego se trituraron hasta la obtención de partículas finas. Posteriormente, se tamizó la muestra para separar las partículas de residuos. Se

mantuvo *R. oryzae* y se germinaron las esporas en agar papa dextrosa (APD) durante 7 días de incubación a 37 °C. Luego se procedió a la esterilización de 10 g de residuos sólidos de ananá secos y triturados, el hongo se transfirió al medio de fermentación. La concentración de ácido láctico en las muestras se determinó mediante una HPLC.

Mencionaron que, para la obtención de ácido láctico, utilizaron 3.15 mm de tamaño de partícula, 80 % de contenido de humedad, 1×10^4 esporas/g sólido, un medio de pH de 6.5 y una temperatura de incubación a 27 °C, con lo que obtuvieron mayor producción de ácido láctico 0.0236 g/g de residuos sólidos de ananá con 72.89 %, 69.08 % y 78.98 % de consumo de glucosa, fructosa y xilosa respectivamente.

6.4 FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS UTILIZANDO *LACTOBACILLUS DELBRUECKII*

En el estudio de Rojan P., K. Madhavan Nampoothiri, & Pandey (2006) se aprovecharon dos residuos agroindustriales, el bagazo de mandioca y el bagazo de caña de azúcar, como materia prima y soporte sólido inerte mediante la fermentación en estado sólido. El bagazo de mandioca se gelatinizó a 100 °C durante 15 minutos, seguida de la licuefacción con alfa amilasa (90 °C, pH 5 durante 30 min) y posterior sacarificación con glucoamilasa (60 °C, pH 4 durante 70 min) y el hidrolizado de almidón que contenía azúcares reductores se utilizó para humedecer el bagazo de caña de azúcar inerte, que se utilizó como soporte sólido para la fermentación en estado sólido. La fermentación en estado sólido se llevó a cabo a 37 °C utilizando *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 como inóculo. El cultivo se mantuvo en agar MR a 4 °C. Se obtuvo un máximo de 249 mg AL/g sólido seco de ácido L-láctico tras 5 días de fermentación, con una eficiencia de conversión de aproximadamente el 99 % de los azúcares reductores iniciales. Se adoptó el método estándar de hidrólisis ácida para determinar el contenido total de almidón en el bagazo de mandioca. De la masa sólida fermentada, el ácido láctico que se formó se extrajo con H₂SO₄ 1 M. Para determinar la cantidad de azúcares reductores se usó el método del ácido dinitrosalicílico. El cultivo se incubó a 10 °C para la producción de ácido láctico. Se demostró la producción máxima de 238.8 mg AL/g sólido seco a 37 °C. Además, en el estudio se comprobó el efecto del pH en varios valores de 4 a 10. Es decir

que *L. delbrueckii* fue capaz de crecer en un soporte sólido como el bagazo de caña de azúcar y utilizó el azúcar disponible en el medio utilizado para humedecer el sustrato de manera eficaz.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. CARACTERIZACION DE ESCOBAJO DE UVA

- Recolección de muestras: Los escobajos de uva se recolectaron de la bodega Tierra del Huarpe S.A, seleccionando escobajos de uva procedentes de uvas blancas y tintas.



Figura 16: Escobajo de uva en bodega Tierra del Huarpe S.A.

- Acondicionamiento de muestras:
 - Secado: esta operación se realiza para lograr la mayor extracción de agua y evitar de ésta forma la proliferación de microorganismos. Se realizó en estufa convectiva a una temperatura de 60 ± 5 °C durante 24 a 48 h.



Figura 17: Escobajo de uva luego de secarlo.

-Trituración: este proceso se basa en la reducción de tamaño y se llevó a cabo con un triturador de cuchillas a máxima potencia (750 W) por 2 min.

-Almacenamiento: se realizó a una temperatura de 4 °C en bolsas de polietileno, que deben permanecer cerradas e identificadas correctamente para una mejor conservación.

Para poder llevar a cabo la caracterización de escobajo de uva se realizaron los siguientes ensayos de laboratorio:

- Sólidos totales: Dos gramos del material fueron procesados en un analizador de humedad infrarrojo automático (Radwag PMR 50). Las muestras se analizaron por duplicado siguiendo la norma NREL/TP-510-42621
- Nitrógeno total: Se aplicó el método de Kjeldahl según la Norma 920.87 con algunas adaptaciones según el material y equipamiento disponible en nuestro laboratorio. Se procedió a pesar 1 g de material y se colocó en balón Kjeldahl con perlas de vidrio. Se agregó 1 cucharada de ácido salicílico ($C_7H_6O_3$), agua destilada como para disolver el sólido y 30 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). La mezcla se dejó reposar por 30 minutos. Luego se adicionaron 5g de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$), una cucharada de catalizador (una mezcla 2:1 de sulfato de potasio, K_2SO_4 , y sulfato de cobre, $CuSO_4$). Esta mezcla final se llevó a digestión sobre mechero, hasta observar una coloración verde esmeralda en el residuo obtenido. Una vez finalizado se agregó agua al digerido y se llevó a destilar, recogiendo el destilado en un matraz con 200 ml conteniendo 20 ml de una solución de H_2SO_4 al 0.5 N con heliantina. Luego se enrasó el matraz. Se tomó un volumen de 20 ml del destilado y se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, hasta viraje del rosa al amarillo. A partir del procedimiento de valoración, se calculó el valor del nitrógeno total. Las muestras se analizaron por duplicado.
- Azúcares reductores: Para extraer los azúcares reductores del material, se aplicó el procedimiento propuesto por Spigno et al. (2008) con algunas adaptaciones al material y equipamiento disponible en el laboratorio. Dos gramos del material se suspendieron en 25 ml de agua destilada en un vaso de precipitado. La

muestra se mantuvo en agitación a 350 rpm durante 4 h a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 min y finalmente se filtró por gravedad con un filtro de papel cualitativo. El líquido se recolectó y se guardó en el freezer hasta su análisis. Se realizaron duplicados de esta extracción. Se aplicó el método de Miller como se describe en el trabajo de Ávila Núñez et al. (2012). Se preparó una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se tomó una alícuota de 0.5 ml del extracto acuoso y se colocó en un tubo de ensayo con 0.5 ml de la solución de DNS. El tubo de ensayo se llevó a un baño maría con agua en ebullición durante 5 min. Luego de transcurrido ese tiempo, el tubo de ensayo se colocó en un baño de agua fría para que la reacción se detenga. Se agregó 5 ml de agua destilada, se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos para el desarrollo del color. La reacción colorimétrica se leyó en un espectrofotómetro (Agilent Technology, Cary 60 UV-vis) a 540 nm por duplicados. Para la cuantificación, se construyó una curva de calibración con soluciones estándar de glucosa anhidra. Las muestras se analizaron por duplicado (De la Torre, Bustos, Martínez, Casares, & Domarco, 2004).

