

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“OBTENCIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) UTILIZANDO
ÁCIDO LÁCTICO DE ORIGEN BIOLÓGICO FERMENTADO POR
CEPAS DE *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* EN UN
BIORREACTOR PFTR”**

Tesis presentada por el Bachiller:

Torres Cárdenas, Hans

para optar el Título Profesional de:
Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

**Ing. Francisco Javier Roque
Rodríguez**

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 15044424

N° Trámite en Fac. 254-2015

Fecha Recep. Fac. 05-11-2015

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

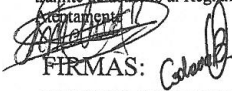
DE: **TORRES CARDENAS, Hans**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"PRODUCCION SUSTENTABLE DE PLASTICO BIODEGRADABLE (PLA'S) UTILIZANDO ACIDO LACTICO DE ORIGEN BIOLÓGICO FERMENTADO POR CEPAS NATIVAS DE Lactobacillus casei Y Staphylococcus aureus"

DICTAMINADORES: 1) **Ing. Cinthia Córdova Barrios** 2) **Mgter. Fredy Molina Rodríguez**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"OBTENCION SUSTENTABLE DE PLASTICO BIODEGRADABLE (PLA'S) UTILIZANDO ACIDO LACTICO DE ORIGEN BIOLÓGICO FERMENTADO POR CEPAS NATIVAS DE Lactobacillus casei Y Staphylococcus aureus EN UN BIORREACTOR PFTR"** después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA

ASESOR: **Ing. Francisco Roque Rodríguez**

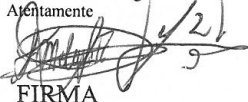
DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

FIRMA  FECHA 27/06/2017

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Ing. Cinthia Córdova Barrios** 3) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**
2) **Ing. Cifrido Zaravia Sánchez**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis intitulado: **"OBTENCIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) UTILIZANDO ÁCIDO LÁCTICO DE ORIGEN BIOLÓGICO FERMENTADO POR CEPAS DE Lactobacillus casei Y Staphylococcus aureus EN UN BIORREACTOR PFTR"** y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 28/09/19

JURADOS: PRESIDENTE **ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS**
VOCAL **ING. CIFRIDO ZARAVIA SANCHEZ**
SECRETARIO **DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ**

FECHA 19/0/19 HORA 19.00 LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO  FECHA

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios y a mis Padres. A Dios porque ha estado conmigo en todo momento, guiándome, dándome fortaleza, sabiduría e inteligencia para poder culminar esta tesis, a mis Padres por la semilla de superación que han sembrado en mí. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar, ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad.



AGRADECIMIENTO

A Dios. Por estar conmigo en cada momento de mi vida; por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a todas aquellas personas que han sido un soporte y compañía durante mis estudios.

A mis Padres y Hermanos, por ser los pilares de mi vida y demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, por toda la confianza depositada en mí y enseñarme valores. “Que todo lo puedo en Cristo que me fortalece”.

Al Ing. Francisco Javier Roque Rodríguez, asesor de tesis, por su disposición para transmitir su conocimiento y experiencia.

Dra. María Rosario Valderrama Valencia, quien me brindo su valiosa y desinteresada orientación guiándome en la elaboración del presente trabajo de investigación.

A la Mg. Cinthia Córdova Barrios, Por darme consejos y enseñanzas en todo el desarrollo de mi carrera universitaria, por ser una amiga en quien puedo confiar y por darme valiosos aportes para el desarrollo de esta investigación.

Al Ing. Cifrido Zaravia Sánchez y al Dr. Fredy Nicolás Molina Rodríguez, miembros del tribunal de tesis, por su colaboración en todo momento, por sus sugerencias, por su tiempo y apoyo en la culminación de mi tesis.

A la Universidad Católica de Santa María y a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas y a todos los profesores, por abrirme las puertas, por trasmitirme sus conocimientos y entregando siempre lo mejor en mi formación profesional.

A los ingenieros de SEDAPAR: Ing. Rosa María Jiménez Milón y al Ing. Pompeyo Medina Moran, con su valioso aporte de conocimientos y apoyo desinteresado en el laboratorio de control de calidad.

A todos mis amigos, que de una u otra manera ayudaron en el desarrollo de esta investigación estando en esta etapa de mi vida; brindándome sus conocimientos y apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	IV
ABREVIATURAS.....	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUCCIÓN	XIX
OBJETIVOS.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	1
HIPÓTESIS	2
VARIABLES INDEPENDIENTES:	2
VARIABLES DEPENDIENTES:.....	2
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. LA INDUSTRIA BIOTECNOLÓGICA.....	5
1.2 BASES TEÓRICAS	5
1.2.1 PLÁSTICOS BIODEGRADABLES O BIOPOLÍMEROS.....	5
1.2.2 CEPAS MICROBIOLÓGICAS GENERADORAS DE ÁCIDO LÁCTICO.....	7
1.2.3 RESIDUOS DE INDUSTRIA LÁCTEA (LACTO SUERO).....	10
1.2.4 SISTEMAS BIOLÓGICOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (BIORREACTOR).....	11
1.2.4.1 Biorreactor de Tipo PFTR (Reactor de Tubo con Flujo Pistón).....	11
1.2.4.2 Proceso Down Stream.....	15
1.2.5. ESTERIFICACIÓN	16

1.2.6 MÉTODO ROP.....	17
1.2.7. MÉTODOS INSTRUMENTALES EMERGENTES PARA LA CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE POLÍMEROS.	19
1.2.7.1. La Transformación de Fourier de la Radiación Infrarroja (FT-IR)	19
CAPÍTULO II	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	27
2.2. MATERIALES	27
2.2.1 MATERIAL DE VIDRIO.....	27
2.2.2 REACTIVOS.....	28
2.2.3 MATERIAL BIOLÓGICO:.....	28
2.2.4 INSTRUMENTOS Y EQUIPOS:	29
2.2.5 OTROS.....	29
2.3. MÉTODOS	30
2.3.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO.....	30
2.3.1.1. Aislamiento de Cepas Bacterianas Productoras de Ácido Láctico..	30
Lactobacillus casei	31
2.3.1.2. Identificación de Cepas Productoras de Ácido Láctico.....	32
2.3.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DEL LACTOBACILLUS CASEI Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS.	33
2.3.3. INMOVILIZACIÓN POR ENTRAMPAMIENTO CELULAR	33
2.3.4. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR PFTR	34
2.3.4.1. Determinación de las Dimensiones del Biorreactor PFTR	35
2.3.5. PUESTA EN MARCHA DEL BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	36
2.3.6. DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO POR LAS CEPAS DE LACTOBACILLUS CASEI Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	36

2.3.7. POLIMERIZACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (AL) A ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA)	38
.....	
2.3.7.1. Esterificación	38
2.3.7.2. Método de Ruptura del Anillo Polimérico (ROP: ring opening polymerization)	38
.....	
2.3.8. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO POLILÁCTICO	39
.....	
2.3.8.1. Análisis de Determinación de Espectrofotometría Infrarroja (FT-IR).	39
.....	
CAPÍTULO III	41
.....	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
.....	
3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO	41
.....	
3.1.1. AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO	41
.....	
Caracterización Macroscópica	41
Lactobacillus casei	41
Staphylococcus aureus	42
.....	
3.1.2. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO	44
.....	
Lactobacillus casei	44
Staphylococcus aureus	44
.....	
3.2 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA O CRECIMIENTO MÁXIMO DEL LACTOBACILLUS CASEI Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS	48
.....	
3.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE ÁMBAS CEPAS	48
.....	
3.3 INMOVILIZACIÓN POR ENTRAMPAMIENTO CELULAR	52
.....	
3.4 CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR PFTR	53
.....	
3.4.1 DISEÑO DEL BIORREACTOR PFTR	53
.....	
3.4.1.1 Biorreactor PFTR- Plano 2D	54
553.4.1.2 Biorreactor PFTR- Plano 3D	55

3.4.2 CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR PFTR	56
3.4.3. DETERMINACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL BIORREACTOR PFTR.....	57
3.5. PUESTA EN MARCHA DEL BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	59
3.6. DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO POR LAS CEPAS DE LACTOBACILLUS CASEI Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS.	61
3.7. POLIMERIZACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (AL) A ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA).....	66
3.7.1 ESTERIFICACIÓN	66
3.7.2 MÉTODO DE RUPTURA DEL ANILLO POLIMÉRICO (ROP: RING OPENING POLYMERIZATION).....	67
3.8 CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO POLILACTICO (PLA).....	69
3.8.1. ANÁLISIS DE DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (FT-IR)	69
CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	85
ANEXO 1.....	85
ANEXO 2.....	85
ANEXO 3.....	86
ANEXO 4.....	91
ANEXO 5.....	91
ANEXO 6.....	92
ANEXO 7.....	94
ANEXO 8.....	95
ANEXO 9.....	97
ANEXO 10.....	97

ANEXO 11	98
ANEXO 12	99
ANEXO 13	101
ANEXO 14	102
ANEXO 15	104



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Estructura Química de Ácido Álgínico + Calcio	13
Figura N° 2: Precipitación en Pera de Decantación	15
Figura N° 3: Tipos de Estereoisómeros del ácido láctico	16
Figura N° 4: Reacción de Esterificación del Ácido Láctico a PLA	17
Figura N° 5: Reacción por método ROP para obtención de L-lactida	18
Figura N° 6: Vista Macroscópica de las Colonias de Lactobacillus casei	42
Figura N° 7: Vista Macroscópica de las Colonias de Staphylococcus aureus	43
Figura N° 8: Vista microscópica de Lactobacillus casei con un lente de 100 X .	44
Figura N° 9: Vista Microscópica Staphylococcus aureus con un lente de 100 X	45
Figura N° 10: Verificación en APIWEB TM de Staphylococcus aureus	46
Figura N° 11: Comprobación de los 7 dígitos obtenidos del Kit de API STAPH de Staphylococcus aureus	47
Figura N° 12: Verificación en APIWEB TM de Lactobacillus casei.....	47
Figura N° 13: Comprobación de los 7 dígitos obtenidos del Kit de API.....	48
Figura N° 14: Rango de crecimiento de la bacteria <i>Lactobacillus casei</i>.....	49
Figura N° 15: Rango de crecimiento de la bacteria Staphylococcus aureus.	49
Figura N° 16: Curva de crecimiento relacionando en gramos de bacterias con el tiempo de la cepa de Lactobacillus casei	50
Figura N° 17: Curva de crecimiento relacionando en gramos de bacterias con el tiempo de la cepa de Staphylococcus aureus.	50
Figura N° 18: Curva de cinética bacteriana de la cepa de Lactobacillus casei ..	51
Figura N° 19: Curva de cinética bacteriana de la cepa Staphylococcus aureus	51
Figura N° 20: Planos de diseño del Biorreactor PFTR en 2D	54
Figura N° 21: Plano del diseño en 3D del Biorreactor PFTR	55
Figura N° 22: Biorreactor PFTR– Flujo pistón	56
Figura N° 23: Medición del pH de la muestra de ácido.....	60
Figura N° 24: Medición de pH de la muestra de Ácido Láctico para la fermentación de S. aureus.	60
Figura N° 25: Proceso de Precipitación del Ácido Láctico.....	61

Figura N° 26: Espectro FTIR de la muestras de Ácido Láctico producidas por la cepa de Lactobacillus casei (Fermentado Hans Torres 1) y la cepa Staphylococcus aureus (Fermentado Hans Torres 2).	64
Figura N° 27: Espectro FTIR de la muestra de Ácido Láctico y la resta espectral de agua.	65
Figura N° 28: Proceso de Esterificación	66
Figura N° 29: Matraz que contiene Lactida de coloración caramelo oscuro	67
Figura N° 30: Observamos obtención del sedimento blanquecino.	68
Figura N° 31: Resultados del FT-IR para la Muestra de Ácido Poliláctico (PLA)	70
Figura N° 32: Picos del espectro del FT-IR para muestra de Ácido Poliláctico.	71
Figura N° 33: Comparación de espectros de la biblioteca espectral de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos FT-IR.	72
Figura N° 34: Matraz izquierdo medio Manitol Salado de color Rojo Cereza y matraz derecho medio Rogosa de color Marrón	86
Figura N° 35: Cuadrantes de la cámara de Neubauer	93
Figura N° 36: Muestra de corte de leche	99
Figura N° 37: Lacto-suero con tres fases, oleosa, líquida y sólida	100
Figura N° 38: Comparación de la producción de Ácido Láctico entre las dos cepas.	101
Figura N° 39: Realización del método ROP en laboratorios fisicoquímica de la empresa de SEDAPAR	102
Figura N° 40: Mezcla de Lactida más alcohol metílico en agitación magnética.	102
Figura N° 41: A la izquierda formación de la coloración Cajeta con aroma acaramelada y a la derecha mezcla de Lactida + Alcohol Metílico + Cloruro de Estaño II	103
Figura N° 42: Síntesis del Ácido Poliláctico (PLA)	103
Figura N° 43: Diagrama de proceso de transformación de Ácido Láctico	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Tabla primaria de referencias de las cepas productoras de Ácido Láctico.	9
Tabla N° 2: Taxonomía de las cepas productoras de Ácido Láctico	10
Tabla N° 3: Descripción macroscópicas del Lactobacillus casei.....	42
Tabla N° 4: Descripción macroscópica de Staphylococcus aureus.....	43
Tabla N° 5: Comparación Microscópica de Ambas Cepas.	45
Tabla N° 6: Prueba de Formación de Perlas de Alginato Relacionada con la Concentración de CaCl₂.....	52
Tabla N° 7: Dimensiones del Tubo Interno del Biorreactor de tipo PFTR	57
Tabla N° 8: Comparación de acidez entre las cepas de Lactobacillus casei y Staphylococcus aureus, con respecto a la temperatura de medición	61
Tabla N° 9: Determinación del Ácido Láctico obtenido a partir de la fermentación del Lactobacillus casei frente al obtenido del Staphylococcus aureus.	63
Tabla N° 10: Requerimientos para la preparación del medio Rogosa	85
Tabla N° 11: Requerimientos para la preparación del medio Manitol Salado ..	85
Tabla N° 12: Preparación de la Tinción de Gram	87
Tabla N° 13: Batería de pruebas bioquímicas para API20.	90
Tabla N° 14: Tabla de datos para la elaboración de curvas de crecimiento para la cepa de Lactobacillus casei.....	94
Tabla N° 15: Tabla de datos para la elaboración de curvas de crecimiento para la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	95
Tabla N° 16: Composición para la preparación del caldo incubadora Rogosa .	97
Tabla N° 17: Muestra el resultado de la concentración del caldo semillero.....	98

ABREVIATURAS

PFTR	Reactor de tubo con flujo pistón.
RB4	Biorreactor tipo turbidostato.
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada.
TRH	Tiempo de residencia hidráulico.
OD	Oxígeno disuelto (ppm)
L. casei	Cepa <i>Lactobacillus casei</i>
S. sureus	Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>
OTR	Cantidad de oxígeno que se disuelve en el medio ($\text{mgO}_2\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
OUR	Cantidad de oxígeno pasa del medio a la célula. ($\text{mgO}_2\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
Cl	Concentración de oxígeno disuelto. (ppm)
HP	Caballos de fuerza.

LISTA DE SÍMBOLOS

t	Tiempo.
λ	Cinética de crecimiento bacteriano.
$M^{1/3}$	Cantidad de biomasa bacteriana en un periodo de tiempo. ($\text{gr}^{0.333} \cdot \text{h}^{-1}$)
C^*l	Concentración de oxígeno disuelto saturado.
Kla	Coficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. (min^{-1})
E	Espacio hueco.
Ψ	Espacio ocupado.
A	Absorbancia de la muestra patrón.
A	Absortividad de los patrones.
b	Longitud del ancho de la celda del espectrofotómetro.
C	Concentración de la muestra patrón.

RESUMEN

En esta investigación se buscó obtener Ácido Poliláctico (PLA) utilizando Ácido Láctico de origen biológico fermentado por cepas nativas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* en un biorreactor PFTR. El biorreactor diseñado tiene un volumen total de 1.236 litros, trabajó a una temperatura de 36 °C.

El procedimiento se inició con el aislamiento, caracterización e identificación de dos microorganismos. Las cepas bacterianas fueron *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* que se sembraron en sus respectivos medios de cultivos selectivos, que fueron para *Lactobacillus casei* el medio Rogosa y para *Staphylococcus aureus* el medio Manitol Salado. Posteriormente se procedió a determinar la cinética de cada cepa de acuerdo al conteo celular directo mediante el uso de una Cámara de Neubauer dando como resultado, 16.000 Cel/mm³ para la cepa de *Lactobacillus casei* y 28.000 Cel/mm³ para la cepa de *Staphylococcus aureus*. Las cepas nativas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* se adaptaron a un medio especial de producción específico para Ácido Láctico.

Una vez reunido estos datos, se procedió al encapsulamiento en perlas de Alginato de sodio con mezcla de CaCl_2 , que posteriormente fueron llenadas en el Biorreactor PFTR, dicho reactor biológico fue diseñado y construido según las exigencias de las bacterias y de la producción requerida de Ácido Láctico (AL). Para ello se diseñaron modelos en 2D y 3D que simulaban la construcción del reactor biológico tipo Flujo Pistón (PFTR).

Luego de producir Ácido Láctico fermentado, posteriormente se realizó un análisis de Espectrofotometría Infrarroja (FT-IR) en donde declara que la cepa de *Lactobacillus casei*, dio una probabilidad de 80% mientras que la cepa de *Staphylococcus aureus*, dio una probabilidad de 73% a Ácido Láctico, según la biblioteca espectral de la Universidad Nacional de San Agustín, lo cual permitió concluir que la cepa nativa de *Lactobacillus casei* aislada presentó mayor *performance* para generar Ácido Láctico utilizando unidades de reacciones biológicas en condiciones de operación como sistema de tipo Flujo Pistón (PFTR), se procedió a la conversión de Ácido Láctico a Ácido Poliláctico (PLA), mediante el método de esterificación y método (ROP) de polimerización, obteniendo como resultado final una muestra blanquecina viscosa, dicha muestra fue analizada mediante el método de Espectrofotometría Infrarroja (FT-IR), para su caracterización, llegando a determinar que la muestra analizada tiene una probabilidad de un 93.10% de ser Ácido Poliláctico según la biblioteca espectral de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la facultad de Química e Ingeniería Química “USAQ”.

Palabras clave: PLA, AL, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, Biorreactor PFTR, método ROP, esterificación, Alginato de sodio, *performance*, Espectrofotometría Infrarroja (FT-IR).

ABSTRACT

In this research we sought to obtain Polylactic Acid (PLA) using Lactic Acid of biological origin fermented by native strains of *Lactobacillus casei* and *Staphylococcus aureus* in a PFTR bioreactor. The designed bioreactor has a total volume of 1,236 liters and was worked at a temperature of 36 ° C.

For this, two strains of microorganisms were isolated, which were isolated from natural sources, these bacteria were *Lactobacillus casei* and *Staphylococcus aureus*.

The procedure began with the isolation, characterization and identification of two microorganisms. The bacterial strains were *Lactobacillus casei* and *Staphylococcus aureus* that were seeded in their respective selective crops media, which were for *Lactobacillus casei* the Rogosa medium and for *Staphylococcus aureus* the Salty Mannitol medium. Subsequently, the kinetics of each strain was determined according to the direct cell count by using a Neubauer chamber giving as a result in 16,000 Cel / mm³ for the *Lactobacillus casei* strain and 28,000 Cel / mm³ for the *Staphylococcus aureus* strain. Contrasting different types of temperatures (30 ° C, 45 ° C and 60 ° C) with 30°C being the optimum temperature and pH's (4.5, 5.0 and 8.0) with 7.0 being the optimum pH. Subsequently, The native strains of *Lactobacillus casei* and *Staphylococcus aureus* were adapted to a special production medium specifically for lactic acid.

Once these data were collected, they were encapsulated in sodium alginate beads, which were then filled in the PFTR Biorreactor, this biological reactor was designed

and constructed according to the requirements of the bacteria and the required production of lactic acid (AL). . To do this, 2D and 3D models were designed to simulate the construction of the Piston Flow-type biological reactor (PFTR).

After producing fermented lactic acid, an infrared spectrophotometry analysis (FT-IR) was then published in the *Lactobacillus casei* strain declaration, giving a probability of 80% while the *Staphylococcus aureus* strain gave a 73% Lactic Acid, according to the spectral library of the National University of San Agustín, which refers to the results of the results. (PFTR), the process of conversion of Lactic Acid to Polylactic Acid (PLA), the esterification method and the polymerization method, obtaining the final result a viscous whitish sample, this was as well as was analyzed by the Infrared Spectrophotometry method (FT-IR), for its characterization, arriving to determine that the sample analyzed has a probability of 93.10% of the Polylactic Acid according to the spectral library of the National University of San Marcos and the School of Chemistry and Chemical Engineering "USAQ" .

Key words: PLA, AL, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, PFTR bioreactor, ROP method, esterification, sodium alginate, performance, infrared spectrophotometry (FT-IR).

INTRODUCCIÓN

En estas últimas décadas el mundo está buscando la forma de como remediar el daño ocasionado por la contaminación debido a la “evolución”, la revolución industrial, guerras, etc. Se tiene como reseña histórica, que el desarrollo de polímeros sintéticos, es considerado uno de los grandes avances del siglo XX, debido a la multiplicación de sus posibilidades de uso, no solo en la industria sino en la vida cotidiana ^[1]. Los plásticos son polímeros a los que se le han dado variados usos en la industria, desde la farmacéutica, alimentos y transporte entre otros, convirtiéndose en base de la mayoría de los productos de consumo habituales ^[2] y reemplazando a los empaques de vidrio y papel debido a algunas de sus propiedades como la elasticidad y flexibilidad ^[3], además de su fácil moldeamiento y alta resistencia química ^[4]. Los polímeros convencionales, se producen mayormente como derivado de la industria petroquímica y perduran en la naturaleza por largos periodos de tiempo, debido a su alto peso y conformación molecular que los hace materiales recalcitrantes y resistentes a la acción degradadora de los microorganismos, no son biodegradables y se bio-acumulan en los ecosistemas, produciendo grandes cantidades de sustancias tóxicas que afectan notablemente el medio ambiente ^[5].

Estos polímeros sintéticos se obtienen fundamentalmente a partir del petróleo y son creados para funciones específicas. Los plásticos son populares porque son a la vez,

Económicos, livianos, resistentes a la oxidación, inalterables a los agentes atmosféricos, versátiles, aislantes de la corriente eléctrica y pueden sustituir la madera, la piedra o el metal ^[6].

Al ser el plástico un producto tan usado en estas últimas décadas se descuidó la manera de como biodegradarlo, por tal motivo se busca atenuar la contaminación y dar posibles usos a productos de desechos como por ejemplo: El lacto-suero, bagazo de caña de azúcar, sobras de maíz, desechos de arroz, desechos de xantanos y otros desechos como la seda es otro polímero natural muy preciado, y es una poliamida semejante al nylon. La lana, proteína del pelo de las ovejas, es otro ejemplo. El hule de los árboles de hevea y de los arbustos de guayule es también un polímero natural importante ^[6].

Los biopolímeros basados en recursos renovables y/o biodegradables están generando un creciente interés no solo en la industria de los plásticos sino en la sociedad en general ^[7]. En general, los polímeros tienen una excelente resistencia mecánica debido a que las grandes cadenas poliméricas se atraen. Las fuerzas de atracción intermoleculares dependen de la composición química del polímero y pueden ser de varias clases ^[8].

Ya que la región de Arequipa es productora de leche y sus derivados como: Yogurt, manjar, chocolate con leche, pan de leche, queso helado, preparación para algunos platos típicos y queso. En la elaboración de este último producto se desecha gran cantidad de suero de leche, que la proporción de la fabricación de queso es por cada kilo de queso, se utiliza 10 litros de leche fresca, que aproximadamente se desperdicia 9 litros de lacto-suero por kilo de queso producido; es por ello que se ve la necesidad de darle otro posible uso y generando un valor agregado al lacto-suero. Por último es de gran importancia utilizar técnicas biotecnológicas para darle otros usos al lacto suero, convirtiéndolo en Ácido Láctico mediante el uso de cepas bacterianas albergadas en un Biorreactor, para sí producir efectivamente el ácido deseado, procediendo a desarrollar la polimerización, llegando a ser un proyecto económicamente sostenible y eco amigable ^[7].

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener Ácido Poliláctico (PLA), utilizando Ácido Láctico de origen biológico, fermentado por cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* a través de un Biorreactor PFTR.

Objetivos Específicos

- Aislar, caracterizar e inmovilizar cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*.
- Diseñar y construir un Biorreactor PFTR para la obtención de Ácido Láctico (AL).
- Comparar las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* en su capacidad de obtención de Ácido Láctico (AL).
- Polimerizar el Ácido Láctico (AL) a Ácido Poliláctico (PLA)
- Caracterizar y analizar el Ácido Poliláctico (PLA) obtenido por la transformación del Ácido Láctico (AL).

HIPÓTESIS

Debido que los microorganismos *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* son fermentadores, es posible obtener Ácido Láctico usando un Biorreactor de tipo PFTR y su posterior polimerización a Ácido Poliláctico.

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Variables independientes	Indicadores
- Cepas productoras de Ácido Láctico	<i>Lactobacillus casei</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
- Concentración de Cloruro de Calcio en la inmovilización celular	% m / v

VARIABLES DEPENDIENTES:

Variables dependientes	Indicadores
- Obtención de Ac. Láctico	Acidez g / L (Ac. Láctico)
- Caracterización Morfológica	Bastón, Esférica, Ovoide y Amorfo

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES
<p><u>INDEPENDIENTE:</u></p> <p>CEPAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO</p>	<ul style="list-style-type: none"> Son bacterias fermentadoras de azúcares presentes en la leche convirtiéndolo a ácido láctico entre las bacterias fermentadoras tenemos a las bacterias del genero lactobacilos. 	<ul style="list-style-type: none"> Las bacterias más utilizadas para la producción de Ac. Láctico se suele utilizar las cepas de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>. 	<p>X₁ = <i>Lactobacillus casei</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>
<p>CONCENTRACIÓN DE CLORURO DE CALCIO EN LA INMOVILIZACIÓN CELULAR</p>	<ul style="list-style-type: none"> Relación entre la masa y el volumen de un compuesto químico, inorgánico, mineral utilizado como medicamento en enfermedades o afecciones ligadas al exceso o deficiencia de calcio, en el organismo. 	<ul style="list-style-type: none"> Cuantificación del compuesto químico en este caso el Cloruro de Calcio, utilizado para la estabilidad de las perlas de Alginato de Sodio y estabilizante en la industria alimentaria. 	<p>X₂ = % m / v</p>

<u>DEPENDIENTE:</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso bioquímico por el que una sustancia orgánica se transforma en otra, generalmente más simple. 	<ul style="list-style-type: none"> • Consiste en un proceso de glucólisis (ruptura de la molécula de glucosa), para la obtención de Ac. Láctico. 	<p>Y₁ = Acidez g / L (Ac. Láctico)</p>
OBTENCION DE ÁCIDO LÁCTICO	<ul style="list-style-type: none"> • Es un procedimiento que normalmente se utiliza para describir los caracteres morfológicos, fenológicos y productivos que identifican a las especies. 	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso por el cual se examina la forma de la bacteria, que puede ser: De forma Macroscópicopica y Microscópica. 	<p>Y₂ = Bastón, Esférica, Ovoide y Amorfo</p>
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA			

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. LA INDUSTRIA BIOTECNOLÓGICA

Uno de los logros alcanzados por el ser humano en los tiempos modernos ha sido el control de los organismos vivos desde niveles microscópicos. La biotecnología moderna nace gracias a los conocimientos de biología, química, física y otras ciencias relacionadas a campos de la salud y de ingeniería, la cual está siendo usada en campos como la agricultura, medio ambiente, medicina, productos alimenticios, y ramas farmacéuticas; lo cual convierte a la biotecnología como una de las “tecnologías de punta” de acelerado desarrollo en la última década ^[9].

Hasta la fecha, la propagación de la biotecnología ha sido muy lenta; debido ello a la incertidumbre técnica y de mercado, incluso por los problemas legales vinculados con la propiedad sobre el conocimiento que ponen en riesgo los resultados obtenidos en los laboratorios antes de ser utilizados con un futuro comercial ^[9].

1.2 BASES TEÓRICAS

1.2.1 Plásticos Biodegradables o Biopolímeros

También conocido como biomaterial, toda sustancia o combinación de sustancias, de origen natural o sintético, diseñadas para actuar inter-facialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano. Desafortunadamente, el término biomaterial se utiliza equivocadamente en un sentido más amplio para designar cualquier objeto utilizado en relación con la asistencia sanitaria, incluido el embalaje ^[2].

Atendiendo a su origen, los plásticos biodegradables pueden ser:

- Naturales: Por ser materiales complejos, heterogéneos y difícilmente caracterizables y procesables. Por ejemplo son el colágeno purificado, fibras proteicas (seda, lana, etc).
- Sintéticos: Los biodegradables sintéticos pueden ser cerámica, metales o polímeros y comúnmente se denominan materiales biomédicos, para diferenciarlos de los biomateriales de origen natural ^[2].
- En el caso particular de los polímeros biodegradables, se puede hacer una clasificación según el tiempo que deben mantener su funcionalidad cuando se aplican como implantes quirúrgicos ^[2].
- En el primer grupo se incluyen todos aquellos implantes que deben tener un carácter permanente, como son los sistemas o dispositivos utilizados para sustituir parcial o totalmente a tejidos u órganos destruidos como consecuencia de una enfermedad o trauma ^[7].
- En el segundo grupo, se incluyen los biomateriales degradables de aplicación temporal, es decir, aquellos que deben mantener una funcionalidad adecuada durante un periodo de tiempo limitado, ya que el organismo humano puede desarrollar mecanismos de curación y regeneración tisular para reparar la zona o el tejido afectado ^[7].

1.2.2 Cepas Microbiológicas Generadoras de Ácido Láctico

Lactobacillus casei

Bacteria del Ácido Láctico es un género de bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte lactosa y otros monosacáridos en Ácido Láctico. Normalmente son benignas e incluso necesarias, normalmente habitan en el cuerpo humano y en el de otros animales, por ejemplo, están presentes en el tracto gastrointestinal y en la vagina. La producción de Ácido Láctico por lo general hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas. Algunas especies de *Lactobacillus* son empleadas industrialmente para la producción de yogurt y otros alimentos fermentados. Algunas bebidas de yogur contienen *Lactobacillus* como suplemento dietético. Los lactobacilos (también *Lactobacillus* o bacterias del Ácido Láctico) son un género de bacterias Gram positivas anaerobias aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte a la lactosa y algunos monosacáridos en Ácido Láctico [5,10].

Habitualmente son benignas e incluso necesarias, habitan en el cuerpo humano y en el de otros animales; por ejemplo, están presentes en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Muchas especies son importantes en la descomposición de la materia vegetal. La producción de Ácido Láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias dañinas de la salud. Algunas especies de *Lactobacillus* se usan industrialmente para la producción de yogur y de otros alimentos fermentados. Algunas bebidas de yogur contienen *Lactobacillus* como suplemento alimenticio. Muchos lactobacilos son los únicos seres vivos que no requieren hierro para vivir y tienen una tolerancia extremadamente alta al peróxido de hidrógeno [5,10].

Staphylococcus aureus.

Los estafilococos son bacterias gram positivas; el nombre *Staphylococcus* deriva de la palabra griega *staphyle* (racimo de uvas) y fue nombrado por un

cirujano escocés, Sir Alexander Ogdson, debido al característico ordenamiento microscópico ordenamiento en racimos de uva ^[11].

Staphylococcus aureus, conocido comúnmente como estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia gram-positiva productora de coagulasa y catalasa. Es el patógeno humano más importante que coloniza la piel de la mayoría de los seres humanos. La ruptura de la piel o de las mucosas por traumatismos u operaciones puede dar origen a infecciones localizadas de la piel y de los tejidos blandos; en ocasiones los microorganismos infectan los linfáticos y la sangre y producen bacteriemia e infecciones diseminadas como la endocarditis, artritis, neumonía y abscesos profundos ^[11].

Dicho microorganismo puede afectar tanto a pacientes inmunocompetentes (en los que produce infecciones de la piel y tejidos blandos), como a personas con una disminución de las defensas a causa de operaciones, quemaduras, adicción a drogas intravenosas o dispositivos médicos, como por ejemplo catéteres intravenosos ^[5,12].

Tres toxinas producidas por *Staphylococcus aureus* pueden causar 3 síndromes clínicos: intoxicación alimentaria estafilocócica, síndrome de la piel escaldada estafilocócica y síndrome del shock tóxico. La intoxicación alimentaria estafilocócica se debe a la ingestión de alimentos que contienen enterotoxina B termoestable preformada. La toxina no se produce en el tracto gastrointestinal. Entre 2 y 8 horas después de la ingestión el paciente comienza a presentar náuseas, vómitos y diarrea. La característica es que el paciente no presenta fiebre y la infección se auto limita ^[5].

El síndrome de la piel escaldada estafilocócica, afecta con más frecuencia a los lactantes y a los niños pequeños. Suele comenzar con un eritema perioral y un *rash* sensible al tacto, similar a un eritema solar que se disemina por todo el cuerpo por dos a tres días. La enfermedad es causada por cepas *Staphylococcus aureus* productora de toxina (exfoliatina) y comienza con una infección cutánea localizada. La fiebre y la leucocitosis suelen ser leves y habitualmente hay recuperación ^[5].

El síndrome del shock tóxico es un trastorno multisistémico producido por cepas de *Staphylococcus aureus* productora de toxina. La gran mayoría de los casos se observa en mujeres durante la menstruación y se asocian con el uso de tampones y un aumento del desarrollo de *Staphylococcus aureus* intravaginal con producción aumentada de toxinas ^[4].

Se efectúa por tinción de Gram y cultivos microbiológicos. El material a cultivar podría estar constituido por aspirados de pus o tejidos, sangre u otros líquidos corporales que normalmente son estériles ^[4,5,12].

Características Generales de Ambas Cepas

- Cocos Gram-positivos.
- Aerobios o anaerobios facultativos: presentan metabolismo mixto.
- Se diferencian de las bacterias lácticas por la presencia de catalasas y de pigmentos carotenoides y porque su metabolismo es más versátil.
- En elaboraciones para el microscopio aparecen formando racimos o parejas inmóviles
- Son las especies más resistentes a agentes físicos (deseccación, temperatura) y químicos (alcohol) de entre las bacterias no esporulantes.
- Forman parte de la flora normal en piel y cavidades
- Puede producir enfermedades en animales: mastitis ovina y vacuna posteriores al destete o durante los periodos de reposo del ordeño ^[12].

Tabla N° 1: Tabla primaria de referencias de las cepas productoras de Ácido Láctico ^[5,12]

Pruebas	<i>Lactobacillus casei.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
GRAM	Gram positiva	Gram positiva
Respiración	Anaerobia facultativa	Aerobia
Coagulasa	No productora	Productora
Catalasa	No productora	Productora
Movilidad	Inmóvil	Inmóvil
Esporulación	No	No

Tabla N° 2: Taxonomía de las cepas productoras de Ácido Láctico ^[5,12]

Clasificación	<i>Lactobacillus casei.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Dominio	Bacteria	Bacteria
Filo	Firmicutes	Firmicutes
Clase	Bacilli	Bacilli
Orden	Lactobacilales	Bacillales
Familia	Lactobacillaceae	Sthaphylococcaceae
Genero	Lactobacillus	Sthaphylococcus
Especie	L.casei	Staphylococcus aureus

1.2.3 Residuos de Industria Láctea (Lacto suero)

En la actualidad la producción láctea en general y la industria quesera en particular generan una gran cantidad de residuos y subproductos alimentarios de difícil gestión. Se estima que para lograr 10kg de queso se producen alrededor de 90kg de suero procedente de la leche utilizada para su fabricación ^[10].

Estas cifras suponen que solo en Europa se generan anualmente alrededor de 75 millones de toneladas de suero. Alrededor del 60% de ese suero es utilizado para generar nuevos productos alimenticios o derivados lácteos para la alimentación animal, aun así, es necesario ocuparse de los más de 30 millones de toneladas sobrantes ^[10].

Envases 100% biodegradables a partir del excedente de suero.

Como hemos visto, el sobrante de suero lácteo procedente de la industria quesera se reconvierte en un producto de valor al lograr utilizar el PHB obtenido. La idea consiste en fabricar con este material envases 100% biodegradables que puedan ser aprovechados por la propia industria quesera, aunque posteriormente se estima que podrá hacerse extensible su uso para otros productos alimenticios ^[13].

Estos recipientes estarán diseñados teniendo en cuenta las exigencias del propio producto, como son las funciones de protección de la calidad y

seguridad de los quesos. El beneficio añadido viene dado en la reducción de la huella de carbono derivada del uso de plásticos no renovables ^[10,13].

1.2.4 Sistemas Biológicos de Producción de Ácido Láctico (Biorreactor)

En algunos casos, un Biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias

Bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos Biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos y son comúnmente fabricados en acero inoxidable ^[6,13].

Un Biorreactor puede ser también un aparato o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular. Estos dispositivos se encuentran en desarrollo para su uso en ingeniería de tejidos ^[13].

En términos generales, un Biorreactor busca conservar ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) al organismo o sustancia química que se cultiva. En función de los flujos de entrada y salida, la operación de un Biorreactor puede ser de tres modos distintos:

- Lote (batch)
- Lote alimentado (fed-batch)
- Continuo o quimiostato ^[13].

1.2.4.1 Biorreactor de Tipo PFTR (Reactor de Tubo con Flujo Pistón).

Los reactores tubulares tienen una vasta aplicación en la industria, estos pueden estar con o sin células inmovilizadas, al contener estas células son conocidos como reactores del lecho empacado (PFTR); los cuales como ya se mencionó son reactores tubulares que contienen *pellets*, en los cuales esta inmovilizada una célula y forman el lecho del Biorreactor ^[14].

Ventajas del Biorreactor PFTR.

- Los Biorreactores de flujo piston llegan a ser flexibles, ya que el mismo reactor puede ser utilizado para producir diferentes productos.
- El biorreactor es fácilmente calentado o enfriado por una chaqueta o comisa.
- Alta conversión por unidad de volumen.
- Fácil de parar y limpiar ^[14].

Desventajas del Biorreactor PFTR.

- La calidad del producto es más variable que con los reactores de operación continua.
- Elevados costos de operación.
- Especialmente usados en fase líquida ^[14].

Inmovilización Celular

Al ser inmovilizados permiten una superficie de área para el crecimiento de las células, también estas estructuras porosas ofrecen un ambiente protector para las células, evitando su pérdida ante el estrés provocado por las fuerzas hidrodinámicas de los flujos de alimentación ^[15].

Las desventajas del uso de estos Biorreactores es la heterogeneidad del tamaño de los *pellets* que genera un crecimiento diferente para cada una de las células, generando así un desequilibrio para la adecuada alimentación y desecho de toxinas generados por un mismo flujo. El uso de la inmovilización de bacterias por medio de *pellets*, genera la disminución de la viscosidad en el caldo de cultivo, obteniéndose así un líquido newtoniano el cual está caracterizado por una buena transferencia de masa y transmisión de calor. Otra mejoría en la inmovilización de las células, es que los *pellets* facilitan la separación del medio que contiene el producto, ayudando así al proceso de purificación; pero este sistema de inmovilización posee una desventaja, que en el momento del atrapamiento de las células de la bacteria,

el tamaño de la gota genera una variedad en la cantidad de células en el interior de cada pellet, y en el momento de brindar una oxigenación existirán *pellets* con mayor suma de células y otros con una cantidad menor, generando así un falta de oxígeno a los *pellets* que posean una cantidad mayor de células, trastornando así el metabolismo celular y la excreción de los metabolitos secundarios [15].

Mirado a escala molecular, el Alginato de sodio o el ácido algínico son largas cadenas de moléculas no estructuradas. Pero en presencia de iones de Calcio Ca^{2+} más otros iones similares, se forman unas estructuras gelificadas de "caja de huevos", en las que los iones Calcio quedan atrapados en el interior de las cadenas moleculares de Alginato, y ello estimula que las dos cadenas moleculares queden entrelazadas, formando una estructura gelificada similar a la gelatina. Las sustancias con estas propiedades se nombran hidrocoloides. (Figura N°1).

Y, mira por dónde, éste es el mecanismo de la esterificación, inventada en los años 50 por la empresa Unilever, pero llevada a la práctica en restauración [15,16].

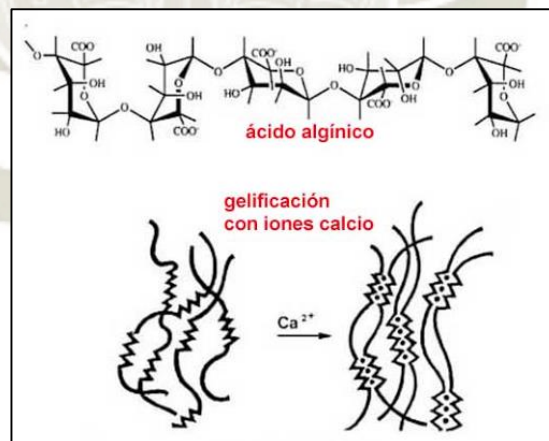


Figura N° 1: Estructura Química de Ácido Álgínico + Calcio [15]

Para el uso del PFTR, se debe de conocer su tiempo de residencia hidráulica (TRH), el cual es el tiempo en el cual, el flujo del medio de cultivo se encuentra en contacto con los *pellets*; un aumento en el tiempo de residencia hidráulica refleja una mayor producción en el Biorreactor. Para poder obtener el valor del TRH, se debe de conocer el volumen del tubo interno

del Biorreactor y el flujo con el que está ingresando el medio de cultivo, una vez conocidos estos datos, se puede utilizar la **Ecuación (1)**^[16,17].

$$\text{TRH} = \text{Volumen (PFTR)} / \text{Flujo del medio líquido. (Ec. 1)}$$

Se puede conocer también el espacio hueco (ε) y el espacio ocupado (Ψ) del Biorreactor, cada uno, como el nombre lo indica, en el caso de Biorreactores con lechos empaquetados con matrices sólidas; constituyen el espacio hueco que no posee una matriz sólida y exclusivamente es usado para el paso del flujo de medio de cultivo, en cambio el espacio ocupado simboliza el lugar ocupado por la matriz sólida. Ambos lugares complementados representan el volumen total del reactor biológico, por ello pueden ser repetidos en la **Ecuación (2 y 3)**.

$$\varepsilon + \Psi = 1$$

Para poder determinar independiente el valor de cada uno, se pueden utilizar las siguientes formulas.

$$\varepsilon = \text{Volumen hueco} / \text{Volumen total. (Ec. 2)}$$

$$\Psi = \text{Volumen ocupado} / \text{Volumen total. (Ec. 3)}$$

A su vez, para poder determinar los valores de volumen hueco o de volumen ocupado es preciso saber el volumen de *pellets* para este caso, que pudieron ser colocados en el interior del Biorreactor. Y utilizando la **Ecuación (4)** se puede determinar el valor del volumen hueco^[17].

$$\text{Volumen hueco} = \text{Volumen total} - \text{Volumen de los pellets. (Ec. 4)}$$

Con estos datos, se puede definir los valores de ε y Ψ , esperando que el espacio-hueco ocupe un porcentaje de 10-20% en relación con el volumen total y el espacio ocupado posea un porcentaje del 40%.

Adicionalmente en el caso del flujo del medio de cultivo, este puede ser determinado rápidamente por el valor que se programe en la bomba peristáltica, pero en muchos casos este valor es erróneo, así que lo más

recomendable es determinar el flujo utilizando una probeta y un cronometro, determinando en una serie de repeticiones el tiempo en que tarda el medio de cultivo en alcanzar una medida estandarizada en la probeta [16,17].

1.2.4.2 Proceso *Down Stream*.

El proceso *down stream* es una parte del bioproceso cuando se trabaja con Biorreactores [18]. Comienza una vez finalizado el proceso de *up stream*, en el cual se generaron todos los productos, subproductos y remanentes en el interior del Biorreactor. El proceso de *down stream* separa y purifica un producto específico del caldo final que se obtiene del Biorreactor, este procedimiento se realiza con ayuda de operaciones unitarias como filtración, adsorción, precipitación en pera de decantación como se aprecia en la Figura N°2, entre otras; cada una de ellas especializada para ciertos tipos de tarea [17].