- Lignina Klason: Previo al análisis propiamente dicho de lignina, es necesario realizar una extracción de compuestos solubles en agua (restos de tierra, nitratos y nitritos, proteínas y azúcares) y de compuestos solubles en etanol (como ser la clorofila). Para esto se llevó a cabo una extracción en equipo Soxhlet de la muestra de EU, en una primera etapa con agua y en una segunda etapa con etanol, tomando de referencia la Norma NREL/TP-510-42619. De esta manera se obtuvo la muestra de EU libre de extraíbles.

El método para cuantificar la lignina del EU libre de extraíbles se tomó de la norma TAPPI 222 descrita por Romero-Uscanga y otros (2014). El método de hidrólisis ácida cuantitativa se realizó en dos etapas: la primera con ácido sulfúrico al 72 % que hidroliza los polisacáridos en oligosacáridos, y una segunda al 4 % que rompe los oligómeros en monosacáridos. Se tomó la cantidad de 1 gramo de EU libre de extraíbles y se colocó en un vaso de precipitado de 50 ml a la cual se agregó 15 ml de H₂SO₄ al 72%, y se mantuvo

2 h en agitación. Al poco tiempo de agregar el ácido sulfúrico se observó que la muestra se tornó oscura. Una vez pasado el tiempo, se llevó a un vaso de precipitado de 1 litro y se realizó una disolución al 4 % de H_2SO_4 agregando agua destilada y se dejó en ebullición suave por 4 h. una vez frío, se esperó hasta que la muestra se asentara para decantar y filtrar. Una vez filtrada la muestra se llevó a estufa a 105 ± 3 °C durante 24 h y se procedió a pesar.

Las muestras se analizaron por duplicado y el resultado se calculó tomando de base el peso corregido, descontando las cenizas y el contenido de nitrógeno.



Figura 18: Equipo Soxhlet para retirar los componentes solubles en agua y etanol del EU.

- Cenizas: Dos gramos de material se pesaron en cápsulas de porcelana previamente tarados y calcinados. Las muestras por duplicado fueron calcinadas en una mufla (Dalvo) aplicando una rampa de temperatura como se indica en la norma NREL/TP-510-42622. Se realizó por duplicado, informando el promedio y desviación estándar.

7.2. ESTUDIO DE PRETRATAMIENTOS HIDROLÍTICOS DE ESCOBAJO DE UVA

Se utilizó como materia prima para el proceso, escobajo de uva proveniente de la bodega Tierra del Huarpe S.A.

Se llevaron a cabo pruebas de hidrolisis del escobajo de uva con soluciones de ácido clorhídrico (HCl 1 y 5%), agua oxigenada (H₂O₂ 5 y 15%), reactivos provenientes de Sigma Aldrich y de grado reactivo.

Se pusieron en contacto 50 g de escobajo con estas soluciones, que tiene un volumen de 500 ml, luego se dejó actuar durante 7 días a temperatura ambiente. Para evaluar la eficacia de los tratamientos se realizó la determinación de glucosa mediante el kit de Glicemia enzimática AA (marca Wiener lab.) utilizado para la determinación de glucosa en sangre.

7.3. FERMENTACIÓN BATCH

7.3.1. PRETRATAMIENTO

Se pesaron 50 g de escobajo de uva seco y se pusieron en contacto con 500 ml del agente hidrolizante en erlenmeyers de 1 litro. Se aplicó hidrólisis ácida y alcalina por 7 días a temperatura ambiente. Las soluciones empleadas fueron: HCl 1 % p/p, HCl 5% p/p, H₂SO₄ 1 % p/p, H₂SO₄ 5 % p/p, NaOH 0.1 N y NaOH 0.5 N. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, se midió el volumen de cada hidrolizado, y se neutralizaron con NaOH (granallas), CaCO₃ (polvo) y HCl (concentrado) respectivamente. Se tomó una muestra de cada licor neutralizado (con posterior centrifugación) para determinación de azúcares reductores.

7.3.2. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Se realizó la determinación espectrofotométrica del contenido de azúcares reductores, aplicando el Método del DNS (Método Miller), a las muestras de los licores neutralizados obtenidos posteriores a la etapa de hidrólisis.

7.3.3. FERMENTACIÓN

Para convertir el ácido láctico que será producido en la etapa de fermentación en lactato de calcio, se agregó a cada Erlenmeyer 250 ml de una solución al 10 % de CaCO₃.

Se reincorporó cada hidrolizado al erlenmeyer del cual provenía y se procedió al autoclavado (120 °C por 15 min). También se preparó un blanco de 50 g de escobajo de uva sin hidrolizar.

Una cepa pura de *R. oryzae NCIM 1299* (de la Colección de Cultivos del Centro de Referencia de Micología, Universidad Nacional de Rosario) se proliferó en agar papa dextrosa (Difco-213400) en placa de petri, a 32 °C y 50 % de humedad relativa (HR) por 4 días, y se almacenó a 4 °C hasta su siembra en los batch de fermentación.

Se realizaron los ensayos estáticos de fermentación fúngica en los erlenmeyers de 1 litro conteniendo el escobajo de uva y los hidrolizados ya descritos. Se inoculó una cuarta parte de la placa de petri con crecimiento de *R. oryzae NCIM 1299*. Se incubó a 32 °C y 50 % HR durante 7 días. Se llevó a cabo una agitación manual cada 24 h, evitando romper la estructura del escobajo de uva.

Luego de alcanzado el tiempo de fermentación se agregaron 200 ml de agua destilada a cada batch, para lograr una mayor remoción del ácido láctico de la estructura sólida. Se realizó la separación de la matriz sólida del líquido contenido en cada erlenmeyer, por filtración con sedaso, se midieron los volúmenes y se sacaron muestras (con posterior centrifugación). Posteriormente se procedió a inactivar el hongo en autoclave (120 °C por 15 min).

7.3.4. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA FÚNGICA

Para poder estimar la cantidad de biomasa fúngica inoculada, se realizó la determinación de la biomasa seca por el método gravimétrico utilizado por Rodríguez Pérez, Crescencia Arone, Soria Calzadillo, Aguilera Rodríguez, & Serrat Díaz (2017). El método se basó en tomar cuatro cuartos de cada caja de petri con crecimiento de biomasa, se lo llevó a un frasco con 200 ml de agua destilada estéril con agitación magnética, hasta observar el desprendimiento total de la biomasa del agar papa dextrosa (APD). Luego se filtró con un filtro seco y tarado. Se llevó a estufa a 100 °C durante 24 h y se pesó. Con este método se cuantifican las estructuras fúngicas originadas a partir de reproducción sexual y asexual, que tienen los hongos filamentosos, ya sea a partir del micelio como de los esporangióforos, lo que, a nuestro entender, es un resultado más representativo que el método microscópico de recuento de esporas en cámara de Neubauer. La cantidad de

biomasa seca fúngica inoculada se calculó como:

$$m_{BFS} = (P_S - T_F) \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

Donde:

m_{BFS} : masa de biomasa fúngica seca [mg].

P_S : peso seco de filtro más biomasa de hongo [g].

T_F : tara de filtro seco [g].

7.3.5. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.

Se prepararon las muestras de los licores de fermentación de la siguiente manera: se tomaron 2 ml de muestra de cada uno y se acidificaron con 1 ml de H_2SO_4 0.5 N y posterior filtración con filtro de nylon 0.2 micras. Se aplicó la técnica de HPLC, con un cromatógrafo Hewlett Packard 1050, con bomba cuaternaria, detector UV e inyección manual. Se utilizó una Columna Phenomenex PN OOG-4144-E0, SpherecloneODS2 (5um x 250 mm x 4.6 mm), con metanol-agua (60:40) como fase móvil y un flujo de 0.8 ml/min. La detección se fijó a una longitud de onda de 210 nm y el tiempo de corrida fue de 10 min. Se utilizó como reactivo patrón L(+) ácido Láctico 85 % diluido en agua grado HPLC.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. CARACTERIZACION DE ESCOBAJO DE UVA

A continuación se muestra la Tabla 5 en donde se resumen los resultados de la caracterización físico química de los escobajos de uva:

Tabla 5: Caracterización de escobajo de uva

Ensayos	Escobajo de uva blanca		Escobajo de uva tinta	
	Promedio	DE	Promedio	DE
% Sólidos totales	37.32	0.46	23.17	1.14
% Nitrógeno total	0.7765	0.09	1.0154	0.11
% Azúcares reductores	30.55	0.06	47.83	0.02
% Lignina Klason	46.91	0.50	48.52	0.50
% Cenizas	6.64	0.10	7.34	0.07

Respecto al contenido de sólidos totales se observa en la tabla que el escobajo de uva blanca posee mayor contenido que el escobajo de uva tinta. Cabe aclarar que los sólidos totales obtenidos provienen del escobajo recién traído de la bodega, es decir que en esas condiciones sale de la despalladora; por lo tanto, esto complica el manejo del escobajo lo que hace que genere malos olores en la bodega.

En el caso del ensayo de nitrógeno total, se comprobó que los resultados de escobajo de uva blanca como de escobajo de uva tinta eran próximos entre sí, siendo mayor el contenido en escobajo de uva tinta. Los hongos son microorganismos poco exigentes a nivel nutricional, por lo que con un contenido mínimo de nitrógeno es suficiente para el crecimiento del hongo. En base a esto, ambos escobajos de uva podrían utilizarse para llevar a cabo la FES (Groff, y otros, 2022).

Como lo indica la tabla se observa que el porcentaje de azúcares reductores es mayor en el escobajo de uva tinta. De acuerdo al trabajo citado por (Filippi, Georgaka, Alexandri, Papapostolou, & Koutinas (2021) la presencia de azúcares en residuos de bodega depende del proceso de elaboración del vino, además la presencia de azúcares libres en el escobajo de uva indica su potencial utilización como materia prima para la producción de ácido succínico a través de la fermentación. Es decir que en este trabajo se

comprobó que los azúcares libres podían ser directamente usados como sustrato para la producción de ácido succínico. Por otro lado el trabajo citado por Spigno, Moncalvo, De Faveri, & Silva (2014) explica que ante la presencia de hidratos de carbono no estructurales en el escobajo, es decir azúcares derivados del jugo de uva residual, era necesario un pretratamiento de lavado antes de los procesos de fraccionamiento para evitar la producción de azúcares tóxicos como el 5-hidroximetilfurfural, el furfural y el 5-metilfurfural.

Se comprueba que todos poseen alto contenido de lignina, por lo que será de vital importancia el óptimo desarrollo del hongo para el aprovechamiento de los componentes hemicelulósicos. De acuerdo a los datos obtenidos en la tabla se obtuvo mayor porcentaje de lignina en el escobajo de uva tinta (48.52 %) usando como solventes agua/etanol.