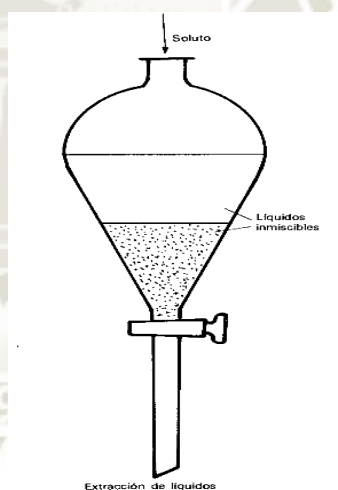


Figura N° 2: Precipitación en Pera de Decantación [17]

El proceso *down stream* en bioprocesos, inicia con la recuperación del producto, esto depende si el producto es intracelular o extracelular, es este caso el Ácido Láctico es intracelular, lo cual complica su recuperación, para ello se pueden utilizar operaciones como precipitación por solventes, micro filtración por membranas. Luego el siguiente paso es la concentración en la cual se trata de separar el producto deseado de sustancias que posean propiedades disperejas, aumentando así la concentración del producto de

interés, para este paso se pueden usar las operaciones de extracción o de absorción. El tercer paso es la purificación que implica la separación del producto de impurezas, y por último se realiza una fórmula del producto para obtenerlo de un forma refinada e incluso comercial para ello se utilizan operaciones como la cristalización o de secado^[17].

1.2.5. Esterificación

La esterificación es el procedimiento mediante el cual logramos sintetizar un ester. Los esteres se producen de la reacción que tiene lugar entre los ácidos carboxílicos y los alcoholes. Los ácidos carboxílicos sufren reacciones con los alcoholes cuando se encuentran en presencia de catalizadores de la reacción, los cuales por lo general son un ácido fuerte, con la finalidad de formar un ester a través de la expulsión de una molécula de H₂O^[19,20].

El ácido láctico es un ácido orgánico con tres carbonos: en un terminal el átomo de carbón es parte del grupo carboxílico; el otro átomo de carbón terminal es parte de un metilo; y el átomo de carbón central está unido a un grupo alcohol. Existen dos esteroisómeros del ácido láctico (Figura N°3).

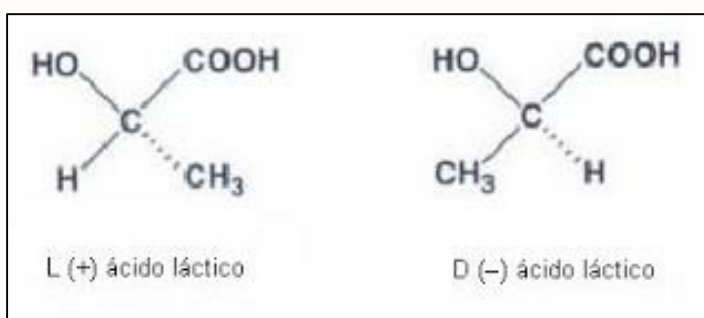


Figura N° 3: Tipos de Esteroisómeros del ácido láctico^[19]

El ácido láctico no puede ser directamente polimerizado en un producto útil, ya que cada reacción de polimerización genera una molécula de agua, cuya presencia degrada la formación de la cadena polimérica, hasta el punto que sólo se obtienen pesos moleculares muy bajos. En cambio, dos moléculas de ácido láctico se someten a una esterificación simple y luego catalíticamente se cicla para realizar un ester de dilactato cíclico. A pesar

de que la dimerización también genera agua, puede ser separada antes de la polimerización debido a una caída significativa en la polaridad. El PLA de alto peso molecular se produce a partir del ester de dilactato (lactida) por polimerización por apertura de anillo usando por lo general un octoato de estaño como catalizador (a nivel laboratorio se emplea comúnmente cloruro de estaño (II)). Este mecanismo no genera agua adicional, por lo tanto, una amplia gama de pesos moleculares puede obtenerse ^[19,21].

La polimerización de una mezcla racémica de ácidos L y D-lácticos por lo usual conduce a la síntesis de poliácidos-DL-láctico (PDLLA), que es amorfo. El uso de catalizadores estereoespecíficos puede llevar a PLA heterotáctico de mayor cristalinidad ^[20,22]. El grado de cristalinidad y otras muchas características importantes, es en gran parte controlado por la relación de enantiómeros D y L que se utiliza, y en menor medida del tipo de catalizador utilizado ^[19] (Figura N°4).

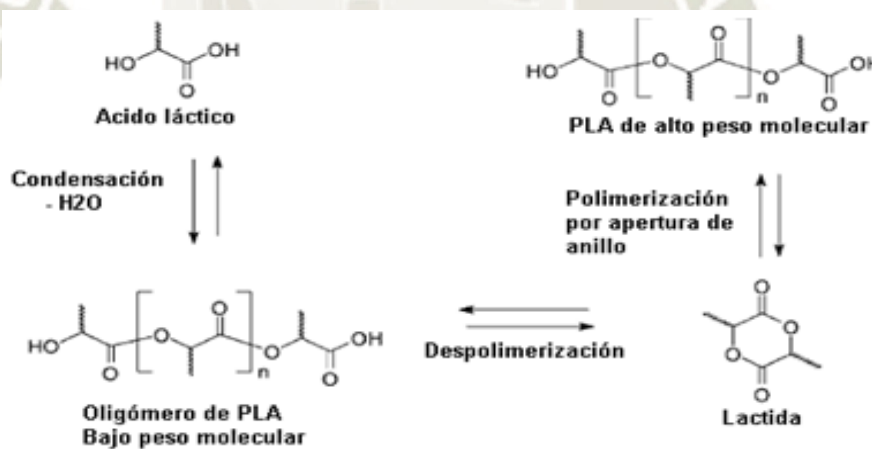


Figura N° 4: Reacción de Esterificación del Ácido Láctico a PLA ^[19]

1.2.6 Método ROP

El PLA puede obtenerse por condensación directa del ácido láctico o bien por polimerización tras la apertura del anillo de L-lactida (ROP: *ringopening polymerization*). Puesto que la condensación es una reacción de equilibrio, existen dificultades para eliminar cierta cantidad de agua

durante las últimas etapas de la polimerización lo cual limita el peso molecular del polímero obtenido por este método [22,23].

En consecuencia la mayoría de las investigaciones se han centrado en el método ROP, sin embargo Mitsui Toatsu Chemicals [23] ha patentado un proceso de destilador azeotrópico usando un disolvente que permite un proceso de esterificación directo y finalmente obtener PLA de elevado peso molecular [24].

Es óptimamente activo y por lo usual las bacterias deseables que actúan tienden a producir únicamente L-esteroisómero, mientras que métodos sintéticos producen en su mayoría una mezcla racémica de ácido láctico. La mezcla de los esteroisómeros D y L es amorfa y sin embargo L-lactida produce una estructura cristalina de PLA llamada PLLA (ácido poli-L-láctico) [23,25].

La polimerización de la lactida usando octoato de estaño ocurre generalmente vía un mecanismo de coordinación-inserción [26,27], con la apertura del anillo de la lactida y polimerización a ambos lados de la cadena (Figura N°5).

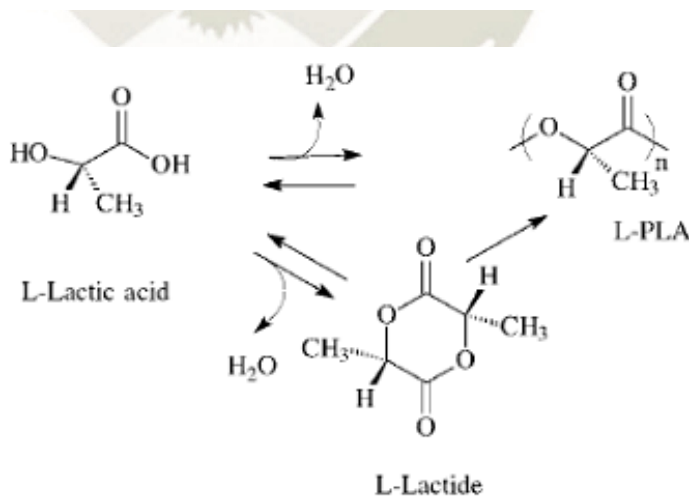


Figura N° 5: Reacción por método ROP para obtención de L-lactida [26]

1.2.7. Métodos Instrumentales Emergentes para la Caracterización Funcional y Estructural de Polímeros.

1.2.7.1. La Transformación de Fourier de la Radiación Infrarroja (FT-IR)

FT-IR es un instrumento analítico eficaz para la detección de grupos funcionales y caracterización de la unión covalente de la información. El análisis FT-IR ayuda a entender los materiales y productos; identificar compuestos químicos en productos de consumo, pinturas, recubrimientos, polímeros, productos farmacéuticos, alimentos y otros productos ^[17].

FT-IR ofrece análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras orgánicas e inorgánicas. Transformada de Fourier espectroscopia infrarroja (FT-IR) identifica los enlaces químicos en una molécula mediante la producción de un espectro de absorción de infrarrojos ^[17,20].

Los espectros producen un perfil de la muestra, una huella digital molecular distintiva que se puede utilizar a la pantalla y las muestras de análisis para muchos componentes diferentes ^[20].

La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y posiblemente el acoplamiento de vibraciones ^[17].

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, $4000-400\text{ cm}^{-1}$) se puede construir un gráfico. Al inspeccionar el gráfico de una sustancia, un usuario experimentado puede obtener información sobre la misma. Esta técnica funciona casi exclusivamente en enlaces covalentes, y se usa mucho en química, en especial en química orgánica. Se pueden preparar

gráficos bien resueltos con muestras de una sola sustancia de gran pureza. Sin embargo, la técnica se utiliza habitualmente para la identificación de mezclas complejas [20].

• **Ventajas de FT-IR**

Los datos recogidos de los espectrómetros FT-IR se almacenan en forma digital en un ordenador que hace que sean fáciles de acceder en cualquier momento. Otra ventaja de esta técnica es la capacidad de añadir o restar espectro de la solución lo que hace que obtener el espectro individual de cada componente sea muy fácil. Además los espectrómetros FT-IR son rápidos, fáciles de utilizar y proporcionan resultados precisos en comparación con otros tipos de espectrómetros [18].

• **Cualidades**

La Transformación de Fourier es una ecuación matemática que convierte la señal espectral realizada por un ordenador desde un dominio de tiempo hacia un dominio de frecuencia. Su mecanismo de acción se basa en la modulación del interferómetro de Michelson. El dominio del tiempo es un método espectroscópico que utiliza variación de potencia alta. No hay transductor óptico disponible que pueda tolerar tales frecuencias de alta potencia [18].

El interferómetro de Michelson modula las frecuencias altas del dominio del tiempo para producir frecuencias bajas y medibles [18].

• **Importancia**

FT-IR puede analizar muchas sustancias simultáneamente, por lo que es aplicable a múltiples ensayos. Es capaz de detectar trazas de una sustancia. El análisis tradicional puede detectar sustancias con alta concentración solamente. FT-IR también puede medir soluciones que contienen moléculas de agua. El agua se absorbe normalmente cuando se utiliza el análisis de IR tradicional [17,18].

• Tipos de Análisis Realizados por FT-IR

- Las impurezas proyectadas
- Formulación.
- Productos farmacéuticos
- Analiza los Scans cuantitativos, cualitativos
- Los sólidos, líquidos, gases
- Las muestras orgánicas e inorgánicas
- Identificación de incógnitas
- Pinturas, recubrimientos, laminados
- Polímeros y Plásticos
- Análisis de la contaminación
- Productos de cuidado personal
- Presentación de la toxicidad
- Rieles
- FT-IR calibraciones de gas
- Contaminación
- Otros materiales y productos ^[18].

• Análisis de Polímeros

La espectroscopia infrarroja (FT-IR) el análisis de polímeros para la identificación y evaluación de la calidad, que aportan datos e información significativa. Cuando un material plástico absorbe luz infrarroja, típicamente en la región del infrarrojo medio, el espectro resultante (absorbancia o transmitancia) da una "huella dactilar" distintiva que puede ser usada para detectar fácilmente y las muestras de ensayo para muchas aplicaciones diferentes ^[28].

La calidad y rendimiento de los productos de plástico depende de la calidad de los materiales polímeros utilizados durante la fabricación, y así la confirmación de la identidad y de la calidad de pruebas de materiales es crítica ^[28,29].

Nuestros laboratorios de pruebas de polímero proporcionan servicios de espectroscopía infrarroja de expertos para los polímeros utilizados en diversas aplicaciones, tales como alimentos, automotriz, y el embalaje. Nuestra experiencia FT-IR puede entregar datos fiables que apoyan la identificación de las muestras de polímero, el análisis cualitativo de los materiales poliméricos de partida y los productos terminados, la cuantificación de componentes en mezclas de polímeros o análisis de muestras en proceso, el análisis de los materiales de la competencia y amplio análisis de la contaminación [17,29,30].

- **Identificación del Polímero por Espectroscopia Infrarroja**

Se maneja ambos enfoques de reflectancia y de muestreo de transmisión que son adecuados para el análisis de polímero y mediante la comparación con bases de datos espectrales se realizan estudios rápidos y eficaces de identificación para las muestras de todos los tipos de materiales de polímero y todos los tamaños incluidos los granulados, piezas, muestras opacas, fibras, polvos, de recubrimientos de cables, y líquidos [30].

- **Evaluación de la Calidad de FT-IR de polímeros y plásticos**

Por comparación de los espectros de infrarrojos de una muestra en contra y referencia de la muestra de polímero se pueden implementar la evaluación de control de calidad de los materiales utilizados por el seguimiento de las diferencias. Si se observan diferencias a continuación, más estudios de FT-IR se pueden implementar para ayudar a entender la posible contaminación [29,31].

- **Procedimiento de Prueba**

La absorbencia de un material de luz infrarroja a diferentes frecuencias produce una única "huella espectral" en base a las frecuencias en las que el material absorbe la luz infrarroja y la intensidad de las absorciones.

La exploración espectral resultante (absorbancia o transmitancia) es habitualmente específica para una clase general de material. Ejemplo: el análisis espectral de policarbonato no se parece a la exploración de nylon, pero todos los análisis de nylon tienen similitudes únicas. Exploraciones espectrales desconocida pueden ser analizados para determinar el material base de lo desconocido cotejando su exploración para las exploraciones espectrales de materiales conocidos que se almacenan en una biblioteca basada en ordenador ^[30].

Un escáner de infrarrojos se genera en el infrarrojo medio la región del espectro de luz. La región del infrarrojo medio es de 400 a 4000 números de onda, lo que equivale a longitudes de onda de 2,5 a 25 micras (10-3mm) ^[30].

Coincidencia el espectro infrarrojo desconocido para espectros conocidos se puede realizar manualmente o con la ayuda de un programa informático. Espectrales búsquedas informatizadas pueden comparar rápidamente un espectro desconocido a un gran número de espectros se encuentra en varias bases de datos en un período muy corto de tiempo ^[31].

Partidos espectrales computarizado para el análisis espectral desconocido se presentan de mejor a peor con puntuaciones asignadas certeza. Los programas de ordenador son muy útiles para la comparación de las exploraciones espectrales desconocidas a las de los materiales conocidos, pero los partidos seleccionados del ordenador pueden ser engañosos. Se requiere de un analista de FT-IR expertos para examinar los partidos seleccionados informáticos espectrales para asegurar que las identificaciones de las muestras sean exactas y completas. Programas de computación comunes tienen dificultades con diferencias sutiles que pueden ser de importancia crítica ^[31,32].

• **Tamaño de la Muestra Requerido**

Las muestras del tamaño de un solo gránulo de resina se puede escanear por FT-IR reflectante. Las muestras, que pueden ser probados fácilmente por reflectante FT-IR, contienen gránulos de polímero, partes, muestras opacas, fibras, polvos, revestimientos de alambre, y líquidos ^[29].

Los materiales con grandes sumas de carbono (negro de carbono o de fibra de carbono) son difíciles de obtener un análisis espectral utilizable a partir de carbono porque absorbe fuertemente la luz infrarroja en una amplia gama de frecuencias. Todo ello resulta en un espectro de FT-IR sin los detalles minuciosos necesarios para identificar el material desconocido ^[29].

• **Identificación Básica**

Como se indicó anteriormente, la identificación de FT-IR del polímero de un desconocido se realiza haciendo coincidir los picos de infrarrojos del material, ya sea la transmitancia o absorbancia, a los picos de los análisis de infrarrojos similares de materiales conocidos. Cuanto mejor sea el partido, cuanto mayor es la certeza de una correcta identificación del polímero desconocido ^[31].

Un análisis espectral FT-IR puede identificar sencillamente clases de polímeros tales como nylon, poliésteres, polipropilenos, policarbonatos, acetales, o polietilenos. Sin embargo, un análisis espectral FT-IR por sí sola no se debe esperar que identificar el tipo de nylon o poliéster, identificar un polipropileno o acetal como un homopolímero o copolímero, o determinar si el polietileno es un material de alta o baja densidad ^[29,32].

•Control de Calidad

Una exploración espectral de un material de referencia puede ser formada y acumulada en una base de datos de biblioteca espectral. Una exploración de referencia almacenado permitirá que todas las futuras exploraciones materiales que han de compararse de nuevo a la misma exploración anterior ^[17]. El objetivo es buscar las diferencias materiales. Las diferencias observadas en un análisis espectral recién generado podrían indicar un cambio en el proceso o un posible problema de contaminación ^[31].

•La Contaminación Interna de Polímero

FT-IR sustracciones espectrales se utilizan para buscar la contaminación interna en los polímeros. Un programa de ordenador se utiliza para restar los picos asociados con el polímero base del análisis espectral y, a continuación se realiza un análisis de la exploración espectral restante ^[31].

La cantidad de contaminación que puede ser detectada depende de las exploraciones espectrales del polímero base y el contaminante. La contaminación con materiales con muy distintos espectros de infrarrojos por lo general puede ser detectada a un nivel de aproximadamente el 1-2%. La contaminación con materiales con espectros infrarrojos similares no puede aparecer incluso en el nivel del 10% ^[32].

•La Contaminación de la Superficie

La contaminación profundos en la superficie de los polímeros puede ser analizado por FT-IR reflectante normal porque el haz de infrarrojos solamente penetra en unas pocas micras en la superficie de la muestra. Otro método para indagar una posible contaminación de la superficie implica un lavado con disolvente de la superficie de la muestra ^[17].

Un disolvente de lavado implica el uso de un disolvente que es no destructivo a la muestra. Un buen lavado con disolvente de la superficie de la muestra se recoge y se evapora a sequedad en el área de muestra

reflectante FT-IR. Una vez que el disolvente se evapora un análisis FT-IR se realiza en el residuo lavado con disolvente ^[17,31].

Teniendo en cuenta que esta descripción de la prueba es intencionalmente carácter genérico y destinado a proveer un resumen descriptivo para mejorar la comprensión de prueba. Las normas pueden ser conseguidas de las autoridades estándares apropiados ^[33].

FT-IR se puede utilizar con otras técnicas de espectroscopia molecular disponibles tales como:

- Reflectancia difusa infrarroja por transformada de *Fourier Spectroscopy* (DRIFTS).
- Infrarrojo espectroscopia acoplado a análisis termogravimétrico (FT-IR / TGA).
- De Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
- Cromatografía de gases.
- Cromatografía líquida ^[33].

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de investigación de la Universidad Católica de Santa María y en los Laboratorios del departamento de Control Calidad de Agua Potable y Efluentes, en los respectivos laboratorios de Fisicoquímica y Microbiología de la empresa EPS SEDAPAR S.A, PTAP La Tomilla - Arequipa – Perú.

2.2. MATERIALES

2.2.1 Material de Vidrio

- Tubos de ensayo (Pirex)
- Matraz erlenmeyer (50 mL, 100 mL)
- Bureta (20 mL)
- Placas Petri (20 mL)
- Cámara de Neubauer (zuz)
- Pipetas graduadas (5 mL, 10 mL)
- Vasos precipitados (50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL)

- Celdas para espectrofotómetro.
- Probetas (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL).
- Balón (50 mL, 100 mL).
- Capilares.
- Laminas cubre objetos.
- Laminas porta objetos.
- Pera de decantación (250 mL).
- Frascos de vidrio ambar (5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL).
- Fiolas (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL).

2.2.2 Reactivos

- Agar (MERCK)
- Eter de petróleo (Tedia)
- Etanol (J.T.Baker)
- Fenol (J.T.Baker)
- Fenolftaleína
- Cristal violeta
- Safranina
- Alcohol acetona (Fermont)
- Alcohol metílico QP (Fermont)
- Peróxido de hidrogeno
- Reactivo oxidasa
- Reactivo de Kovac
- Medios de cultivos para pruebas bioquímicas
- Kid API20e

2.2.3 Material Biológico:

- Suero de Leche
- Cepas de *Lactobacillus casei*
- Cepas de *Staphylococcus aureus*

2.2.4 Instrumentos y Equipos:

- Autoclave (Selecta)
- Balanza analítica (OHAUS, Modelo AR2140, USA)
- Refrigerador (LG P/No 3850JD224BD, Corea)
- Incubadora (Selecta)
- Microscopio óptico (ZEISS Primo Star)
- Centrifuga (Selecta)
- Termostato (Selecta)
- Agitador Vortex (VELP Scientifica Modelo F202A0175, Europa)
- Espectrofotómetro (NICODOM IR polymers)
- Microcentrífuga (Selecta)
- Termo-agitador magnético (CERAMAC – Midi-IKA Words USA)
- Phmetro (METTLER-TOLEDO)
- Conductímetro (METTLER-TOLEDO)
- Oxímetro (Selecta)
- Bomba de Agua (Hidroestal)
- Bomba Peristáltica (Masterflex)
- Estabilizador de Corriente
- Termómetro Digital (HANNA)
- Bombas de Vacío (Milli Pore)
- Cámara de Siembra (Selecta)
- Campana Extractora de Gases (Selecta)

2.2.5 Otros

- Agua destilada
- Agua desionizada estéril
- Envases plásticos de 200 mL
- Jeringas
- Tubos Eppendorf
- Micropipetas
- Puntas estériles (1000 μ L, 100 μ L, 0.5 – 20 μ L)

- Papel filtro
- Asas de kohle (punta, aro)
- Bolsas plásticas polipropileno
- Perlas de vidrio
- Moldes de plástico
- Bolsas Ziploc
- Glicerina
- Tubos de PVC de $\frac{1}{2}$
- Codos de PVC de $\frac{1}{2}$
- Valvula schek de $\frac{1}{2}$
- Niples de $\frac{1}{4}$
- Mangueras de látex
- Llaves de $\frac{1}{4}$
- Pabilo
- Cajetilla de fósforos
- Papel Kraft
- Papel Aluminio
- Cinta Adhesiva
- Alicata Universal
- Desarmadores Plano y Estrella
- Cinta de Plomero
- Tornillos de Cabeza Plana y Estrella

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Aislamiento e Identificación de Cepas Bacterianas Productoras de Ácido Láctico

2.3.1.1. Aislamiento de Cepas Bacterianas Productoras de Ácido Láctico

Se seleccionó dos cepas bacterianas, según Willis ^[11], Escobar ^[33] y Leon ^[34] utilizan las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*

como bacterias precursoras de Ácido Láctico. La cepa de *Lactobacillus casei* fue obtenida a partir de un inóculo de yogurt, mientras que la cepa de *Staphylococcus aureus* fue proporcionado por el laboratorio de microbiología de la Universidad Católica de Santa María.