De acuerdo a otros trabajos que se usaron para comparar el contenido de lignina en escobajo de uva se obtuvieron los siguientes resultados: respecto al trabajo de Ping, Brosse, Sannigrahi, & Ragauskas (2011) se obtuvo un porcentaje de lignina de Klason de 39.60 % usando Diclorometano (DCM) como solvente extractivo. En el trabajo de Spigno, Pizzorno, & De Faveri (2008) se obtuvo un 32.98 % de Lignina de Klason y usaron como solvente extractivo agua caliente (2x). Según el texto de Prozil, Evtugin, & Cruz Lopes (2012) se obtuvo un porcentaje de Lignina de Klason de 17.40 % y usaron como solventes extractivos acetona/ DCM/agua.

Respecto al porcentaje de cenizas, éste fue mayor en el escobajo de uva tinta. El contenido de cenizas en el escobajo de uva se debe a la presencia de altos contenidos de metales como Na, K, Mg, Fe y Ca, durante el proceso de calcinación. (Deiana, Sardella, Silva, Amaya, & Tancredi, 2009)

8.2. ESTUDIOS DE PRETRATAMIENTOS HIDROLÍCOS DE ESCOBAJO DE UVA

8.2.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Como puede verse en la Tabla 6, la concentración de glucosa obtenida a partir de la hidrólisis con ácido clorhídrico al 5 % es menor que la concentración de glucosa obtenida a partir de la hidrólisis con ácido clorhídrico al 1 %. Debe recordarse que los azúcares que se obtienen a partir de la hidrólisis ácida son: glucosa, xilosa y arabinosa en

mayor proporción. Es posible que a mayor concentración de ácido se obtenga mayor cantidad de xilosa o arabinosa. Esto debería comprobarse por medio de cromatografía líquida de alta presión. Por otro lado, también se debe considerar que la celulosa y hemicelulosa producen azúcares a partir de la hidrólisis y estos azúcares pueden producir furfural a partir de pentosa y 5-hidroximetilfurfural (HMF) a partir de hexosas.

En la Tabla 6 se muestra el promedio y su desviación estándar (DE) de los primeros cuatro ensayos, al igual que de los segundos cuatro ensayos:

Tabla 6: Rendimiento en glucosa a partir de hidrólisis ácida.

Muestra	Tratamiento	Absorbancia	Conc. g/l	Vol. total (l)	Masa de glucosa (g)	%Glucosa (g/100g)	Prom. (g/100g)	DE
Hidrólisis con HCl al 1 %								
1	M1 (1%)	1.5153	4.185	0.4	1.67	3.35	3.58	0.22
2		1.5535	4.291		1.72	3.43		
3		1.6994	4.694		1.88	3.75		
4		1.7102	4.724		1.89	3.78		
Hidrólisis con HCl al 5 %								
1	M2 (5%)	0.9962	2.752	0.4	1.10	2.20	1.69	0.59
2		0.9956	2.750		1.10	2.20		
3		0.5353	1.479		0.59	1.18		
4		0.5344	1.476		0.59	1.18		

8.2.2. HIDRÓLISIS CON AGUA OXIGENADA

Los resultados de rendimiento de glucosa provenientes de la hidrólisis con agua oxigenada, como se observa en la Tabla 7, dieron en todos los casos valores más bajos que la hidrólisis llevada a cabo con ácido clorhídrico. Por esta razón se decidió, en próximos experimentos, aplicar hidrólisis ácidas (con ácido clorhídrico y ácido sulfúrico) y hacer pruebas con hidrólisis alcalina. Se puede observar en la Tabla 7 que se muestra a continuación el promedio de los ensayos con su respectiva DE:

Tabla 7: Rendimiento en glucosa a partir de hidrólisis con agua oxigenada.

Muestra	Tratamiento	Absorbancia	Conc. (g/l)	Vol. total (l)	Masa de glucosa (g)	%Glucosa (g/100g)	Prom. (g/100g)	DE
Hidrólisis con H ₂ O ₂ al 5%								
1	M1 (5%)	1.7920	4.949	0.2	0.99	1.98	1.99	0.01
2		1.7915	4.948		0.99	1.98		
3		1.8138	5.009		1.00	2.00		
4		1.8141	5.010		1.00	2.00		
Hidrólisis con H ₂ O ₂ al 15%								
1	M2 (15%)	2.0000	5.524	0.2	1.10	2.21	2.10	0.12
2		1.9990	5.521		1.10	2.21		
3		1.5366	5.009		1.00	2.00		
4		1.5361	5.010		1.00	2.00		

8.3. FERMENTACIÓN BATCH

8.3.1. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

El *R. Oryzae NCIM 1299* es capaz de producir las enzimas necesarias para llevar a cabo la hidrólisis del material lignocelulósico sin previo tratamiento, descomponiéndolo en azúcares fermentables, los que participan del metabolismo del mismo. Los pretratamientos aplicados al EU, ya sean ácidos o alcalinos, tienen la finalidad de hacer más fácilmente digerible el material lignocelulósico, para un mejor rendimiento de la fermentación con *R. oryzae NCIM 1299*.

Los pretratamientos ácidos descomponen los enlaces entre monómeros de azúcares de las cadenas poliméricas de hemicelulosa y celulosa. Se ha demostrado que la hidrólisis ácida genera principalmente los monómeros xilosa, glucosa y arabinosa, acompañados por materiales solubles como lignina, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos durante el proceso de fermentación posterior (Laopaiboon, Thani, Leelavatcharamas, & Laopaiboon, 2010). Durante el pretratamiento alcalino, se produce la solvatación y saponificación de la matriz lignocelulósica, lo que hace que la hemicelulosa y partes de la lignina se solubilicen, dejándola más accesible para el accionar de los microorganismos. En la Tabla 8 se puede

observar el pretratamiento aplicado de cada muestra y los azúcares reductores, en los cuales se midió la media y desviación estándar:

Tabla 8: Contenido de azúcares reductores de licores obtenidos luego de la hidrólisis y neutralización.

Muestra	Pretratamiento	Az. Reductores	
		Media [g/100gEU]	DE
1	HCl 1 %	2.5982	0.0019
2	HCl 5 %	9.6897	0.0097
3	H ₂ SO ₄ 1 %	2.3155	0.0026
4	H ₂ SO ₄ 5 %	5.1043	0.0399
5	NaOH 0.1 N	1.2308	0.0008
6	NaOH 0.5 N	12.6764	0.0067

Los seis pretratamientos aplicados produjeron la hidrólisis del material lignocelulósico, como puede verse, por la generación de azúcares reductores en función de las diferentes concentraciones de los agentes hidrolizantes. Puede verse además que a mayores concentraciones de agente hidrolizante, mayor es la cantidad de azúcares reductores obtenidos. Esto último debería repercutir directamente en la cantidad de AL obtenido a partir de la fermentación.

Se observó que para los agentes hidrolizantes en su menor concentración, el orden creciente de cantidad de azúcares reductores obtenidos fue: NaOH 0.1 N < H₂SO₄ 1 % < HCl 1 %. En cambio para los agentes hidrolizantes en su mayor concentración, el orden creciente de cantidad de azúcares reductores obtenidos fue: H₂SO₄ 5 % < HCl 5 % < NaOH 0.5 N.

En el estudio citado por Moran Aguilar (2018) el bagazo de caña de azúcar debido a su composición lignocelulósica posee potencial para la generación de productos de valor agregado. Se realizó la optimización de cada etapa del proceso de pretratamiento, para lograr una mayor producción de azúcares fermentables durante la etapa enzimática. En este trabajo se consideraron dos procesos: (1) Pretratamiento ácido y alcalino seguido de la hidrólisis enzimática; (2) Pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática.

Las condiciones en las que se llevó a cabo el pretratamiento ácido para el bagazo de caña de azúcar fueron: 3 % H_2SO_4 , una relación líquido sólido de 6:1 (ml:g) y 15 min, obteniendo una concentración final de 29.17 % g/L de xilosa. En el pretratamiento alcalino las condiciones que removieron la mayor cantidad de lignina fueron: 9% H_2O_2 , relación líquido sólido 19:1 (ml:g) y 44 h; y se obtuvo una concentración de lignina de 2.76 %. Para el proceso (2) las condiciones óptimas utilizando bagazo crudo fueron: 6 % H_2O_2 , relación líquido sólido de 12:1 y 37 h, dando un resultado de 7.54 % de lignina residual. La producción de azúcares finales para el proceso (1) fue de 167.92 g/l y para el proceso (2), 159.57 g/l para el bagazo de caña de azúcar. Se observó que se generó mayor cantidad de azúcares fermentables en el proceso (1) utilizando una etapa ácida y una alcalina antes de la hidrólisis enzimática, sin embargo, el proceso (2) alcanzó una conversión del 80 % en glucosa y 98 % en xilosa, utilizando únicamente un pretratamiento alcalino y una celulasa (Cellic CTec3), lo que disminuye el número de etapas del pretratamiento y el costo del proceso.

Respecto al tratamiento ácido al que se sometió el escobajo, la concentración de glucosa obtenida a partir de la hidrólisis con ácido clorhídrico al 5 % es menor que la concentración de glucosa obtenida a partir de la hidrólisis con ácido clorhídrico al 1 %. En cuanto el tratamiento alcalino, se obtuvo un valor de azúcares mucho mayor al someterse a NaOH 0.5 N, respecto al valor que se obtuvo cuando se sometió el escobajo a NaOH 0.1 N.

8.3.2. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA FÚNGICA

El resultado obtenido fue 47.45 +/- 0.006 mg de biomasa fúngica seca inoculada en cada batch de fermentación. Relacionándolo con el EU, se inoculó 0.949 mg_{BFS}/g_{EU}.

La biomasa fúngica formada durante la fermentación, no pudo cuantificarse debido a la presencia de sales formadas durante la recuperación y extracción del AL.

8.3.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.

El AL producido se cuantificó utilizando la técnica de HPLC. El AL de la solución patrón presentó un pico bien definido con un tiempo de retención promedio de 4.655 minutos. Los cromatogramas de los licores de fermentación de EU hidrolizados, también

presentaron el pico característico de AL. Con los valores de área obtenidos, se realizó el cálculo de la concentración de AL en los licores. En la tabla 9 pueden verse los resultados de la cuantificación de AL, siendo la muestra 7 el licor de fermentación del EU sin hidrolizar. Se obtuvo AL para las diferentes condiciones de hidrólisis, excepto para la hidrólisis con NaOH 0.5 N. Para un determinado agente de hidrólisis, la cantidad de AL obtenido fue proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. A excepción del Erlenmeyer 6. En la Tabla 9 se puede observar los resultados de ácido láctico calculando la media y desviación estándar de cada una de las muestras, como así también la productividad (P) de cada una de las muestras, calculando media y desviación estándar:

Tabla 9: Producción de ácido láctico.

Muestra	% Ácido láctico		Productividad (P)	
	Media (gAL/100gEU)	DE	Media (gAL/gEU.día)	DE
1	35.89	1.75	0.0513	0.0025
2	60.35	3.38	0.0862	0.0048
3	48.47	5.54	0.0692	0.0079
4	71.26	4.91	0.1018	0.0070
5	16.10	2.00	0.0230	0.0029
6	SC	-	-	-
7	9.74	0.45	0.0139	0.0007

SC: sin crecimiento

El Batch 6 de hidrólisis de EU con NaOH 0.5 N, no tuvo crecimiento de *R. oryzae* NCIM 1299, lo cual podría asignarse a un alto contenido de sales solubles (producidas en la neutralización), que pueden generar un aumento en la presión osmótica del medio, dificultando el crecimiento del hongo. Pero al analizar los números de moles utilizados, en la condición de hidrólisis con HCl 5 % comparada con la hidrólisis con NaOH 0.5 N, resulta en que la solución ácida posee una mayor cantidad de iones y sin embargo hubo crecimiento de hongo, por lo tanto se descarta esta hipótesis. Por otro lado se encontró que en concentraciones altas de álcalis, se corre el riesgo de degradación y

descomposición de polisacáridos disueltos de hemicelulosa, con pérdida de carbono en forma de dióxido de carbono y furfural, lo que conduce a pérdidas de sustrato digerible para la fermentación. Además, los compuestos fenólicos monoméricos de lignina liberados (ácidos aromáticos, catecol, 4- hidroxibenzaldehído y vainillina), son inhibidores potenciales de microorganismos. Estos últimos pueden ser las causas de esta inhibición. Los resultados obtenidos en este capítulo pueden relacionarse a valores de AL, a partir de la fermentación con *R. oryzae* de otras biomásas lignocelulósicas, como por ejemplo: residuos sólidos de ananá (RSA) sin hidrolizar, con un rendimiento de 2.36 gAL/100gRSA; hidrolizado de mazorca de maíz, con un rendimiento de 36.2 gAL/litro; y pulpa de mandioca (PM), obteniendo 20.6gAL/100gPMseca.