Para la cepa de *Lactobacillus casei* se recomendó el uso del medio selectivo Rogosa, sugiriendo la adición de NaCl al 2.5 % para inhibir a *Lactobacillus bulgaricus* y de esa forma tener únicamente *Lactobacillus casei* y ajustando medio Rogosa a un pH de 6.4, para obtener mejor adaptabilidad del *Lactobacillus casei* y tener un mejor crecimiento Como se detalla en el Anexo 1– Tabla N°10 [36].

Para el *Staphylococcus aureus* se recomendó el uso del medio selectivo Manitol Salado [11]. Siguiendo la metodología de la Tabla N°11 del Anexo 2. Luego se esterilizaron en el autoclave.

Lactobacillus casei

El aislamiento en medio sólido se realizó por siembra por estría, en medio agar nutritivo y agar Rogosa. Las condiciones de incubación son: Aerobiosis, a 30 – 32 °C por 48 horas, hasta la formación de colonias [10].

Staphylococcus aureus

El aislamiento en medio sólido se realizó por siembra por estría en medio agar Manitol Salado, este medio de cultivo tiene un reactivo rojo de Fenol, este reactivo es un compuesto orgánico indicador de pH. Si se torna de color amarillo indicara un pH inferior a 6.8 y si se torna de color violeta indicara un pH superior a 8 y entre los pHs 6.8 y 8 dan tonalidades a rojo-cereza [17]. Las condiciones de incubación son: Aerobiosis, a 30 – 32 °C por 48 horas, hasta la formación de colonias [8].

2.3.1.2. Identificación de Cepas Productoras de Ácido Láctico

Caracterización Macroscópica

Se realizó la siembra por estría en agar Rogosa, y Manitol Salado, luego se incubó hasta la formación de colonias en un periodo de 48 horas. Se realizó la descripción morfológica de sus colonias teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Forma, superficie, elevación, borde, tamaño, color, lustre y consistencia [8].

Caracterización Microscópica por Tinción de Gram

Mediante la inspección visual con el uso de microscopio óptico y tinción de Gram, se describió la morfología de las bacterias, color, presencia o no de flagelos y esporas [8].

Caracterización Bioquímica por API20

Según Cristina Martínez [74], recomienda la técnica de detección rápida API20.

- Se tomó una colonia axénica de cada microorganismo y se re-suspendió homogéneamente en 5 mL de solución salina (1% de NaCl) o 5 mL de agua estéril. Cada pocillo tiene un tubo y una cúpula (parte aerobia).
- Se llenó con la suspensión de bacterias los tubos más no la cúpula, de todos los pocillos.
- Se llenó la cúpula del pocillo VP con la suspensión de bacterias.
- Se tapó con parafina las cúpulas de los pocillos ADH y URE, para obtener anaerobiosis.
- Se puso la tira en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente se puso agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.
- Se incubó a 37 °C durante 18-24 h.

- Luego se anotó la lectura de los resultados y se llevó a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con los de la tabla de lectura del Anexo 3, Tabla N° 12 ^[36,74].

2.3.2. Determinación de la Cinética del *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*.

Para la determinación de la cinética de ambas bacterias que tienen la capacidad de producir Ácido Láctico, según Escobar & Rojas ^[33], se recomendó la preparación del caldo Rogosa; se sembraron las cepas de *L. casei* y *S. aureus* por separado, posteriormente se llenaron los frascos y se conservaron dentro de la incubadora, tomando muestras cada 12 horas por 10 días conservando las mismas en refrigeración (crioconservación por hibernación). Para hallar la curva de crecimiento bacteriano se utilizó el método de conteo celular por cámara de Neubauer ^[36].

Por consiguiente las muestras fueron llevadas a temperatura ambiente; se pesaron tubos Eppendorf vacíos, luego se midió 1 mL de muestra, se centrifugó por un lapso de 5 minutos a 5000 rpm, pasado los 5 minutos se eliminó el sobrenadante y se pesó el tubo Eppendorf con el *pellet* formado, se determinó la masa por diferencia de pesos ^[17].

(Ec.5)

$$\text{Cel/mm}^3 = (\text{N}^\circ \text{ de células contadas}) \times (\text{Factor de dilución}) \times (1/\text{Factor de volumen})$$

2.3.3. Inmovilización por Entrampamiento Celular

Según Aguayo & Contreras ^[18] se procedió al pesado de Alginato de Sodio para cada cepa, dichas cepas están inoculadas en Caldo Incubadora Rogosa, posteriormente se procedió a mezclar en un agitador magnético a temperatura ambiente hasta obtener una mezcla homogénea ^[18].

Los *Pellets* fueron formados mediante la extracción con una jeringa hipodérmica de 10 mL, dejando caer gota a gota la mezcla de *Lactobacillus casei* con Alginato de Sodio en soluciones de CaCl₂ de 3, 4, 5 y 7% m/v, a una temperatura de entre 5 a 7 °C, hasta llegar a formar

perlas, luego se dejó reposar por un lapso de 14 horas, pasado las horas las perlas fueron colocadas en una solución salina (0.9% NaCl) y se llevó a refrigeración a una temperatura de 5°C por 24 horas para su respectiva conservación. Se aplicó el mismo procedimiento para la cepa de *Staphylococcus aureus* ^[17].

Después de la refrigeración los pellets fueron seleccionados mediante el uso de una gasa, lavándose con agua destilada estéril y Buffer acetato a un pH de 5.0, por lo menos 3 veces para remover cualquier posible material soluble. Se obtuvo un volumen de perlas de Alginato de Calcio en relación al volumen interior del Biorreactor PFTR. ^[16].

2.3.4. Diseño y Construcción del Biorreactor PFTR

Según Pacheco & Magaña ^[13], refiere que el modelo PFTR es un modelo riguroso capaz de simular reactores tubulares. Es por ello que se escogió este modelo de Biorreactor para la producción de Ácido Láctico ya que reúne las condiciones adecuadas para la adaptación de las bacterias ^[13].

Luego se procedió al estudio del diseño de Biorreactor para las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*, es por ello que el estudio de Gaona ^[16] recomienda el uso del Biorreactor PFTR para la producción de Ácido Láctico.

Para la construcción del Biorreactor PFTR se tomó en cuenta la conformación de planos en 2D Figura N°20 y 3D Figura N°21 y un volumen de 0.35323 L.

Se consideró las especificaciones y exigencias de las bacterias a utilizar, y se realizó los siguientes pasos para la construcción del Biorreactor PFTR:

- Se utilizó 2 metros de tubo de acero inoxidable (Diámetro de ½ pulgada y un espesor de pared de 0.065 pulgadas). Que fueron cortadas en 2 partes de 80 cm de largo y una parte de 40 cm de largo.
- Se utilizó 2 codos de acero inoxidable. Que fueron embonadas y soldadas a los extremos de los tubos de acero inoxidable hasta llegar a la forma de “U”.

- Luego se procedió a soldar las 2 pretinas, 2 mallas, 2 llaves de paso todo en acero inoxidable; en los dos extremos del Biorreactor.
- Después se enchaquetó las tuberías de acero inoxidable con tuberías y codos de PVC de diámetro de 4 pulgadas, para el paso de agua caliente.
- Se forró las tuberías de PVC con lana de vidrio para mantener la temperatura requerida y evitar la pérdida de la misma.
- Luego se recubrió la lana de vidrio con tela tipo “lona”.

2.3.4.1. Determinación de las Dimensiones del Biorreactor PFTR

Para el Biorreactor PFTR, se necesitaba una cantidad específica de *pellets* de Alginato de Calcio, pero para obtener el dato específico del volumen necesario de *pellets* se necesitaba conocer el volumen del tubo interior del Biorreactor. Utilizando los datos respecto de las medidas de las dimensiones del tubo interior del PFTR, se determinó el volumen interior.

• Determinación del Caudal (Q)

Se utilizó el método volumétrico para determinación de caudal, para lo cual en la llave de salida del Biorreactor se colocó una probeta de 100 mL y con un cronómetro se tomó un minuto; lo que permitió determinar el caudal en L/minuto a la más baja velocidad que se pudo colocar para el flujo de entrada del Biorreactor.^[17]

• Determinación del Tiempo de Residencia Hidráulica (TRH)

Para esta medición se usó los valores antes hallados y usando la siguiente **ecuación (1)** se determinó el tiempo que demora el Lacto-suero desde el ingreso hasta la salida del Biorreactor PFTR.^[17]

(Ec. 1)

$$TRH = \frac{V}{Q}$$

Donde:

THR: Tiempo de residencia hidráulica (h)

V: Volumen del biorreactor (m³)

Q: Caudal en el biorreactor (m³/h)

- **Determinación del Espacio Hueco (ϵ)**

$\epsilon = \text{Volumen Hueco} / \text{Volumen Total}$

(Ec. 2)

$$\epsilon = \frac{\text{Volumen Hueco}}{\text{Volumen Total}}$$

- **Determinación del Espacio Ocupado (Ψ)**

$\Psi = \text{Volumen Ocupado} / \text{Volumen Total}$

(Ec. 3)

$$\Psi = \frac{\text{Volumen Ocupado}}{\text{Volumen Total}}$$

2.3.5. Puesta en Marcha del Biorreactor para la Obtención de Ácido Láctico

Luego de la construcción del Biorreactor y la instalación de sus componentes; el Biorreactor fue llenado por separado con perlas de cepas de: *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*, luego se puso en marcha las bombas, tanto la bomba peristáltica para bombear el suero de leche por el interior del tubo de acero inoxidable que se encuentra llenas por perlas de Alginato de Calcio y otra bomba extrae el presunto Ácido Láctico, y también la bomba de agua caliente con recirculación, con una temperatura de 40 °C que llena las cavidades del tubo de PVC, que hace la función de aclimatación de las cepas para su óptimo funcionamiento de fermentación.

2.3.6. Determinación y Comparación de Ácido Láctico Producido por las Cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*.

Primero se dejó sedimentar la muestra obtenida del Biorreactor durante 24 horas, transcurrido el tiempo indicado se procedió aplicar el procedimiento de precipitación.

En una pera de decantación se mezcló 50 mL de CaCl_2 con 500 mL de Ácido Láctico impuro, llegando a acidificar con Ácido Clorhídrico hasta obtener un pH de 3 – 4, luego se procedió con una agitación de 5 minutos aproximadamente, posteriormente se agregó 40 mL de Cloroformo, y se agitó fuertemente por otros 5 minutos dejándolo reposar por un lapso de 10 minutos para poder pasar de la fase acuosa a la fase orgánica, pasando la fase orgánica a otro embudo de decantación cuidando de que no pase la fase acuosa, repitiendo nuevamente el ensayo agregando sobre la fase acuosa del primer embudo 30 mL de Cloroformo y así poder aumentar más el volumen del presunto Lactato de Calcio.

Finalmente para determinar la presencia de ácido se realizó una titulación, para ello se realizó los siguientes pasos:

Se midió 20 mL de muestra en un matraz erlenmeyer y se diluyó agregando dos veces su volumen con agua destilada. Luego se añadió 4 gotas de solución de Fenolftaleína y se tituló con Hidróxido de Sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado que persista de 15 a 30 segundos. Para determinar el porcentaje de pureza del Ácido Láctico se aplicó la **Ecuación (5)**.

$$\text{Acidez g/ L (Ácido Láctico)} = \frac{V \times N \times 90}{M} \quad (\text{Ec. 5})$$

V =Volumen de solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N gastado en la titulación de la muestra, en mL.

N = Normalidad de la solución de Hidróxido de Sodio por 90 Equivalente al peso atómico del Ácido Láctico.

M = Volumen de la muestra en mL.

Para determinar la presencia de Ácido Láctico presente en la muestras, se realizó una prueba de análisis de determinación de espectrofotometría infrarroja FTIR, llevado a cabo en el Laboratorio de

Investigación y Servicios “LABINVSERV” de la Universidad Nacional de San Agustín “UNSA”. Se siguió los siguientes pasos:

- La muestra se pasó del vial a las ventanas que son de Fluoruro de Calcio (CaF₂).
- Las ventanas con la muestra se introdujeron en un peltier.
- El peltier se colocó en el espectrógrafo FT-IR.
- El espectrógrafo FT-IR se conectó a un computador desde donde se realizó la configuración del experimento. Aquí es donde uno escoge la cantidad de escaneos, la resolución y el material de las ventanas entre otros. También, el programa permite procesar datos.

2.3.7. Polimerización de Ácido Láctico (AL) a Ácido Poliláctico (PLA)

2.3.7.1. Esterificación

Puesto que la condensación es una reacción de equilibrio, existen dificultades para eliminar cierta cantidad de agua durante las últimas etapas de la polimerización lo cual limita el peso molecular del polímero obtenido por este método ^[23].

Se agregó 100 mL de Ácido Láctico más 5 mL de ácido sulfúrico 60% m/v, en un termo-agitador a 80 °C los primeros 34 minutos. No se apreció cambio alguno por lo que se decidió modificar las condiciones. Se aumentó la temperatura a 120 °C, el color de la solución pasó de un transparente a un ámbar claro. Pasadas las primeras dos horas se agregaron otros 5mL de ácido sulfúrico ^[20].

2.3.7.2. Método de Ruptura del Anillo Polimérico (ROP: *ring opening polymerization*)

Según el método de Alvarez & Guan-Xin ^[58,69] es que se realizó la poli-condensación del Ácido Láctico seguido de una despolimerización con el fin de obtener el dímero cíclico deseado, la *lactida*, polímeros de alto peso molecular pueden ser obtenidos tras la apertura del anillo.

Se colocó 5.01 g de la *Lactida* aparente con 50 mL de Metanol y 3 g de Cloruro de Estaño (II), en un termo agitador a 50 °C (Figura N°9). Pasando casi un minuto se empezó a formar un sedimento blanco en el vaso de precipitados ^[69].

2.3.8. Caracterización y Análisis de la Obtención del Ácido Poliláctico

2.3.8.1. Análisis de Determinación de Espectrofotometría Infrarroja (FT-IR).

La absorbancia de un material de luz infrarroja a diferentes frecuencias produce una única "huella espectral" en base a las frecuencias en las que el material absorbe la luz infrarroja y la intensidad de las absorciones.

El protocolo experimental se encuentra dividido en dos partes: la preparación de muestras y el IR ^[71].

Preparación de muestras

- Se pesó 2 mg de la muestra en una balanza analítica y se introdujo en un vial de vidrio.
- En los viales de vidrio, se preparó en solución de cloroformo cada muestra PLA en concentración 2 mg/mL. A esto se le llama Stock de muestra.
- En otro vial de vidrio, se mezcló la muestra y se agitó en el Vortex por 10 segundos.
- A la mezcla se le hizo un secado con Nitrógeno hasta no ver líquido. Al final se observó una película blanca translúcida.
- Se desecó la mezcla a 40 °C en vacío por 12 horas.
- Se preparó 40 mL de muestra en proporción 10:30 buffer. Se cerró con la tapa.
- Se agitó 5 veces la muestra con una Micro-pipeta a una temperatura de 60 C° - 65 C°.

Protocolo sobre el IR

- La muestra se pasó del vial a las ventanas que son de Fluoruro de Calcio (CaF_2).
- Las ventanas con la muestra se introdujeron en un peltier.
- El peltier se colocó en el espectrógrafo FT-IR.
- El espectrógrafo FT-IR se conectó a un computador desde donde se realizó la configuración del experimento. Aquí es donde uno escoge la cantidad de escaneos, la resolución y el material de las ventanas entre otros. También, el programa permite procesar datos.



CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO

3.1.1. Aislamiento de Cepas Bacterianas Productoras de Ácido Láctico

Caracterización Macroscópica

Lactobacillus casei

Como se resume en la Tabla N°3. Se observa colonias blanquecinas, redondeadas en formas de gotas alargadas, de bajo crecimiento, así mismo no se observa contaminación por hongos u otras bacterias, como se aprecia en la Figura N°6. Considerando estos resultados se presume que es la bacteria *Lactobacillus casei*.

Tabla N° 3: Descripción macroscópicas del *Lactobacillus casei*

Características	Resultado
Forma	Ovoide
Superficie	Elevada
Elevación	Convexa
Borde	Uniforme
Tamaño	1 mm
Color	Blanco perla
Lustre	Brillante
Consistencia	Cremosa



Figura N° 6: Vista Macroscópica de las Colonias de *Lactobacillus casei*

Staphylococcus aureus

Pasadas las 48 horas de incubación, el medio Manitol Salado tornó de color amarillo debido a que la cepa de *Staphylococcus aureus* tiende a acidificar el medio. Se realizó la descripción morfológica de sus colonias teniendo en cuenta los siguientes parámetros: Forma, superficie, elevación, borde, tamaño, color, lustre, consistencia; Tabla N°4 y se observa presencia de colonias blanquecinas pequeñas, redondeadas, de rápido crecimiento, así mismo no se observa

contaminación por hongos u otras bacterias, como se aprecia en la Figura N°7, que es característico de la cepa *Staphylococcus aureus*. [12,36].

Tabla N° 4: Descripción macroscópica de *Staphylococcus aureus*

Características	Resultado
Forma	Redondeada
Superficie	Plana
Elevación	Convexa
Borde	Amorfo
Tamaño	1.5 mm
Color	Marrón con bordes blancos
Lustre	Brillante
Consistencia	Cremosa

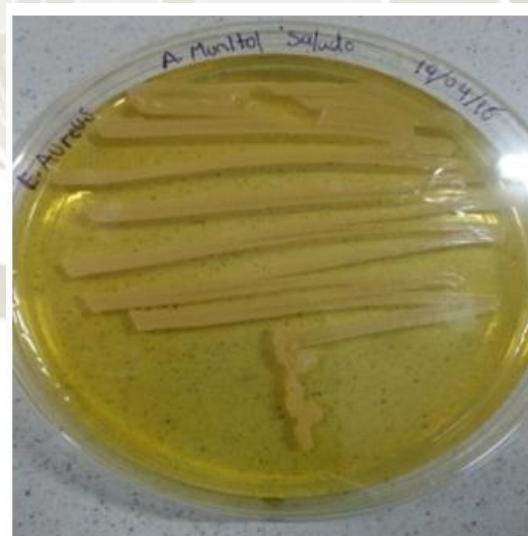


Figura N° 7: Vista Macroscópica de las Colonias de *Staphylococcus aureus*

3.1.2. Identificación de Cepas Productoras de Ácido Láctico

Caracterización Microscópica con Tinción de Gram.

Lactobacillus casei.

Al realizar la tinción de Gram y observar con el lente de 100 X. Las células exhibieron morfología de bacilos en forma de bastones largos rectos. No se observaron esporas. Fue notoria una distribución particular, pues la mayoría de las células se disponían en cadenas de hasta tres, estas características son típicas de *Lactobacillus casei* [34,35, 37]. Como se observa en la Figura N°8.

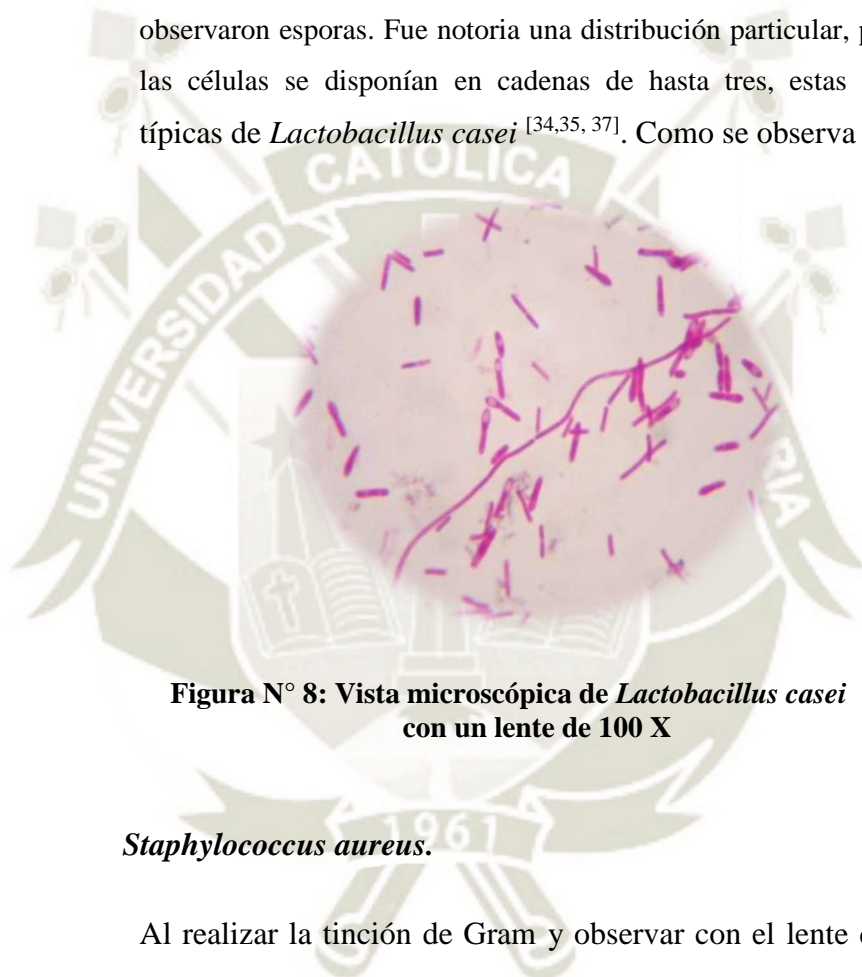


Figura N° 8: Vista microscópica de *Lactobacillus casei* con un lente de 100 X

Staphylococcus aureus.