Para poder comparar los resultados obtenidos se realizó la búsqueda de otros trabajos que se muestran a continuación, donde se pudo observar como otros autores (Bustos, De la Torre, Martínez, Casares, & Domarco, 2004) a partir de azúcares reductores obtuvieron ácidos y por otro lado otros autores realizaron pretratamientos con H₂O₂ y ácido para la obtención de azúcares (Moran Aguilar, 2018).

En el estudio de Bustos, De la Torre, Martínez, Casares, & Domarco (2004), se emplearon en distintas concentraciones borras procedentes del proceso de elaboración de vinos blancos y tintos como nutrientes, usando podas de sarmiento como fuente de carbono, ya que son una fuente de azúcares hemicelulósicos asimilables por *Lactobacillus Pentosus*. Las podas se sometieron a un proceso de prehidrólisis con H₂SO₄ al 3 % durante 15 min a 130 °C. Al utilizar las lías procedentes de vino blanco se obtuvieron concentraciones de ácido láctico superiores a las obtenidas utilizando el medio general de *Lactobacillus*. Se obtuvieron rendimientos comprendidos entre 0.43 y 0.59 g/g. El H₂SO₄ presente en los licores se neutralizó con CaCO₃ hasta alcanzar un pH de 6.3. En este experimento las borras se liofilizaron. Al añadir lías de vinificación liofilizadas como nutriente al medio de fermentación, los azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) fueron consumidos. De este modo se obtuvieron elevadas concentraciones de ácido láctico.

No se encontró un trabajo referido al pretratamiento de escobajo de uva con peróxido por lo tanto se hablará del bagazo de caña de azúcar (Moran Aguilar, 2018). El bagazo de caña de azúcar debido a su composición lignocelulósica posee potencial para

la generación de productos de valor agregado. Se realizó la optimización de cada etapa del proceso de pretratamiento, para lograr una mayor producción de azúcares fermentables durante la etapa enzimática. En este trabajo se consideraron dos procesos: proceso (1), pretratamiento ácido y alcalino seguido de la hidrólisis enzimática; proceso (2), pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática. Las condiciones en las que se llevó a cabo el pretratamiento ácido fue: para el bagazo de caña de azúcar fueron: 3% H_2SO_4 , una relación líquido sólido (ml:g) de 6:1 y 15 min, obteniendo una concentración final de 29.17 % g/L de xilosa. En el pretratamiento alcalino las condiciones que removieron la mayor cantidad de lignina fueron: 9% H_2O_2 , relación líquido sólido (ml:g) 19:1 y 44 h; y se obtuvo una concentración de lignina de 2.76 %. Para el proceso (2) las condiciones óptimas utilizando bagazo crudo fueron: 6% H_2O_2 , relación líquido sólido de 12:1 y 37 h, dando un resultado de 7.54 % de lignina residual. La producción de azúcares finales para el proceso (1) fue de 167.92 g/L y para el proceso (2), 159.57 g/L para el bagazo de caña de azúcar. Se observó que se generó mayor cantidad de azúcares fermentables en el proceso (1) utilizando una etapa ácida y una alcalina antes de la hidrólisis enzimática, sin embargo, el proceso (2) alcanzó una conversión del 80% en glucosa y 98 % en xilosa, utilizando únicamente un pretratamiento alcalino y una celulasa (Cellic CTec3), lo que disminuye el número de etapas del pretratamiento y el costo del proceso.

9. CONCLUSIONES

9.1. CARACTERIZACION DE ESCOBAJO DE UVA

Tanto el escobajo de uva blanca como el escobajo de uva tinta poseen un contenido apreciable de azúcares reductores fermentables fácilmente disponibles para el hongo, pudiendo ser utilizado como fuente de carbono inicial de la fermentación fúngica.

Se pudo comprobar que presentan similar contenido de nitrógeno, fuente que el hongo utiliza para su metabolismo fermentativo.

Además, se comprueba que el escobajo de uva tinta posee alto contenido de lignina, por lo que será de vital importancia el óptimo desarrollo del hongo para el aprovechamiento de los componentes hemicelulósicos.

Finalmente, el escobajo de uva analizado podría aprovecharse como sustrato de fermentación del *R. oryzae*, por lo que deben estudiarse los parámetros óptimos de fermentación en futuros trabajos.

9.2. ESTUDIO DE PRETRATAMIENTOS HIDROLÍTICOS DE ESCOBAJO DE UVA

En la FES, los microorganismos crecen en un sustrato sólido con bajo contenido de humedad, mientras que en la FS, la fermentación ocurre por microorganismos que crecen en un medio líquido (más del 95 % de agua). Además en esta fermentación se usan equipos costosos, y por lo tanto se aumenta el costo del proceso. Por último, la FS presenta gran dificultad en la eliminación de desechos y para llevarla a cabo se necesita alto consumo de energía y agua.

Además cabe aclarar que la FES usa productos de la agricultura o subproductos de agroindustrias, por lo tanto, los sustratos son más baratos y fácilmente disponibles. Se podría pensar que habría que someter a estos sustratos a tratamientos que faciliten la obtención de azúcares fermentables, lo que aumentaría el costo general del proceso, además de generar efluentes contaminantes. Pero este no es el caso cuando se desea utilizar *R. oryzae*, ya que se ha podido demostrar que se obtiene un rendimiento adecuado de AL sin aplicar pretratamientos al escobajo de uva. Esto representa una ventaja económica y medioambiental.

9.3. FERMENTACIÓN BATCH

Se pudo obtener AL a partir de la fermentación fúngica del EU sin pretratamiento y en un valor significativo (9.74 %) comparado con otras fuentes lignocelulósicas. Se debe avanzar en estudios de los componentes lignocelulósicos y en el efecto del uso de pretratamiento (hidrólisis) del EU sobre el rendimiento de AL obtenido. Los azúcares obtenidos luego de la hidrólisis de hemicelulosa y celulosa serían los azúcares utilizados en la fermentación del *R. oryzae*, pero este hongo es conocido por su capacidad de degradar la materia lignocelulósica sin pretratar. Teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos, podría decirse que un pretratamiento de hidrólisis aumentó dichos valores. Un trabajo a futuro podría ser el estudio de los siguientes parámetros: aireación, concentración de esporas, tiempo de fermentación.

Se ha demostrado que el EU puede utilizarse como sustrato de fermentación del *R. oryzae* NCIM 1299 para la obtención de AL, el cual tiene grandes aplicaciones en la industria de alimentos. Este bioproceso podría ser de gran interés en una provincia como San Juan, en donde se produce gran cantidad de EU durante la época de vendimia y no tiene un destino final de aprovechamiento. Además, se podría proponer una alternativa económica de producción de AL, siendo que en Argentina no hay producción local.

10. BIBLIOGRAFIA

- Alves de Oliveira, R., Komesu, A., Vaz Rossell, C., & Maciel Filho, R. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 219-239.
- Aziman, S., Tumari, H., & Zain, N. (2015). Determination of lactic acid production by *rhizopus oryzae* in solid state fermentation of pineapple waste. *Jurnal Teknologi*, 77(31).
- Domínguez Espinosa, R., Gil Horán, R., & Pacho Carrillo, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnología, ciencia, educación*, 23(2), 79-90, 79-90.
- Hickman, D., Hossain, M., Song, H., Araya, Y., Solórzano, A., & Perez, D. (2008). An avian live attenuated master backbone for potential use in epidemic and pandemic influenza vaccines. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 11), 2682-2690.
- Juodeikienea, G., Vidmantienė, D., Basinskiene, L., Cernauskas, D., Bartkiene, E., & Cizeikienea, D. (2015). Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis. *Catalysis Today*, 239, 11-16.
- Krishna, B., Nikhilesh, G., Tarun, B., Saibaba K V, N., & Gopinadh, R. (2018). Industrial production of lactic acid and its applications. *International Journal of Biotech Research*, 1(1), 42-54.
- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., A. Ruiz, H., Ascacio-Valdés, J., Aguilar-Gonzalez, M., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2017). *Rhizopus oryzae*—Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International journal of food microbiology*, 257, 110-127.
- Mtui, G. (2009). Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology*, 8(8).
- Ping, L., Brosse, N., Sannigrahi, P., & Ragauskas, A. (2011). Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial crops and products*, 33(1), 200-204.
- Spigno, G., Pizzorno, T., & De Faveri, D. (2008). Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology*, 99(10), 4329-4337.
- Triviño Pineda, J., Reyes, C., & Sánchez Ramírez, J. (2021). Subproductos generados en el tratamiento y valorización de residuos sólidos urbanos dentro del concepto de biorrefinería: una revisión sistemática. *Ingeniería y Región*, 25, 60-74.
- Triviño Pineda, J., Reyes, C., & Sánchez Ramírez, J. (2021). Subproductos generados en el tratamiento y valorización de residuos sólidos urbanos dentro del concepto de biorrefinería: una revisión sistemática. *Ingeniería y Región*, 25, 60-74.
- Wheeler, J., Machín Ferrero, L., Jeger, P., Salas Tonello, I., & Mele, F. (2018). Diseño y optimización de la cadena de suministros de biorrefinerías de caña de azúcar. *In I*

Simposio Argentino de Informática Industrial e Investigación Operativa (SIIIO 2018)- JAIIO 47 (CABA, 2018)., 1-14.

- Yang, S.-T., Enshay, H., & Thongchul, N. (2013). *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers.*
- Alarcón Cañola, A., & Caicedo Cañola, M. (2021). Obtención de ácido láctico a partir del almidón presente en la cáscara de plátano (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química).
- Araya-Cloutier, C., Rojas-Garbanzo, C., & Velázquez-Carillo, C. (2010). Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (Ananas comosus), para su uso como materia prima en la elaboración de ácidopoliláctico. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(7), 407-416.
- Area, M., & Vallejos, M. (2016). Bio-productos y bio-materiales a partir de la biorrefinería de residuos agro y forestoindustriales. *Panorama de la industria de celulosa y papel y materiales lignocelulósicos*, 120-151.
- Bhargav, S., Panda, B., Ali, M., & Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: an overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(1), 49-70.
- Bustos, G., De la Torre, N., Martínez, M., Casares, A., & Domarco, Y. (2004). Evaluación de azúcares hemicelulósicos de las podas de sarmiento y lías de vinificación como medio nutritivo para la producción de ácido láctico por *Lactobacillus Pentosus*. *CYTA-Journal of Food*, 4(4), 283-291.
- Dagnino, E., de Castro, A., Campestrini, S., & Chamorro, E. (2019). Biorrefinería del residuo de la producción de arroz: Revalorización de la fracción hemicelulósica. *Accelerating the world's research*.
- De la Torre, N., Bustos, G., Martínez, M., Casares, A., & Domarco, Y. (2004). EVALUACIÓN DE AZÚCARES HEMICELULÓSICOS DE LAS PODAS DE SARMIENTO Y LÍAS DE VINIFICACIÓN COMO MEDIO NUTRITIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR *LACTOBACILLUS PENTOSUS* EVALUATION OF HEMICELLULOSE SUGARS FROM VINE-TRIMMING WASTES AND VINIFICATION LEE. *CYTA-Journal of Food*, 4(4), 283-291., 283-291.
- Deiana, A., Sardella, M., Silva, H., Amaya, A., & Tancredi, N. (2009). Use of grape stalk, a waste of the viticulture industry, to obtain activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 172(1), 13-19. *Journal of Hazardous Materials*, 172(1), 13-19.
- Ding, S., & Tan, T. (2006). Ding S, Tan T (2006). L-Lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using. *Process Biochemistry*, 41(6), 1451-1454.
- Dominguez, J., & Vázquez, M. (1999). Efecto De Las Condiciones De Operación En La Producción De Acido l-láctico Por *Rhizopus Oryzae*. *CYTA-Journal of Food*, 2(3), 113-118.