Al realizar la tinción de Gram y observar con el lente de 100 X, se observan bacterias en forma ovoide como ramificaciones irregulares similares a un racimo de uvas, no producen esporas y carecen de flagelos, como se aprecia en la Figura N°9, todas estas características son típicas de *Staphylococcus aureus*, contrastando con la información brindada por Waldvogel [72] J. Willis [11].

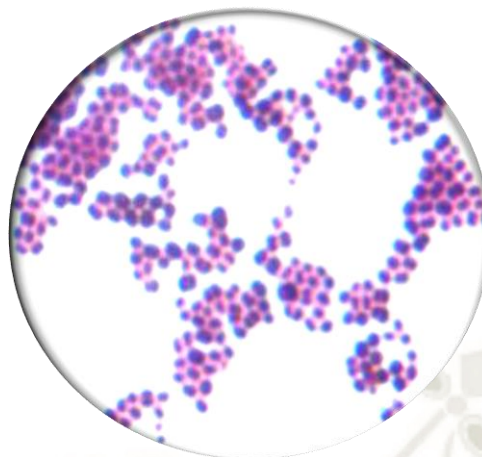


Figura N° 9: Vista Microscópica *Staphylococcus aureus* con un lente de 100 X

Finalmente se detectó diferencias entre las cepas. Obteniendo mayor crecimiento de colonias, rapidez en la formación de colonias y mayor adaptabilidad al medio de cultivo; fue la cepa de *Staphylococcus aureus* a diferencia de la cepa de *Lactobacillus casei*, según Leon et al. [34] afirma que la bacteria de *Lactobacillus casei* toma más tiempo en adaptarse a los medios de cultivo y por ello tiene un crecimiento lento.

Tabla N° 5: Comparación Microscópica de Ambas Cepas.

CARACTERÍSTICAS	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Morfología	Bastones largos	Ovoides
Color	Violeta claro	Violeta oscuro
Formación de Colonias	Lento	Rápido
Medio de Cultivo	Rogosa	Manitol Salado

Caracterización Bioquímica por API20.

Del conjunto de reacciones y resultados del Kit de identificación rápida (API20), se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos fueron separados en grupos de tres:

Siete grupos de tres tubos o tripletes. A cada pocillo se le da el valor de: 0, 1, 2 o 4.

La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones obtenidas, dicha interpretación se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo, con el que se muestra en la carta de colores del kit. De acuerdo a esta interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) ó negativo (-), como se observa en las Figuras N° 10 y N° 12.

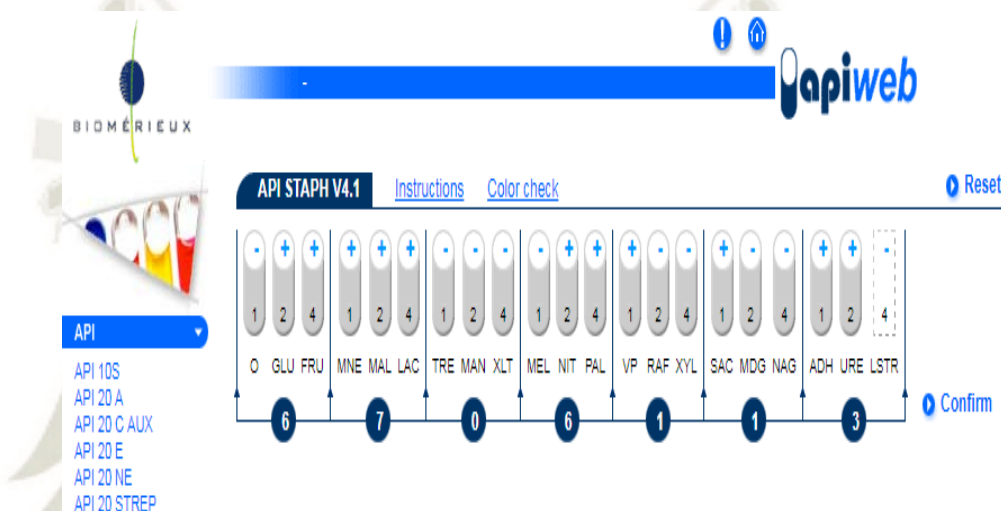


Figura N° 10: Verificación en APIWEB TM de *Staphylococcus aureus*

Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

Los datos obtenidos fue transformado en un código de siete dígitos, denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas (+) asignados previamente a la planilla. Los dígitos obtenidos fueron “6706113”, el cual fue ingresado en la plataforma virtual APIWEB, dando como resultado en un **97.9%** de probabilidad que la cepa a identificar es *Staphylococcus aureus* [38,39,40] , como se aprecia en Figura N°11.

Figura N° 11: Comprobación de los 7 dígitos obtenidos del Kit de API STAPH de *Staphylococcus aureus*

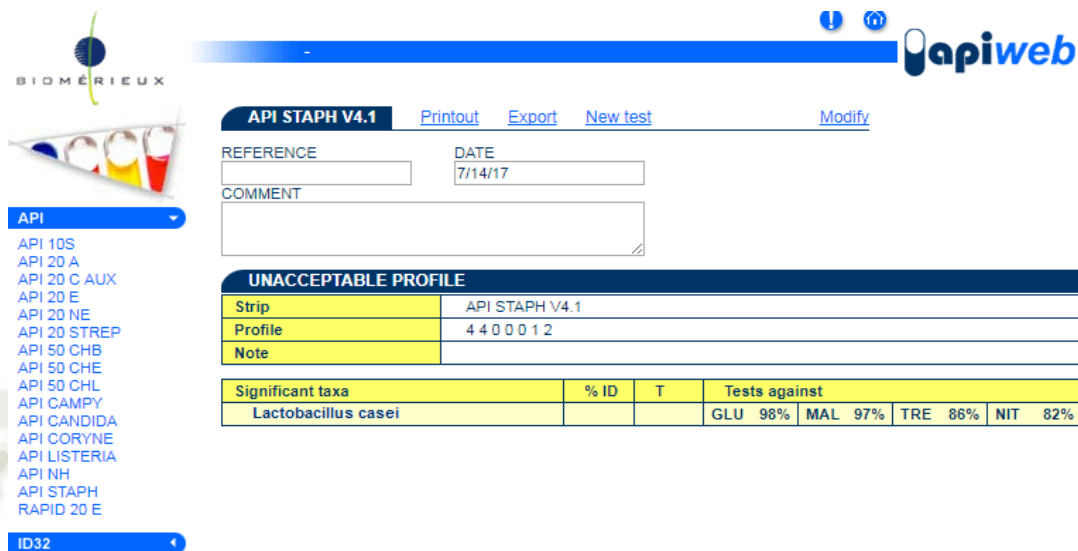
Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

Figura N° 12: Verificación en APIWEB TM de *Lactobacillus casei*

Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

Los dígitos obtenidos fueron “4400012”, el cual fue ingresado en la plataforma virtual APIWEB, dando como resultado en un **98%** de

probabilidad que la cepa a identificar es *Lactobacillus casei* [40,41], como se aprecia en la Figura N°13.



Significant taxa	% ID	T	Tests against			
<i>Lactobacillus casei</i>			GLU 98%	MAL 97%	TRE 86%	NIT 82%

Figura N° 13: Comprobación de los 7 dígitos obtenidos del Kit de API

Tomado de: <https://apiweb.biomerieux.com/login>

3.2 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA O CRECIMIENTO MÁXIMO DEL *Lactobacillus casei* Y *Staphylococcus aureus*

3.2.1. Determinación de la Cinética de Ambas Cepas

Se realizó a cada una su curva de crecimiento, mediante la sumatoria de las bacterias presentes en los cuadrantes de la cámara de Neubauer, aplicando la Ecuación (5) y los datos de las tablas N° 14 y 15 de los Anexos 7 y 8.

(Ec.5)

$$\text{Cel/mm}^3 = (\text{N}^\circ \text{ de células contadas}) \times (\text{Factor de dilución}) \times (1/\text{Factor de volumen})$$

Reemplazando:

Lactobacillus casei.

$$\text{Cel /mm}^3 = (320) \times (20) \times (1/0.04)$$

$$\text{Cel /mm}^3: 16.000 \text{ Lactobacillus casei./ mm}^3$$

Staphylococcus aureus.

$$\text{Cel /mm}^3 = (560) \times (20) \times (1/0.04)$$

$$\text{Cel /mm}^3: 28.000 \text{ Staphylococcus aureus / mm}^3$$

La Figura N° 14 y la Figura N° 15 muestran las curvas de crecimiento relacionando el N° de bacterias con el tiempo para cada una de las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

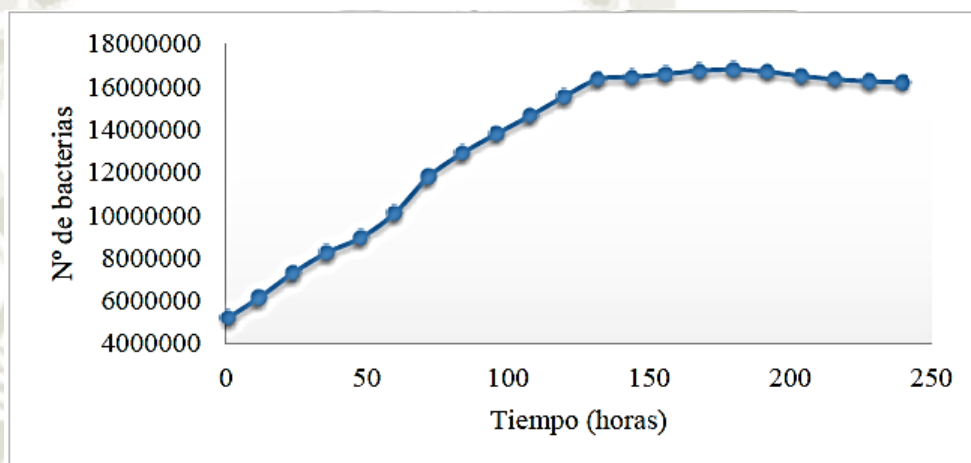


Figura N° 14: Rango de crecimiento de la bacteria *Lactobacillus casei*.

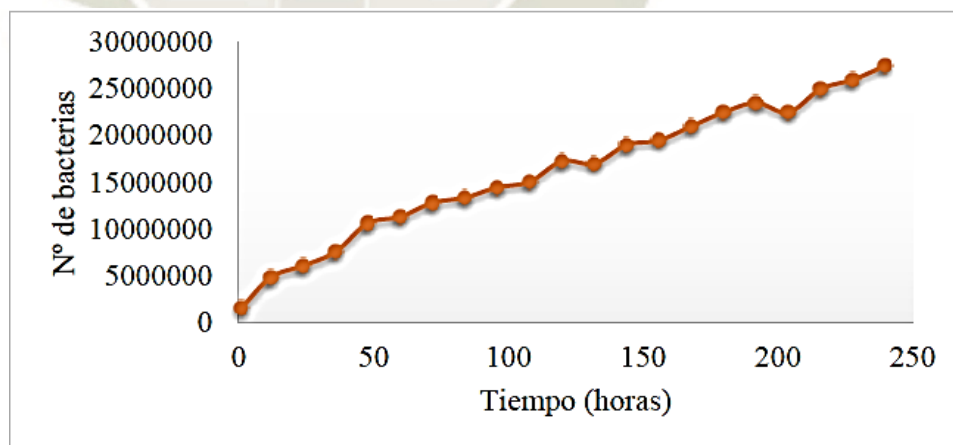


Figura N° 15: Rango de crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

La diferencia de crecimiento por conteo de bacterias se observa en la Figura N° 14 que la bacteria de *Lactobacillus casei* tiene un crecimiento lento, llegando a una fase estacionaria en corto tiempo, a diferencia de la bacteria

de *Staphylococcus aureus* Figura N° 15, donde se observa que la cepa tiene un crecimiento rápido y al término de la investigación no se llegó a determinar su fase estacionaria.

En las Figuras N° 16 y N° 17, se observa la relación de la masa con el tiempo para cada una de las cepas de *Lactobacillus casei* y de *Staphylococcus aureus* [42].

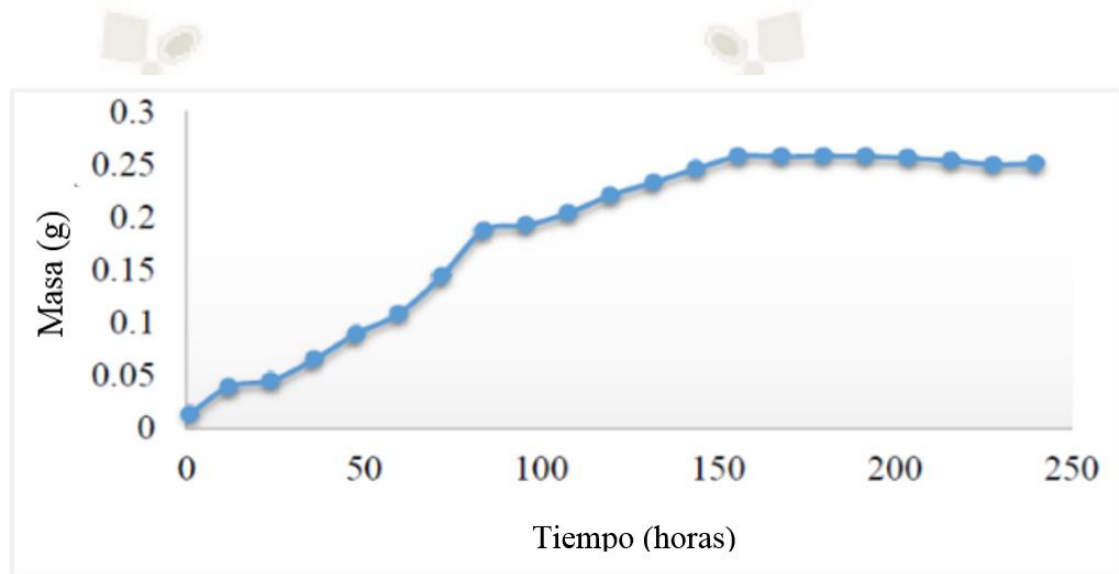


Figura N° 16: Curva de crecimiento relacionando en gramos de bacterias con el tiempo de la cepa de *Lactobacillus casei*

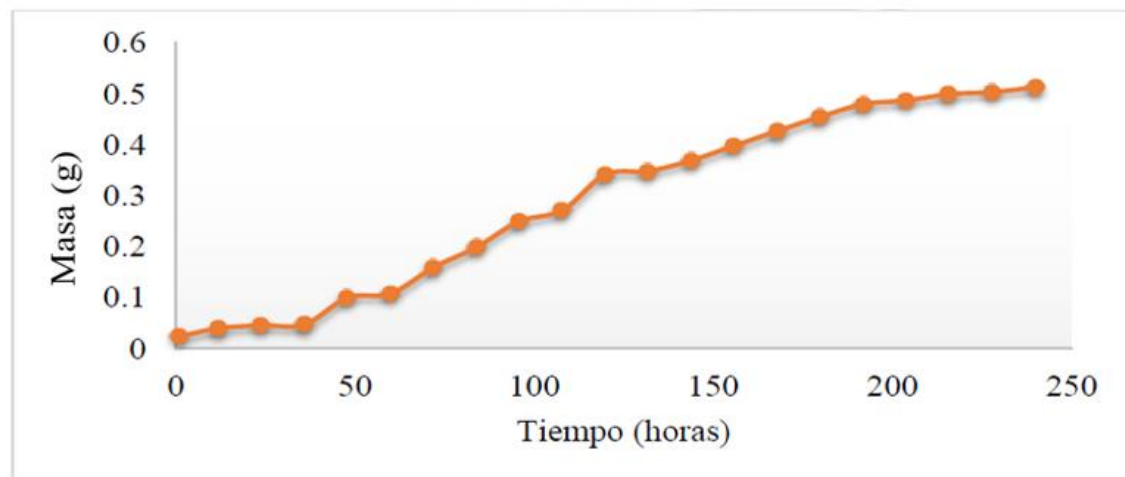


Figura N° 17: Curva de crecimiento relacionando en gramos de bacterias con el tiempo de la cepa de *Staphylococcus aureus*.

Ambas cepas *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* en un tiempo de 96 horas las bacterias entran en etapa estacionaria; esto se puede observar en las Figuras N° 18 y N° 19, que muestran las curvas de crecimiento por cada cepa relacionando el Log (N° de bacterias) con el tiempo, donde se distinguen tres de las cuatro etapas de desarrollo bacteriano; la fase de latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria [44].

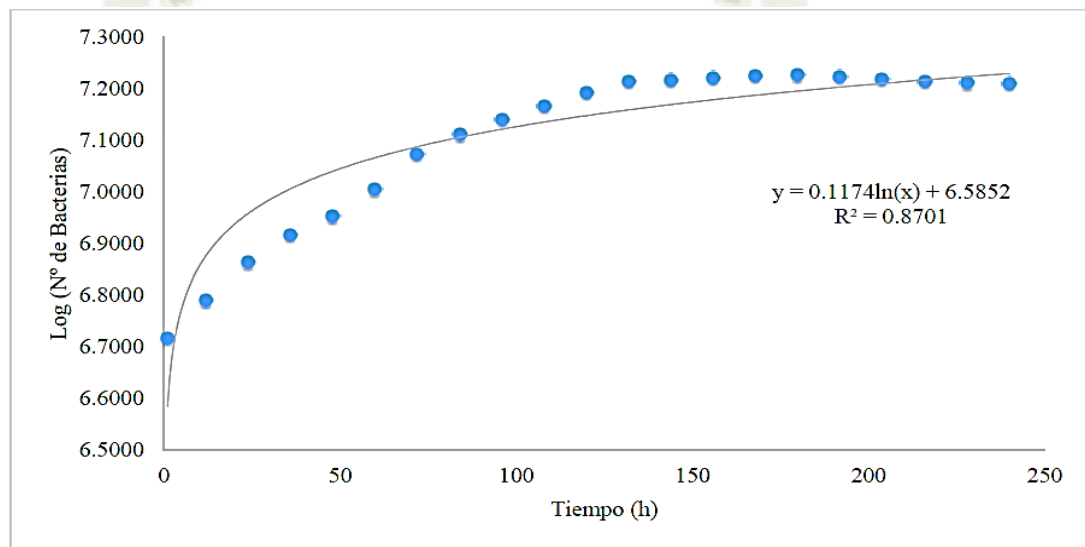


Figura N° 18: Curva de cinética bacteriana de la cepa de *Lactobacillus casei*

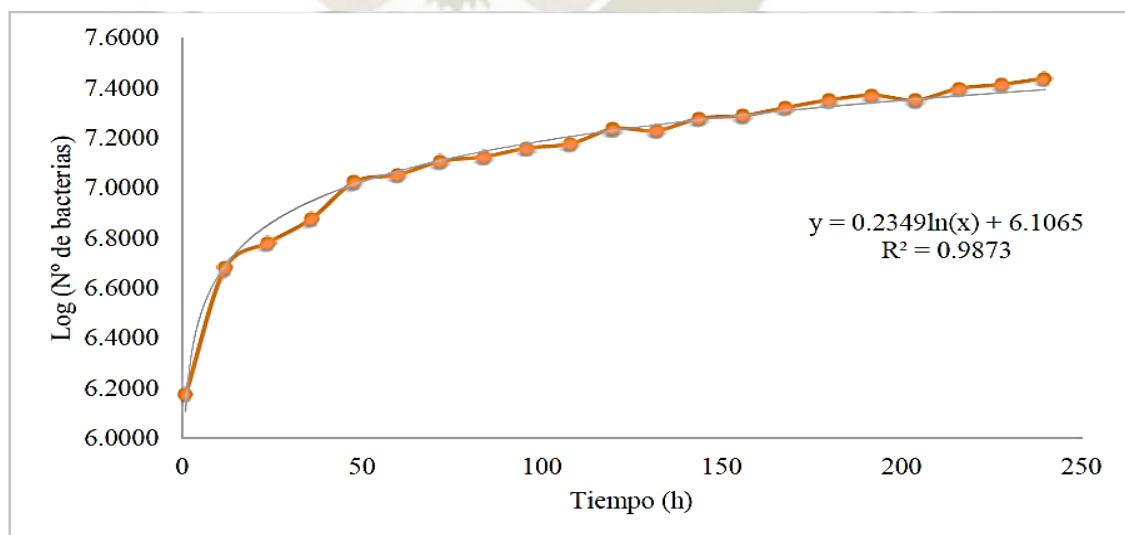


Figura N° 19: Curva de cinética bacteriana de la cepa *Staphylococcus aureus*

3.3 INMOVILIZACIÓN POR ENTRAMPAMIENTO CELULAR

Para la inmovilización celular se utilizó Alginato de Calcio, ya que el Alginato de Sodio al estar en presencia de Calcio, forma una estructura resistente pero a la vez permeable.

Estos inmovilizados permiten una superficie de área para el crecimiento de las células, también estas estructuras porosas ofrecen un ambiente protector para las células, evitando su destrucción ante el estrés provocado por las fuerzas hidrodinámicas de los flujos de alimentación.

Según Aguayo & Contreras ^[18] indica que la solidez de los *pellets* está relacionada con la interacción del CaCl_2 , es por ello que se utilizaron diferentes concentraciones las que fueron: 3, 4, 5 y 7% m/v. Se observa que los *pellets* obtenidos con la concentración de 3% CaCl_2 , presentaban poca rigidez, en comparación con concentraciones superiores 5% y 7% CaCl_2 mostraban mayor rigidez. De acuerdo a los datos obtenidos se concluye que la mejor concentración de CaCl_2 fue de 4% contribuyendo a una mejor rigidez y permeabilidad ^[44, 48].

Tabla N° 6: Prueba de Formación de Perlas de Alginato Relacionada con la Concentración de CaCl_2 . A una Temperatura de entre 5 a 7 °C.

CONCENTRACIÓN DE CaCl_2	RIGIDEZ	FORMA
3% m/v	Menor	Bastón
4% m/v	Mayor	Esférica
5% m/v	Mayor	Ovoide alargada
7% m/v	Menor	Amorfo

Luego de varias pruebas realizadas se concordó que la altura de 10 cm con una presión lenta de la jeringa y una concentración de CaCl_2 del 4% m/v es la óptima para la formación de *pellets* de entre 0.30 a 0.40 cm de diámetro, el cual tiene una

morfología esférica y consistente. Contrastando con la información brindada por Aguayo & Contreras ^[18]. Indica que la porosidad sugiere la posibilidad de facilitar la entrada y salida de los solventes, a fin de hacer más fácil la accesibilidad al entorno, aspectos como la distancia de separación de la boquilla, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación e influyen en su forma esférica y tamaño ^[16, 18].

Antes de usar el Lacto-suero como precursor fermentativo de las bacterias se realizó la medición de grados Brix como se detalla en Anexo 12.

3.4 CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR PFTR

3.4.1 Diseño del Biorreactor PFTR

Se diseñó el Biorreactor de forma tubular de flujo pistón o por sus siglas en ingles PFTR y se desarrolló el modelo de Biorreactor a nivel de escala de laboratorio, mediante *software* de diseño gráfico ^[17, 47]. El diseño en 2D, con vista de perfil con una escala de 1:20 m, vista planta con una escala de 1:20 m y vista isométrica con una escala de 1:50 m, como se aprecia en la Figura N°20, que brinda las medidas específicas internas y externas para desarrollar la construcción del reactor biológico y el diseño en 3D que se desarrolló a una escala de 1:20 m, como se puede observar en la Figura N°21, que brinda el ensamblaje y diseño exterior del Biorreactor en mención y de esta manera poder llegar a concretar el Biorreactor PFTR deseado que tiene un volumen aproximado de 0.35323 L.

El Biorreactor PFTR es adecuado para el uso de bacterias fermentadoras llegando a ser más eficiente que otros Biorreactores, evitando la fatiga de las cepas, como indica Seghezzeo ^{[48,4}

3.4.1.1 Biorreactor PFTR- Plano 2D

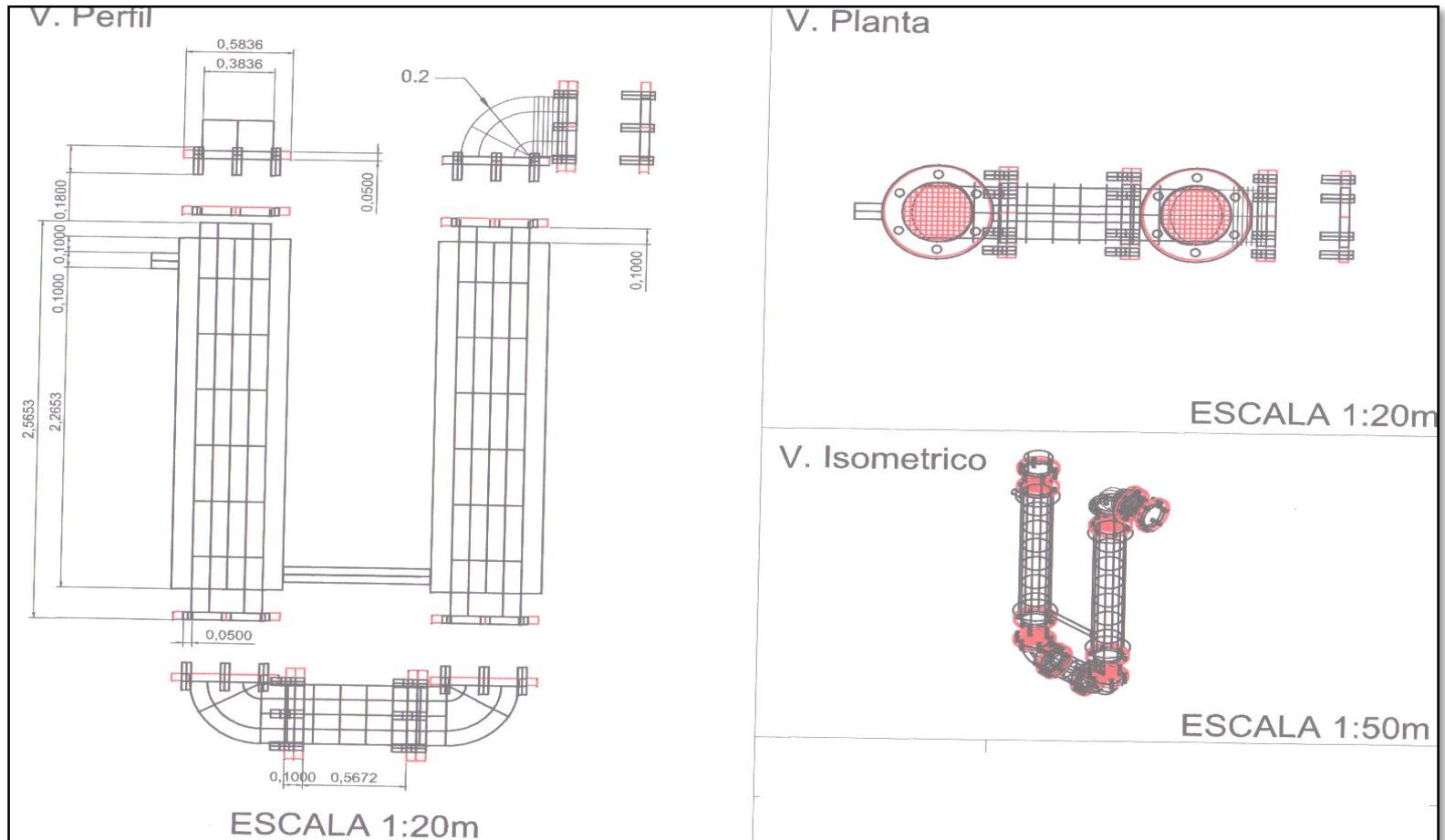


Figura N° 20: Planos de diseño del Biorreactor PFTR en 2D

3.4.1.2 Biorreactor PFTR- Plano 3D

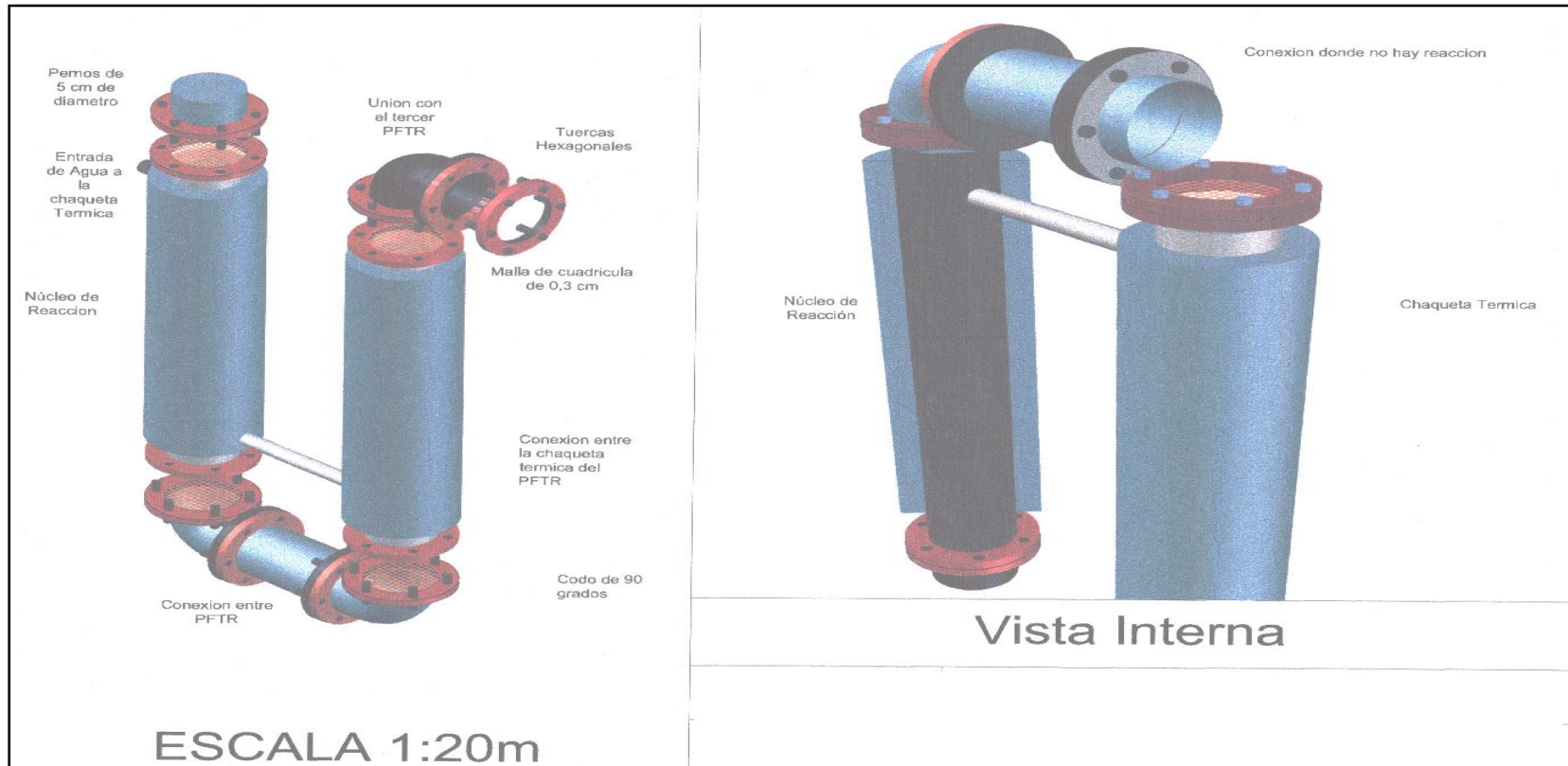


Figura N° 21: Plano del diseño en 3D del Biorreactor PFTR

3.4.2 Construcción Del Biorreactor PFTR

Construido de acero inoxidable y enchaquetado con tubo PVC, lana de vidrio y lona, concordando con los modelos de 2D y 3D.

Se escogió el modelo PFTR (Flujo Pistón) como se observa en la Figura N° 23, en virtud de las obvias ventajas hidrodinámicas como por ejemplo, la menor posibilidad de formación de zonas muertas, además del tamaño, volumen y caudal ^[49].

Se utilizó 2 metros de tubo de acero inoxidable (Diámetro de ½ pulgada y un espesor de pared de 0.065 pulgadas) y 2 codos de acero inoxidable, 2 pretinas, 2 mallas, 2 llaves de paso todo en acero inoxidable ^[32,45].

Luego se enchaquetó las tuberías de acero inoxidable con tuberías y codos de PVC de diámetro de 4 pulgadas, para el paso de agua caliente.

Después se forró las tuberías de PVC con lana de vidrio para mantener la temperatura requerida y evitar la pérdida de la misma y finalmente se recubrió la lana de vidrio con tela tipo “lona” ^[45].



Figura N° 22: Biorreactor PFTR– Flujo pistón

Se utilizó este tipo de Biorreactor PFTR a diferencia del Biorreactor tipo *batch*, ya que este último es característico por la falta de ingreso de medio de cultivo fresco y biomasa en su interior, debido a que todos sus nutrientes y la biomasa son colocados al mismo tiempo para poder comenzar con el bioproceso, mientras que el Biorreactor tipo PFTR es controlado por sistemas de retroalimentación por medio de válvulas manuales que facilita el control del ingreso y salida del producto ^[16,49].

3.4.3. Determinación de las Dimensiones del Biorreactor PFTR

Para determinar el volumen interno del tubo de acero inoxidable se tomó en cuenta las siguientes medidas mostradas en la tabla N°7

Tabla N° 7: Dimensiones del Tubo Interno del Biorreactor de tipo PFTR

Largo (cm)	Diámetro (cm)	Volumen interno (cm ³)
200	3.5	353.23

Una vez determinado el volumen interno del Biorreactor que es 353.23 cm³, se pudo determinar los siguientes parámetros:

- **Determinación del Caudal (Q)**

Al realizar la medición con el método volumétrico colocando una probeta al final de la manguera de salida del Biorreactor se encontró que se tenía un caudal de 0.6866 cm³/s.

- **Determinación del Tiempo de Residencia Hidráulica (TRH)**

El tiempo de residencia hidráulica (TRH), permite conocer el tiempo que demora el lacto-suero desde su ingreso hasta su salida, esto se calculó con la **ecuación (1)**.

$$THR = \frac{V}{Q}$$

(Ec. 1)

Donde:

THR: Tiempo de residencia hidráulica (h)

V: Volumen del biorreactor (cm^3)

Q: Caudal en el biorreactor (cm^3/s)

$$\text{TRH} = \frac{0.35323 \text{ cm}^3}{0.6866 \text{ cm}^3/\text{s}}$$

$$\text{TRH} = 514,46 \text{ s}$$

$$\text{TRH} = 8.57 \text{ min}$$

Dado este resultado indica que en un tiempo de 8.57 minutos, significa que el medio se demora ese tiempo en recorrer todo el espacio en el interior del reactor [16].

Para poder conocer los valores del espacio hueco y espacio ocupado del biorreactor, se necesita primero conocer el valor del volumen hueco, el cual es obtenido restando el volumen total (353.23 cm^3) con el volumen total de *pellets* introducidos (335 cm^3), teniendo como tal, volumen hueco = **18.23 cm^3** .

Usando ese valor, se determina el volumen hueco y el volumen ocupado, utilizando la **Ecuación (2)** [16,45], se divide el volumen hueco (18.23 cm^3) entre el volumen total (353.23 cm^3) teniendo como resultado:

- **Determinación del Espacio Hueco (ϵ)**

$\epsilon = \text{Volumen Hueco} / \text{Volumen Total}$

$$\epsilon = \frac{\text{Volumen Hueco}}{\text{Volumen Total}}$$

(Ec. 2)

$$\varepsilon = \frac{18.23 \text{ cm}^3}{353.23 \text{ cm}^3}$$

$$\varepsilon = 0.0516$$

- **Determinación del Espacio Ocupado (Ψ)**

$$\Psi = \text{Volumen Ocupado} / \text{Volumen Total}$$

$$\Psi = \frac{\text{Volumen Ocupado}}{\text{Volumen Total}}$$

(Ec. 3)

$$\Psi = \frac{335 \text{ cm}^3}{353.23 \text{ cm}^3}$$

$$\Psi = 0.9483$$

En porcentaje el valor de ε es 5.16 % y para Ψ es 94.83%; esto nos indica de que los valores obtenidos son los adecuados para el funcionamiento del Biorreactor, ya que se sabe que el valor de ε debe de ser menor al 20% y el valor de Ψ no menor del 80%. (Cátedra dictada en Ing. de Biorreactores, Año 2012) ^[16].

3.5. PUESTA EN MARCHA DEL BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Luego se armó y se desinfectó mediante la inyección de agua hervida y vapor al interior del tubo de acero inoxidable del Biorreactor PFTR, se colocó las perlas inoculadas con las cepas indistintamente en la cavidad interna del Biorreactor PFTR, para ello se escogió un extremo para el llenado, se cortó una pequeña malla de acero inoxidable para evitar la fuga de las perlas y solo dejando pasar el sustrato, posteriormente se colocó los disco, empernándolos y sellándolos con masilla aislante, con sus respectivas válvulas.

El Biorreactor está conformado por dos bombas peristálticas y una bomba de agua con reflujo que lleva agua caliente a la tubería de PVC de enchaquetamiento para mantener el Biorreactor a una temperatura adecuada de entre 37 a 40°C, considerando la pérdida de calor; una bomba peristáltica que trasladaba lacto-suero por la tubería de acero inoxidable, en donde se encuentra las perlas de Alginato inoculadas con las cepas (*Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*) y otra bomba peristáltica que extrae a un frasco de vidrio estéril la presunción de Ácido Láctico. En las Figura N° 23 – Figura N° 24, observamos la medición de pH de las muestras extraídas del Biorreactor ^[16].



Figura N° 23: Medición del pH de la muestra de ácido Láctico para la fermentación de *L. casei*

La obtención de Ácido Láctico fermentado por la cepa de *Lactobacillus casei* en el Biorreactor PFTR, dio como resultado un pH de 3.0 (Tabla N° 8), este es un indicador de obtención de ácido ^[50].



Figura N° 24: Medición de pH de la muestra de Ácido Láctico para la fermentación de *S. aureus*.

Muestra obtenida del Biorreactor, que fue producido por la cepa de *Staphylococcus aureus*, dando como resultado un pH de 4.7 (Tabla N° 8) [6,7].

Tabla N° 8: Comparación de acidez entre las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*, con respecto a la temperatura de medición

Cepas	pH.
<i>Lactobacillus casei</i>	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.7

La medición de pH fue realizada con un potenciómetro debidamente calibrado según los estándares de calidad del laboratorio de fisicoquímica del departamento de control de calidad de la empresa SEDAPAR S.A.

Con la producción de acidez de ambas cepas, se observó que la cepa de *Lactobacillus casei* generó mayor acidez con un pH de 3.0 a diferencia de la cepa de *Staphylococcus aureus* que generó menor acidez con un pH de 4.7 [7].

3.6. Determinación y Comparación de Ácido Láctico Producido por las Cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*.

Se logró precipitar las muestras del presunto Ácido Láctico, llegando a observar fácilmente la fase acuosa a la fase orgánica, como se puede observar en la Figura N°25.



Figura N° 25: Proceso de Precipitación del Ácido Láctico

Para determinar la presencia de ácido se usó la **ecuación (5)** para las muestras de Ácido Láctico (AL) obtenidas del Biorreactor PFTR, mediante la fermentación del *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* dieron los siguientes resultados [51].

$$\text{Acidez g/ L (Ácido Láctico)} = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

(Ec. 5)

V=Volumen de solución de hidróxido de sodio 0.1 N gastado en la titulación de la muestra, en mL.

N= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio por 90 Equivalente al peso atómico del Ácido Láctico.

M= Volumen de la muestra, en mL.

- *Lactobacillus casei*

$$\text{Acidez g/ L (Ácido Láctico)} = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

(Ec. 5)

$$\text{Acidez g/ L (Ácido Láctico)} = \frac{34.6 \times 0.1 \times 90}{60}$$

$$\text{Acidez } \frac{\text{g}}{\text{L}} \text{ (Ácido Láctico)} = 5.19$$

- *Staphylococcus aureus*

$$\text{Acidez g/ L (Ácido Láctico)} = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

(Ec. 5)

$$\text{Acidez g/ L (Ácido Láctico)} = \frac{51.7 \times 0.1 \times 90}{60}$$

$$\text{Acidez } \frac{\text{g}}{\text{L}} \text{ (Ácido Láctico)} = 7.75$$

Tabla N° 9: Determinación del Ácido Láctico obtenido a partir de la fermentación del *Lactobacillus casei* frente al obtenido del *Staphylococcus aureus*.

	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Acidez $\frac{g}{L}$ (Ácido Láctico)	5.19	7.75

Los resultados obtenidos del análisis por Espectrofotometría Infrarroja FTIR del presunto Ácido láctico producido mediante la fermentación con la cepa de *Lactobacillus casei* como (Fermentado Hans Torres 1_1_1) y la cepa de *Staphylococcus aureus* como (Fermentado Hans Torres 2_1_1) como se aprecia en la Figura N° 26.

Las muestras fueron contrastadas con Lactato de Sodio (sal de Ácido Láctico) con código (Z00272) identificada en la Figura N° 26, esta sal es producida naturalmente mediante la fermentación de azúcares.

A las muestras analizadas se les resto espectralmente el agua presente en la muestra debido a que alteraba las lecturas, luego de la resta se realizó una búsqueda en la base de datos FDM (*Fiveash Data Management*) del laboratorio de Investigación y Servicios “LABINVSERV” de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA).

Por lo antes expuesto, se encontró una correlación de 0.802019 para la muestra de *Lactobacillus casei* rotulado como (Fermentado Hans Torres 1), concluyendo que tiene una similitud del 80% al Lactato de Sodio o sal de Ácido Láctico y 0.738536 para la muestra de *Staphylococcus aureus* rotulado como (Fermentado Hans Torres 2) el cual tiene una similitud del 73% al Lactato de Sodio o sal de Ácido Láctico como se observa en la Figura N° 27.