- Fernández Acosta, K. A. (2013). *Evaluación técnico-económica de alternativas de adaptación tecnológicas para biorrefinerías en una industria de la caña de azúcar*. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.
- Fernandez Mayer, A. (2021). Actualización sobre el uso del orujo de uva en producción animal de carne y leche. 25-30.
- Fernández Mayer, A. (s.f.). Orujo de uva.
- Filippi, K., Georgaka, N., Alexandri, M., Papapostolou, H., & Koutinas, A. (2021). Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. *Industrial Crops and Products*, 168, 113578.
- García González, M. (2019). Láctica, estudio de la fermentación ácido. *Facultad de Ingeniería Química*.
- García, C., Arrázola, G., & Durango, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Revisión de literatura*, 9-26.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aquil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., . . . 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.
- Gimenez, M., Morandi, C., Orozco, I., Sardella, M., Sapag, K., & Deiana, C. (2013). *Escobajo de uva activado químicamente como adsorbente de metales pesados*. 1-20: AAIQ, Asociación Argentina de Ingenieros Químicos-CSPQ.
- Gómez Millán, G. (2015). Biorrefinerías, sistemas integrados para el futuro. *Ciencia y Desarrollo*, 34-57.
- Groff, M., Scaglia, G., Gaido, M., Kasshwa, D., Ortiz, O., & Noriega, S. (2022). Kinetic modeling of fungal biomass growth and lactic acid production in *Rhizopus oryzae* fermentation by using grape stalk as a solid substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39, 102255.
- INV. (2022). *Infrme Anual Cosecha 2021 Argentina*. Mendoza.
- Komesu, A. M., Maciel, M. R., & Filho, R. (2017). Separation and purification technologies for lactic acid—A brief review. *BioResources*, 6885-6901.
- Komesu, A., Wolf Maciel, M., Rocha de Oliveira, J., da Silva Martins, L., & Filho, R. (2017). Purification of lactic acid produced by fermentation: focus on non-traditional distillation processes. *Separation & Purification Reviews*, 46(3), 241-254.
- Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V., & Laopaiboon, L. (2010). Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource technology*, 101(3), 1036-1043.
- Manan, M., & Webb, C. (2017). Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *J Appl Biotechnol Bioeng*, 4(1), 511-532.

- Martinez Hernández, E. (2015). Biorrefinerías Sustentables. *Ciencia y Desarrollo*, 34-39.
- Medina, J., García, F., Paricaguán, B., Rojas, J., Castro, X., & Lugo, F. (2014). Obtención de ácido láctico por fermentación del mosto del fruto de cují (*Prosopis juliflora*) y su posterior poli-condensación con zinc metálico a poli (ácido láctico)(pla). *Revista Ingeniería UC*, 21(2), 52-59.
- Meussen, B., Graaff, L., Sanders, J., & Weusthuis, R. (2012). Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production. *Applied microbiology and biotechnology* 94(4), 875-886.
- Moran Aguilar, M. (2018). *Estudio de la sacarificación del bagazo de caña de azúcar y Agave angustifolia para la producción de azúcares fermentables*.
- Munilla, M. H., & Carracedo, G. B. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 49-59.
- Phruksawan, P., Kulpreecha, S., Sooksai, S., & Thongchul, N. (2012). Direct fermentation of L (+)-lactic acid from cassava pulp by solid state culture of *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(8), 1429-1436.
- Prozil, S., Evtuguin, D., & Cruz Lopes, L. (2012). Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 178-184.
- Rodríguez Pérez, S., Crescencia Arone, M., Soria Calzadillo, J., Aguilera Rodríguez, I., & Serrat Díaz, M. (2017). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *Afinidad*, 74(577).
- Rojan P., J., K. Madhavan Nampoothiri, & Pandey, A. (2006). Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41(4), 759-763.
- Rojas, A., Montaña, L., & Bastidas, M. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 5-10.
- Romero-Uscanga, E., Montero-Alpírez, G., Toscano-Palomar, L., Pérez-Pelayo, L., Torres-Ramos, R., & Beleño-Cabarcas, M. (2014). Determinación de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica; celulosa, hemicelulosa y lignina de la paja de trigo para su posterior pretratamiento biológico. *In Conferencia: XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas, Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes*. Mexicali, Baja California.
- Ruiz Moreno, M., Raposo, R., Cayuela, J., Zafrilla, P., Piñeiro, Z., Moreno Rojas, J., . . . Cantos Villar, E. (2015). Valorization of grape stems. *Industrial Crops and Products*, 63, 152-157.
- Serna-Cock, & Rodriguez de Stouvenel. (2005). Produccion biotecnologica de acido lactico: estado del arte biotechnological production of lactic acid: state of the art produccion biotecnologica de acido lactico: estado do arte. *CYTA-Journal of food*, 5(1), 54-65.

- Serna-Cock, L., & Rodríguez-de , S. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 54–65.
- Spigno, G., Moncalvo, A., De Faveri, D., & Silva, A. (2014). Valorisation of stalks from different grape cultivars for sugars recovery. *In International Conference on BioMass (iconBM) (pp. 745-750). AIDIC Servizi Srl.*
- Vuan Lanusse, M. V. (2018). Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., & Ryu, H.-W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 163-172.
- Zulcali, M., & Ali, H. (2011). Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 25(2), 255-266.