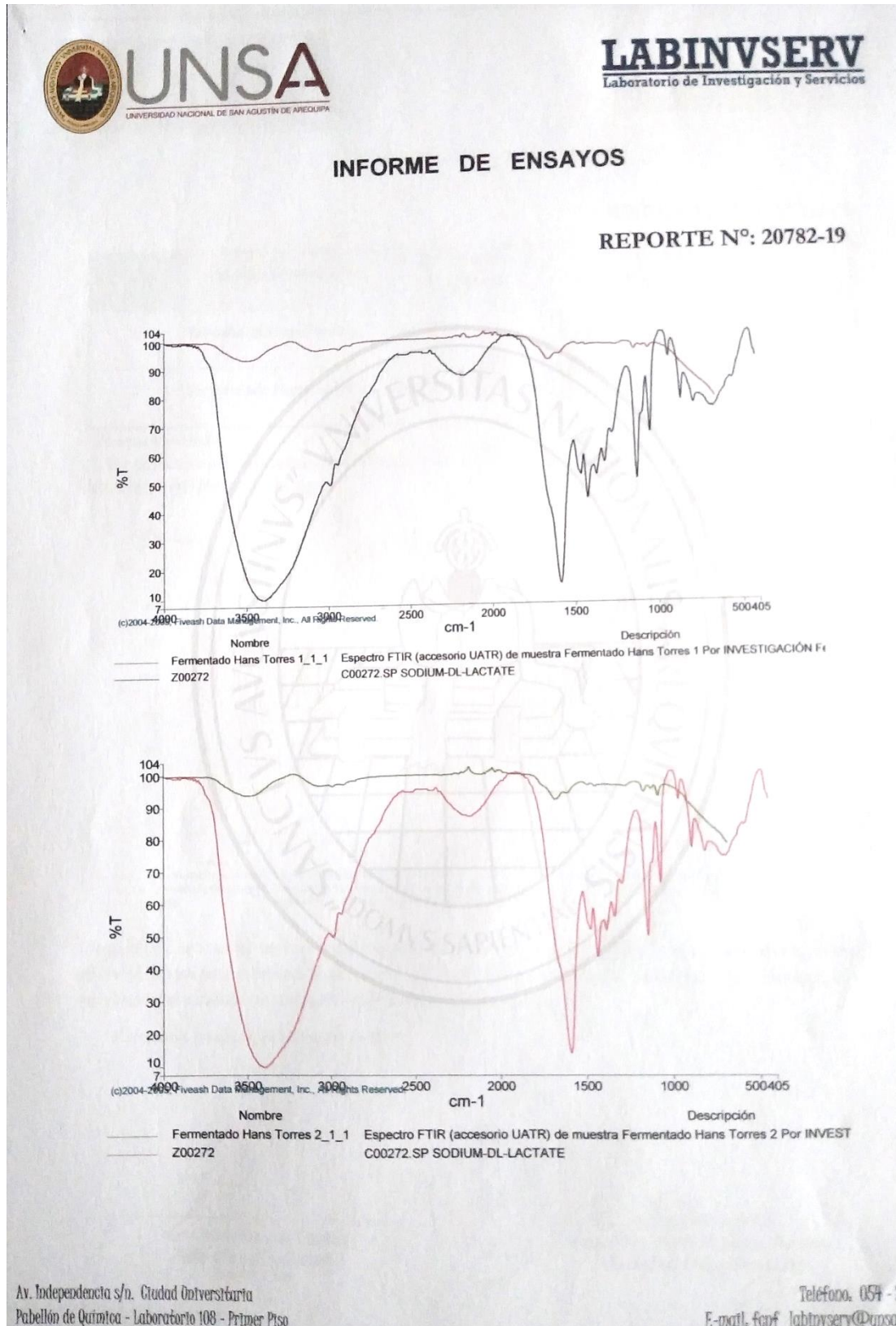


Figura N° 26: Espectro FTIR de la muestras de Ácido Láctico producidas por la cepa de *Lactobacillus casei* (Fermentado Hans Torres 1) y la cepa *Staphylococcus aureus* (Fermentado Hans Torres 2).



UNSA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA

LABINVSERV
Laboratorio de Investigación y Servicios

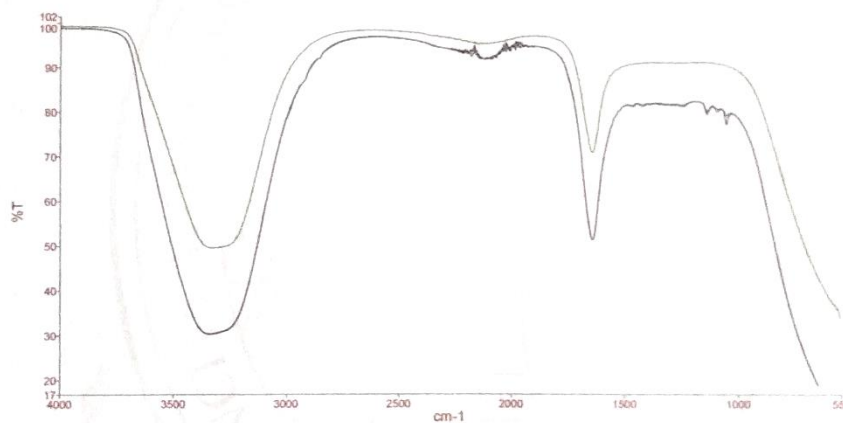
INFORME DE ENSAYOS

REPORTE N°: 20782-19

Índice	Nombre de la muestra	Mejor coincidencia de búsqueda	Descripción de la mejor coincidencia de búsqueda	HQI
1	Fermentado Hans Torres 1	Z00272	C00272.SP SODIUM-DL-LACTATE	0.802019
2	Fermentado Hans Torres 2	Z00272	C00272.SP SODIUM-DL-LACTATE	0.738536

Observaciones:

A los espectros identificados como Fermentado Hans Torres 1 y Fermentado Hans Torres 2, se les restó espectralmente el agua.



Nombre Descripción
 Fermentado Hans Torres 1 Espectro FTIR (accesorio UATR) de muestra Fermentado Hans Torres 1 Por INVESTIGACIÓN Fecha viernes, marzo 29 2019
 Fermentado Hans Torres 2 Espectro FTIR (accesorio UATR) de muestra Fermentado Hans Torres 2 Por INVESTIGACIÓN Fecha viernes, marzo 29 2019
 agua Muestra 004 Por PEServicio Fecha viernes, noviembre 23 2018

Después de la resta se realizó una búsqueda en la base de datos FDM (Fiveash Data Management), encontrándose una correlación de 0.80 y 0.73 con el lactato de sodio (la sal de ácido láctico), la sal producida naturalmente mediante la fermentación de azúcares.

Emitido en Arequipa, el 04 de abril de 2019.

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348



Anal. Qm. Ruth Begazo Guillén.
Químico Responsable

Av. Independencia s/n. Ciudad Universitaria
Pabellón de Química - Laboratorio 108 - Primer Piso

Teléfono: 054 - 220360
E-mail: fcnf_labinvserv@unsa.edu.pe

Figura N° 27: Espectro FTIR de la muestra de Ácido Láctico y la resta espectral de agua.

3.7. Polimerización de Ácido Láctico (AL) a Ácido Poliláctico (PLA)

3.7.1 Esterificación

Fue un total 9 horas de experimentación, mediante la investigación se infirió que el material formado era Lactida; producto de una deshidratación, en lugar de una esterificación ^[32,39].

Dicho material mostró ser extremadamente espeso e insoluble en agua, pero si soluble en compuestos orgánicos, también tenía un olor muy dulce semejante al café ^[49]. El solvente que se utilizó fue el ácido acético.

En la Figura N° 28 se observa un balón con Ácido Láctico mezclado con ácido acético en agitación constante y a una temperatura de 140°C.

Después del tiempo de 7 horas y 30 minutos con agitación magnética constante y a una temperatura de 140°C, la mezcla se tornó de color cajeta o marrón la cual se denomina Lactida como se observa en la Figura N° 29 ^[50].



Figura N° 28: Proceso de Esterificación



Figura N° 29: Matraz que contiene Lactida de coloración caramelo oscuro

La despolimerización y/o esterificación permite aumentar la temperatura de policondensación, disminuir la presión y la destilación de la Lactida producida. La ventaja de la polimerización por el método “ROP” es que la reacción se puede controlar más fácilmente, variando así las características del polímero resultante de una manera más controlada [51,52].

Se decidió probar el método ROP, para hacer pruebas de obtención de sólidos.

3.7.2 Método de Ruptura del Anillo Polimérico (ROP: *ring opening polymerization*)

Se realizó poli-condensación del Ácido Láctico seguido de una despolimerización según Moon [52]; a fin de obtener el dímero cíclico deseado, “La Lactida”. Recuperando 4.34 g del sólido blanco mediante filtros [25].

Polímeros de alto peso molecular pueden ser obtenidos tras la apertura del anillo según Serna [51]. La polimerización puede tener lugar en los puntos de insaturación de las cadenas de los ácidos grasos (o en la unión del ácido graso y la molécula de glicerol) [53, 54, 55, 60].

Luego de la obtención de la Lactida, se procedió a la utilización de los químicos, para desarrollar el método ROP ^[22,24,28,61]. Se realiza la agitación termo magnético, después de retirar la fase líquida se obtuvo una pasta depositada en la base del matraz, que se presume que es Ácido Poliláctico (PLA) ^[63,64] como se observa en la Figura N° 30.

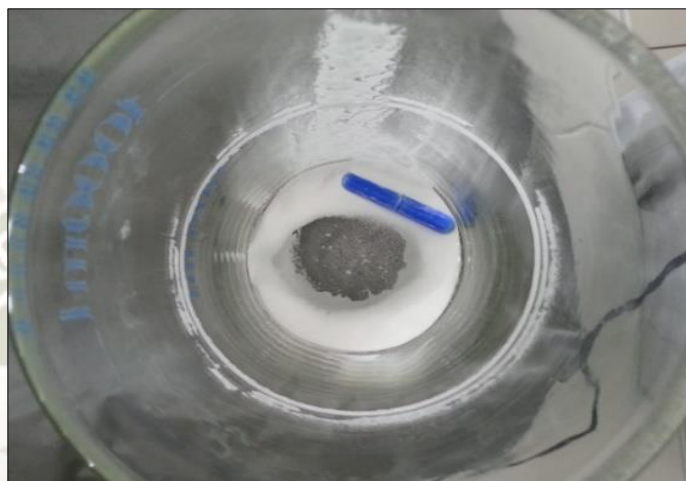


Figura N° 30: Observamos obtención del sedimento blanquecino.

Los sedimentos de Ácido Poliláctico (PLA) fueron colocados en una pequeña placa Petri para ser pesada, dando como resultado partículas de masa blanquecina con aspecto pastoso ^[29,30].

Para ello se llevó a cabo un análisis de determinación de espectrofotometría infrarroja (FT-IR); para comprobar la presencia de Ácido Poliláctico (PLA).

3.8 CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO POLILACTICO (PLA)

3.8.1. Análisis De Determinación Espectrofotometría Infrarroja (FT-IR)

Según Valero ^[55] recomienda el uso de espectros infrarrojos; los cuales fueron llevados a cabo con un espectrofotómetro FT-IR marca SHIMADZU de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la facultad de Química e Ingeniería Química, de la Unidad de Servicios de Análisis Químicos “USAQ”. Las muestras semilíquidas fueron preparadas en forma de película sobre ventanas de yoduro de cesio ^[24,54].

Se observa que el espectro de la muestra presenta los picos (cm^{-1}). El pico que se presenta en 1751 cm^{-1} indica la presencia del grupo C=O. Otro pequeño pico en 3000 cm^{-1} es debido al grupo C-H y entre 1000 y 1200 cm^{-1} se encuentra otro pico sobresaliente que indica la presencia de un enlace C-C en el polímero ^[55,56,57], como se detalla en la Figura N° 32.

En la Figura N° 33 se aprecia la comparación del Espectro de la muestra enviada del presunto Ácido Poliláctico con el código (316-01) contrastando con el espectro de Ácido Poliláctico de la base de datos de la biblioteca espectral con código (MP1297, *POLILACTIC ACID*, 596-82-3).

El espectro de la muestra es similar al espectro de “*POLYLACTIC ACID*” en un 93.10% de probabilidad según la biblioteca espectral del Laboratorio de Servicios de Análisis Químicos “USAQ”, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ^[60,61,63]. Como se reporta en el Informe de Ensayo N°393-2016, dicho ensayo se aprecia en la Figura N° 31.



INFORME DE ENSAYO
N° 393-2016

Cliente : HANS TORRES CARDENAS
 Dirección : Coop. 19 – C-13 a. Paucarpata - Arequipa
 Referencia USAQ : 316-01
 Cotización : 436-2016/USAQ-FQIQ
 Muestra : POLIMERO PLA
 Fecha de Recepción : 15/11/2016
 Fecha de Emisión : 21/11/2016

RESULTADO DE ANALISIS DETERMINACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

Código de Muestra USAQ	Referencia y Código del Cliente	Observaciones
316-01	POLIMERO P L A	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm ⁻¹) 948.98 991.41 1157.29 1454.33 1647.21 1728.22 1990.54 2113.98 2330.01 2353.16 3379.29 El espectro de la muestra es similar al espectro de POLYLACTIC ACID en 93.10 % de probabilidad según la biblioteca espectral <ul style="list-style-type: none"> 1297 NICODOM IR Polymers

Muestra Proporcionada por el Cliente.

Métodos: DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POR FT-IR USAQ-ME 10



Quím. María Angélica Rodríguez Best
 Directora de la USAQ
 GOP: 597

Figura N° 31: Resultados del FT-IR para la Muestra de Ácido Poliláctico (PLA)

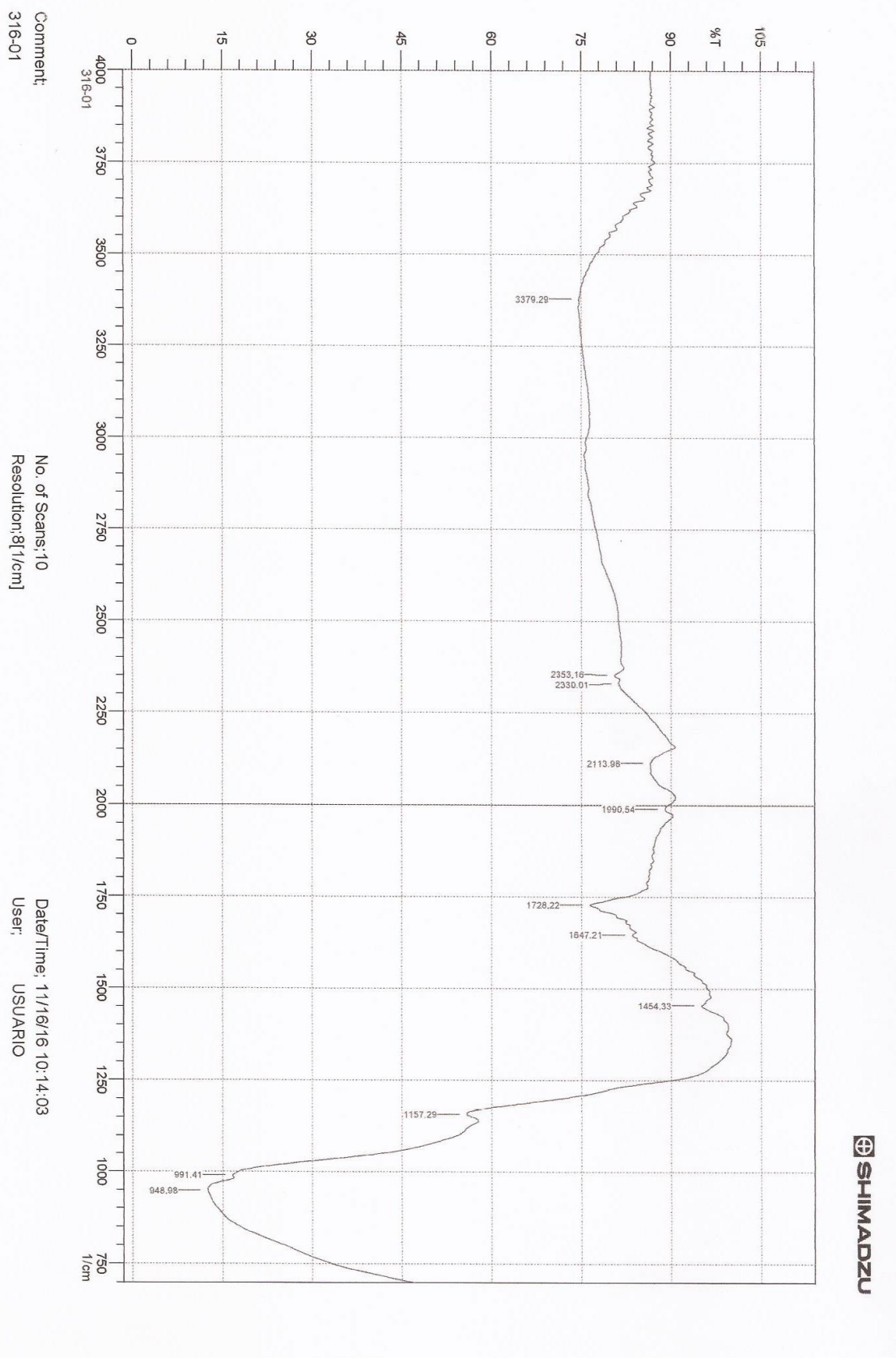


Figura N° 32: Picos del espectro del FT-IR para muestra de Ácido Poliláctico.

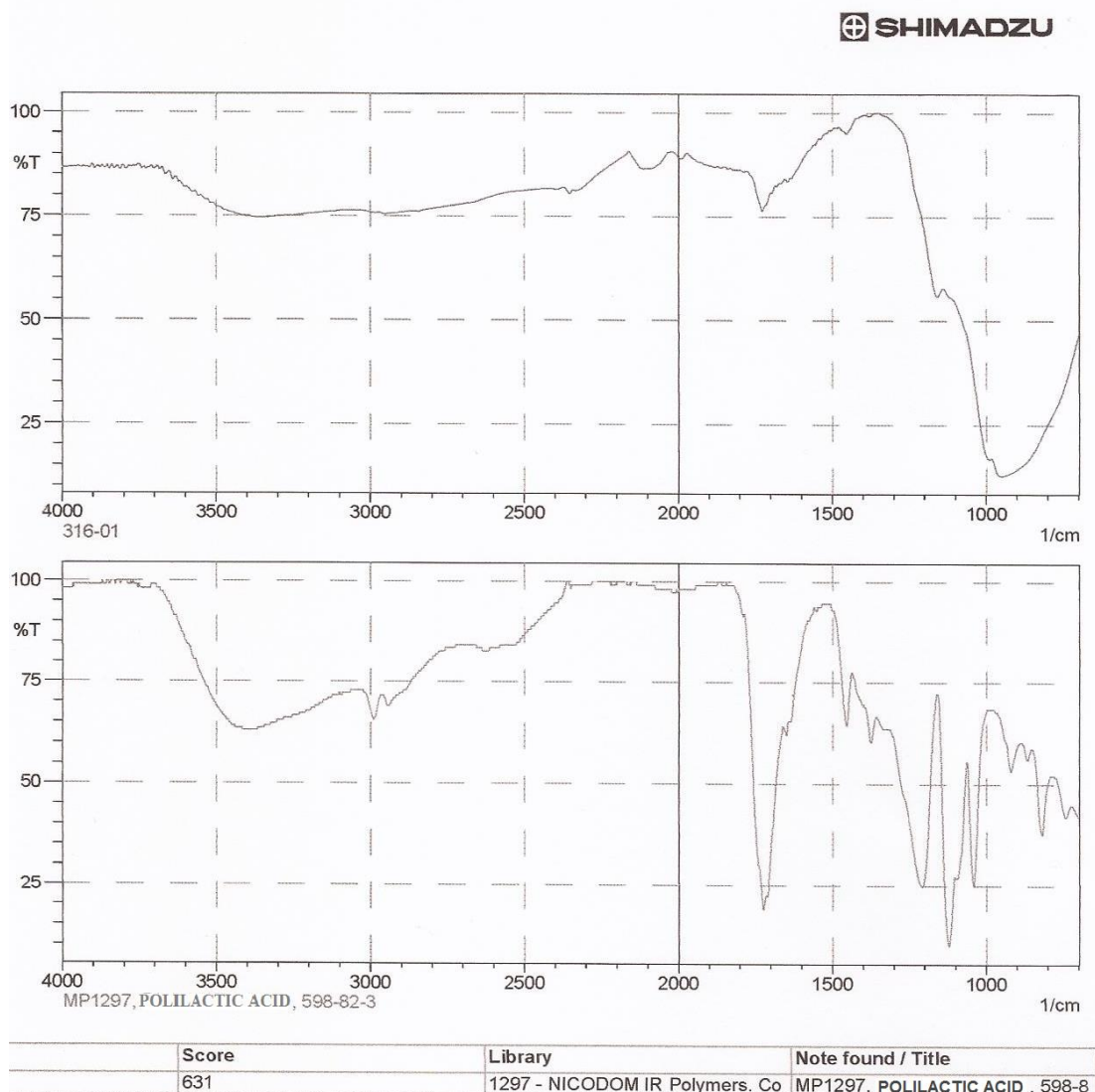


Figura N° 33: Comparación de espectros de la biblioteca espectral de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos FT-IR.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo Ácido Poliláctico (PLA), usando como precursor Ácido Láctico de origen biológico, mediante la fermentación de lacto-suero con el uso de cepas nativas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* en un Biorreactor PFTR.
2. Se aislaron, caracterizaron e identificaron las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*, usando pruebas bioquímicas API dando como resultado los códigos “6706113” que corresponde a la cepa de *Staphylococcus aureus* y “4400012” que corresponde a la cepa de *Lactobacillus casei*, según el software APIWEB, logrando así la identificación de las cepas deseadas a menor tiempo y teniendo mayor precisión en los resultados.
3. Se diseñó y construyó un reactor Biológico PFTR (Reactor de Tubo con Flujo Pistón), para la producción de Ácido Láctico (AL), mediante el uso de cepas fermentadoras de lacto-suero, la construcción fue en acero inoxidable con unas medidas de 200 cm de largo y un diámetro de 3.5 cm obteniendo un volumen interno efectivo de 353.23 cm³ que se basó en diseños previos en 2D y 3D.
4. La comparación de las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*, dio como resultado datos muy similares entre sí. El que tuvo mejor crecimiento fue la cepa de *Staphylococcus aureus*, con un conteo celular en cámara de Neubauer de 28.000 Cel/mm³ a diferencia de la cepa de *Lactobacillus casei*, que fue de 16.000 Cel/mm³, el que produjo mayor acidez fue la cepa de *Lactobacillus casei* con un pH de 3.0 y una pureza del 5.19 g/L, a diferencia del *Staphylococcus aureus* con un pH

de 4.7 y una pureza del 7.75 g/L. La caracterización mediante el análisis FTIR de la Universidad Nacional de San Agustín dio como resultado una similitud del 80% para la muestra fermentada por *Lactobacillus casei* contrastado con Lactato de Sodio o sal de Ácido Láctico y para la muestra fermentada por *Staphylococcus aureus* el cual tiene una similitud del 73% comparado con Lactato de Sodio o sal de Ácido Láctico.

5. Se polimerizó el Ácido Láctico (AL) mediante el uso de los métodos de esterificación y ROP convirtiéndola en Ácido Poliláctico (PLA), llegando a obtener una apariencia de sustancia viscosa y pastosa blanquecina.
6. La caracterización y el análisis FTIR para el Ácido Poliláctico (PLA) que fue obtenido por la bio-transformación del Ácido Láctico mediante el uso de cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*, indistintamente en un Biorreactor PFTR; dio como resultado la presencia de un 93.10% de Ácido Poliláctico (PLA), según la biblioteca espectral de la Universidad Nacional de San Marcos.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar otras cepas fermentadoras de lacto-suero, distintas a las que se usó en este proyecto de tesis, para ampliar el conocimiento de otros hongos o bacterias, aprovechando otros medios de cultivos y sustratos de acuerdo a la localidad.
2. Realizar una caracterización molecular para la identificación de la cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus.*, para poder identificar con mayor especificidad el género e incluso la especie a la que pertenece, eliminando la dependencia de las pruebas bioquímicas, macroscópicas y microscópicas.
3. Optimizar el Bio-reactor PFTR, implementando sistemas de controles automáticos, logrando reducir el empleo de más operarios, tener mejor control del proceso y así, evitar errores humanos en el futuro.
4. Efectuar otros posibles usos de biopolímeros, a base de suero de leche, tales como: Implantes mamarios, rellenos faciales (Botox), plásticos de alta calidad para el uso de implantes ortopédicos, que pueden resultar con mejor adaptabilidad al organismo humano, previniendo la xenobiosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Mejía L. Diagnóstico de la cadena productiva petroquímica plásticos y fibras sintéticas [Tesis Pregrado]. Bucaramanga, Colombia: UIS, 80 p; 2011.
- [2] Grados R., Álvarez MT., Gimenez A., & Mattiasson B. Degradación anaeróbica de desecho agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxicanoatos. *Biofarbo*, 2008; 16, 28-35.
- [3] Arcos M. Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxicanoatos mediante Un Biorreactor discontinuo. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México. México; 2009.
- [4] Castillo D. Efecto Del gen *fadH1* en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas Putida*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Sao Paulo, Brasil: 2008.
- [5] Khanna S., & Srivastava, A.K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 2005; 40, 2173-2182.
- [6] López J., Morgan J., & Noyola A. Arranque de reactores anaerobios industriales dos casos de estudio. Obtenido de <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/mexicon/R-0059.pdf>. México. 2000.
- [7] Gross R. & Kalra, B. Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297 (5582), 2002; pp. 803-807.

- [8] López L., Hernández M., Colín, C., Ortega S., González C., & Franco, R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad, 2014; 3 (1): 10- 8.
- [9] Arroyo G. Biotecnología: ¿Una salida para la crisis agroalimentaria? pág. 9; 1996.
- [10] Magallanes A. et al. viabilidad de lactobacillus casei ssp casei ATCC 393 cultivado en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo; 2012.
- [11] Willis J. Mannose-binding Lectin-deficient Mice Are Susceptible to Infection with Staphylococcus aureus; 1998.
- [12] Martínez J. Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. Revisión bibliográfica; 2016.
- [13] Pacheco J., & Magaña A. Arranque de un reactor anaerobio. Ingenierías. 2003; 7(1): 21-5.
- [14] Wiegant W. Granulation of biomass in thermophilic up flow anaerobic sludge blanket reactors treating acidified wastewaters. Biotechnol Bioengineer. 1986 May; 28 (5): 718-27.
- [15] Tay J., & Yan Y. Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of up flow anaerobic sludge blanket reactors. Water Environment Research. 1996 November; 68 (7): 1140-50.
- [16] Gaona J. Evaluación de la capacidad de producción de ácido fumárico utilizando una cepa nativa de Rhizopus sp. en biorreactores tip batch,

- turbidostato, SSF y PFTR. [Tesis Pregrado]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2013.
- [17] Portilla L., Londoño W., Francos Y., López A. Objeto Tecnológico. Proyecto del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), Química aplicada a la industria. Santiago de Cali; 2011.
- [18] Aguayo R., Contreras M., Hernández B., & Vázquez D. Gelificación de Alginatos Centro Universitario Anglo Mexicano de Morelos, S. C.
- [19] Reddy M.M., Vivekanandhan S., Misra, M., Bhatia S.K., & Mohanty A. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities, Progress in Polymer Science; 2013.
- [20] Desai S., Thakore I., Sarawade B., & Devi, S. Structure-property relationship in polyurethane elastomers containing starch as a cross linker, Polymer Engineering & Science, 2000; 40 (5), pp. 1200-1210.
- [21] Hoffman A. Synthetic polymeric biomaterials. In: Gebelein GC, editor. Polymeric Materials and Organs. Washington DC: American Chemical Society, 1984: 13-29, 2001.
- [22] Bastioli C. Biodegradable material for various applications. Biopolymers: General Aspects and Special Applications, Steinbuchel, Alexa, 10; 2010.
- [23] Villada H.S., & Acosta, H.A. Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables, Temas Agrarios, 2007; 12 (2), pp. 5-13.
- [24] Moreno N. Comportamiento mucoadhesivo de biopolímeros farmacéuticos en contacto con mucinas [MSc.]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Dyna, 2013; 181-179.

- [25] Machuca F. Estudio del proceso de electrodeposición de emulsiones poliméricas caso de estudio (Estireno-Butadieno). Trabajo de maestría, Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, 1997.
- [26] Lucas N., Bienaime C., & Belloy C. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review, *Chemosphere*, 2008; 73 (4), pp. 429-442.
- [27] Sánchez A. Caracterización Físicoquímica de Polímeros. Limusa Noriega Editores. México, 1994.
- [28] Hayashi T. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Prog. Polym. sci*, 1994; 663-702.
- [29] Gallardo E., San Román J., López A. Polímeros biodegradables en medicina: diseño estructural y desarrollo de materiales. *Revista de Plásticos Modernos*, 1999; 77:511.
- [30] Montero de Espinosa L., & Meier A.R. Plant oils: The perfect renewable resource for polymer science, *European Polymer Journal*, 2011; 47 (5), pp. 837-852.
- [31] Müller R.J. Biodegradability of polymers: Regulations and methods for testing, *Biopolymers Online*, DOI: 10.1002/3527600035.bpola012: 2005.
- [32] Valdivia F. Bioprecipitación De Metales Pesados Utilizando Bacterias Reductoras De Sulfato (Brs) Para Su Aplicación En un Biorreactor Sulfidogénico. [Tesis Pregrado]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2017.

- [33] Escobar L., Rojas C., Giraldo G., Panilla L. Papper evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción Ácido Láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno; 2010.
- [34] Leon D., Calderon B., Martinez A. Papper formulación and optimization of an economy broth culture for *Lactobacillus* with probiotic potential isolated from pulque; 2013.
- [35] Dolla A., Fournier M., Dermoun Z. Oxigen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology*. 2006; 126: 87-100.
- [36] Mercedes J. Guía de Practica de Microbiología I y II. Universidad Católica de Santa María. Perú; 2010.
- [37] Serna L., Rodríguez A. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants; 2013.
- [38] Cypionka H., Widdel F., Pfennig N. Survival of sulfater-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol. Ecol*, 1985; 31, 39-45.
- [39] Stams A.J.M., Hansen T.A. Oxygen-labile l(+) lactate dehydrogenase activity in *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEMS Microbiol. Lett*, 1982; 13, 389-394.
- [40] Suzuki D., Ueki A., Amishi A., Ueki, K. Diversity of substrate utilization ang growth characteristics of sulphate-reducing bacteria isolated from estuarine sediment in in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 2007; 53: 119-132.

- [41] Koneman A., Dowell J., Sommers W. Diagnostico microbiológico. 1988; 190-260.
- [42] Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice May. Madrid, 1999; 505-510.
- [43] Chalela G. Informe Final II: Estudio fisiológico, caracterización y actividad metabólica de las Bacterias encontradas en los sistemas de inyección de agua. Universidad Industrial de Santander; 1991.
- [44] Cypionka H. Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description at *Staphylococcus aureus*. *Nov. System Appl Microbiol*, 2004; 27: 541-548.
- [45] Chávez P. Depuración Biológica de Efluentes de Fábricas Productoras de Colágeno Hidrolizado a Través de Biopelículas Bacterianas Utilizando Un Biorreactor Anaerobio Tipo Rfa. [Tesis Pregrado]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2013.
- [46] Kenealy W., Zaady E., Du Preez, J., Stieglitz, B., Goldberg, I. Biochemical Aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*; 1986.
- [47] Gu C., Zhou Y., Liu L., Tan T., Deng L. Production of Lactic acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net; 2013.
- [48] Seghezzi L. Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions. 2004; (90-8504-029-9).
- [49] Barton LL. Sulfate-Reducing Bacteria. En: *Biotechnology Handbooks* (Atkinson T, Sherwood RF. eds.) Plenum Press. New York- London. 8; 1995.

- [50] Camargo R. Estudio de la Electropolimerización de ácido láctico; Trabajo de Postgrado, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander; Bucaramanga, 1999.
- [51] Serna L., Rodríguez A., Albán F. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. Revista Ingeniería y competitividad. Universidad del Valle. Volumen 5 - No. 1. 2003.
- [52] Moon S., Lee I., Miyamoto M., Kimura Y. Melt/solid polycondensation of L-lactic acid: an alternative route to poly (L-lactic acid) with high molecular weight. Polymer, 2001; 42: 5059-5062.
- [53] Valero M.F. Nuevos materiales poliméricos, a partir de aceite de higuera modificado, estireno y almidón de yuca [PhD]. Bucaramanga, Colombia: UIS, 158 p; 2009.
- [54] Sperling L., & Mishra V. The current status of interpenetrating polymer networks, Polym Adv Technol., 1996; 7 (4), pp. 197-208.
- [55] Valero M.F., Pulido J.E., Ramírez Á., & Cheng, Z. Determinación de la densidad de entrecruzamiento de poliuretanos, Polímeros: Ciencia e Tecnología, 2009; 19 (1), pp. 14-21.
- [56] Valero M.F., Pulido J.E., Ramirez, Á. & Cheng, Z. IPNs of polyurethane from Pentaerythritol-Modified castor oil and polystyrene: J. Am Oil Chem Soc. 2009; 86 (4), pp. 383- 392.
- [57] Valero M.F., Pulido J.E., Hernández J.C., Posada J.A., Ramírez A. and Cheng, Z. (2009). Polyurethanes based on castor oil chemically modified with yucca starch glycoside, Journal of Elastomers and Plastics, 41 (3), pp. 223-244.

- [58] Alvarez M.T., Pozzo T., Mattiasson B. Enhancement of sulphide production in anaerobic packed bed benchscale biofilm reactors by sulphate reducing bacteria. *Biotechnology Letters*, 2006; 28 (3): 175-181.
- [59] Ciccone W., Motz C., Bentley J. Bioabsorbable Implants in Orthopaedics: New Developments and Clinical Applications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2001; 9:280-288.
- [60] Langer K. *Bioresorbable and bioerodible materials*. Biomaterials Science. New York: Academic Press, 1996; 64-72.
- [61] Navarro M. Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea. Memoria de tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias. Especialidad Ingeniería Química por la Universidad Politécnica de Catalunya. 2005.
- [62] Ratner B., Hoffman A., Schoen F., Lemons J. *Biomaterials Science*. 2003.
- [63] Beyenal H., Donovan C., Lewandowski Z., Harkin G. Three-dimensional biofilm structure quantification; 2004.
- [64] Betancur M. et al. Gestión de los Residuos Producidos en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana; 2000.
- [65] Boshoff G., Duncan J., Rose P.D. Tannery effluent as a carbon source for biological sulphate reduction. *Water Research*. 2004; 38 (11), 2651-2658.
- [66] Cammack R., Fernandez V.M., Hatchikian E.C. Nickel-iron hydrogenase. *Methods Enzymol*. 1994; 243, 43-68.

- [67] Çayli G., & Küseföglu, S. Biobased polyisocyanates from plant oil triglycerides: J Appl Polym Sci., 2008; 109 (5), pp. 2948-2955.
- [68] DNP. Agenda interna para la productividad y la competitividad. Documento sectorial. Cadena petroquímica, Agenda interna sectorial, 2007; pp. 1-59.
- [69] Guan-Xin, Chen., Hun-Sik, Kim., Eung-Soo, Kim., Jin-San, Yoon. Synthesis of high-molecularweight poly (L-lactic acid) through the direct condensation polymerization of L-lactic acid in bulk state. European Polymer journal. 2006; 42:468-472.
- [70] Hyon S., Jamshidi K., Ikada Y. Synthesis of polylactides with different molecular weights. Biomaterials, 1997; 18:1503-1508.
- [71] Vergara B., López M., & Pérez F. Una perspectiva de los polihidroxicanoatos bacterianos. Avance y Perspectiva, 2009; 4 (4), pp. 1-15.
- [72] Waldvogel FA. Staphylococcus aureus. Mandel, Douglas, Bennet Principles and Practice of Infectious diseases.. 2000. Ed WB Saunders.
- [73] Prieto J., & Gomez-Lus ML. Género Staphylococcus. Microbiología Médica. Pag 179-191. 1996. Ed Doyma.
- [74] Martínez C. Fundamentos y Técnicas de Análisis Microbiológicos. 2015.

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación del Medio Solido Rogosa

Tabla N° 10: Requerimientos para la preparación del medio Rogosa ^[36]

Componentes	g/L	100 mL
Peptona	10	1
Extracto de carne	8	0.8
Extracto de levadura	4	0.4
Glucosa	20	2
Twin 80	1	0.1
Fosfato dipotasico	2	0.2
Acetato de Sodio	5	0.5
Citrato de Amonio	2	0.2
Sulfato de magnesio	0.2	0.02
Cloruro de Sodio	2.50%	2.50%
Agar – Agar	13.5	1.35
Sulfato de manganeso	0.05	0.005

ANEXO 2

Preparación del Medio Solido Manitol Salado

Tabla N° 11: Requerimientos para la preparación del medio Manitol Salado ^[36]

Componentes	g/L	100 mL
Extracto de carne	1.0	0.1
Pluripeptona	10.0	1.0
d-Manitol	10.0	1.0
Cloruro de sodio	75.0	7.5
Agar	15.0	1.5
Rojo de fenol	0.025	0.0025
pH final: 7.4 ± 0.2		



Figura N° 34: Matraz izquierdo medio Manitol Salado de color Rojo Cereza y matraz derecho medio Rogosa de color Marrón

ANEXO 3

Pruebas Bioquímicas

Caracterización Microscópica con Tinción de Gram

Para realizar la tinción de Gram se realizó los siguientes pasos:

- Se extrajo una muestra de cada placa, recolectando las colonias en una lámina portaobjetos extendiéndola en forma circular.
- Se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se fijó las muestras con metanol, aproximadamente por un minuto flameándolo con el mechero.
- Se agregó cristal violeta esperando un minuto.
- Se enjuago con agua destilada.
- Se agregó lugol y se esperó 1 minuto.
- Se enjuago con agua destilada.
- Se agregó alcohol acetona y se esperó entre 15 a 20 segundos.
- Se enjuagó con agua destilada.
- Se agregó safranina como tinción de contraste, se esperó entre 30 segundos a 1 minutos.

- Se enjuaga con agua destilada.

Luego se observó mediante microscopio óptico usando el lente de 100x. Se describió en forma detallada las bacterias, teniendo en cuenta parámetros como: forma, color, tamaño.

Tabla N° 12: Preparación de la Tinción de Gram ^[37]

REACTIVO	TIEMPO
Cristal violeta	1 minuto
Lugol	1 minuto
Alcohol acetona	30 segundos
Safranina	30 segundos

Determinación de Motilidad

Se empleó el medio SIM, luego se sembró el inóculo por picadura y se incubó a 32°C por 8 días. Se observó el crecimiento en el tubo dentro y fuera de la línea de siembra ^[72].

Se observó en los tubos con medio SIM, que no hay presencia de motilidad de las cepas *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*. Si habría movimiento se debería a la presencia de flagelos, los cuales no existen en ningunas de las dos cepas ^[12,34,35].

Determinación de Indol

Se empleó el medio SIM y se sembró el inóculo por picadura y se incubó a 32 °C por 8 días. Posteriormente a cada tubo se le adicionó 10 gotas del reactivo de Kovac dejándolo resbalar por la pared interna del tubo.

La prueba se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p- imetilaminobenzaldehído

Componente principal del reactivo de KovÁcido

Después de la incubación de 8 días, se observó que la cepa de *Lactobacillus casei* dio como resultado indol negativo ^[12] a diferencia de

la cepa de *Staphylococcus aureus* que dio como resultado indol positivo [35].

Determinación de Catalasa

A partir de un medio sólido y empleando una asa en punta o de aro se tomó una colonia que fue depositada en una lámina portaobjeto y se adicionó una gota 3 % H₂O₂.

Se tomó 2 mL de cultivo fresco, se añadió 1 mL de tween 80 al 1% en un tubo de ensayo con tapa rosca, posteriormente se añadió 0.5 mL de Peróxido de hidrogeno y se cerró (la efervescencia indica la presencia de catalasa) [17].

Debido al efecto toxico del oxígeno, las bacterias fermentadoras han desarrollado estrategias de adaptación para protegerse del mismo. Estas estrategias pueden ser clasificadas en dos grupos: estrategias de comportamiento y estrategias moleculares según Cypionka [39].

Después de haber añadido las tres gotas de agua oxigenada (H₂O₂), se observó espuma en la muestra de *Staphylococcus aureus* dando como resultado catalasa positiva, en cambio la cepa de *Lactobacillus casei* no reaccionó con el reactivo dando como resultado catalasa negativa [12].

El estrés oxidativo es también una consecuencia de la inactivación directa por oxígeno molecular de algunas enzimas importantes como la hidrogenasa o lactato deshidrogenasa, según la investigación de Stams & Hansen [40], a su vez Dolla et al [36] reafirma la modificación de parámetros físico-químicos del ambiente como el potencial redox y pH.

Determinación de Oxidasa

Se colocó un trozo de papel filtro sobre una tapa de una placa Petri y se añadió 1 gota del reactivo oxidasa, sobre el reactivo se depositara una colonia y se observara si cambia de color en 10 segundos.

Después de haber esperado los 10 segundos no se observó la coloración purpura sobre las tirillas de papel filtro, luego de haber incubado la cepa.

Se observó que para la muestra de *Staphylococcus aureus* dio como resultado oxidasa negativa y para la cepa de *Lactobacillus casei* dio como resultado oxidasa negativa ^[41].

Esta prueba permite determinar si una bacteria presenta citocromoxidasa, enzima encontrada en algunas bacterias que transfieren electrones al oxígeno que actúa como aceptor final en algunas cadenas transportadoras. La enzima oxida el citocromo C, para realizar la transferencia de energía. La presencia de la citocromo oxidasa puede ser detectada a través del uso de una tirilla o un disco que contiene tetra metil-p-fenilendiamina (TMPD) o dimetil-p-fenilendiamina, los cuales actúan como donadores de electrones para la enzima. Si la bacteria oxida el reactivo que se encuentra en la tirilla o en el disco, es decir, si remueve los electrones, se tornara purpura indicando una prueba positiva ^[42]. Por el contrario, si no se presenta cambio en la coloración, la prueba se considera negativa, como en este caso.

Producción Sulfuro Hidrogeno (H₂S)

Se utilizó el medio triple azúcar hierro para observar la producción de ácido y la producción de H₂S.

El volumen del medio utilizado fue el necesario para permitir que una vez vertidos en los tubos se cree un taco y una cuña. La siembra se realizó con asa de platino introduciendo esta hasta el taco, y luego al salir se sigue sembrando en forma de zigzag en la superficie de la cuña. Luego se procedió a incubar a 37 °C durante un lapso de 24 horas ^[33].

En la prueba se empleó el medio SIM debido a que la fuente de azufre es el tiosulfato. Después de la siembra por picadura y de la incubación a 32

°C por 8 días se observó que tanto para la cepa de *Lactobacillus casei* como *Staphylococcus aureus* dio como resultado negativo [43].

Caracterización por API20

Tabla N° 13: Batería de pruebas bioquímicas para API20.

Pueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	Beta-Galactosidasa	Sin Color	Amarillo
ADH	Arginina Deshidrolasa	Amarillo	Rojo O Naranja
LDC	Lisina Descarboxilasa	Amarillo	Rojo O Naranja
ODC	Ornitina Descarboxilasa	Amarillo	Rojo O Naranja
CIT	Utilización Del Citrato	Verde	Azul Oscuro O Turquesa
H2S	Producción De H ₂ S	Sin Precipitado Negro	Precipitado Negro
URE	Ureasa	Amarillo	Rojo O Naranja
TDA	Triptófano Desaminasa	Amarillo	Marrón-Rojo
IND	Producción De Indol	Amarillo	Color Rosa O Anillo Rosa-Rojo
VP	Producción De Acetoína (Voges-Proskauer)	Sin Color	Rosa-Rojo
GEL	Gelatinasa	Sin Difusión	Difusión De Pigmento
GLU	Fermentación/Oxidación De Glucosa	Azul O Verde	Amarillo
MAN	Fermentación/Oxidación De Manitol	Azul O Verde	Amarillo
INO	Fermentación/Oxidación De Inositol	Azul O Verde	Amarillo
SOR	Fermentación/Oxidación De Sorbitol	Azul O Verde	Amarillo
RHA	Fermentación/Oxidación De Ramnosa	Azul O Verde	Amarillo
SAC	Fermentación/Oxidación De Sacarosa	Azul O Verde	Amarillo
MEL	Fermentación/Oxidación De Melobiosa	Azul O Verde	Amarillo
AMY	Fermentación/Oxidación De Amigdalina	Azul O Verde	Amarillo
ARA	Fermentación/Oxidación De Arabinosa	Azul O Verde	Amarillo
OX	Citocromo Oxidasa		

Fuente: Aula Virtual de la Universidad de Salamanca

ANEXO 4

Determinación de Rango del Crecimiento a Diferentes Temperaturas.

Se tomó tubos de ensayo con tapa rosca cada uno contendrá 9 mL de medio líquido caldo Rogosa, se rotuló con la cepa y temperatura a evaluar. Cada cepa fue procesada por triplicado en cada uno de las temperaturas (30°C, 45°C y 60°C). A cada tubo se le inoculó 1 mL de cultivo bacteriano y se incubó a 32°C por un lapso de 48 horas, hasta que el medio se volvió turbio oscuro lo que indicó la presunción de un resultado positivo, caso contrario se consideró negativo, todo resultado fue corroborado mediante la observación al microscopio óptico ^[33].

Esta prueba permite evaluar el rango de temperatura en el cual crecen las bacterias productoras de Ácido Láctico. Ambas cepas crecieron a una temperatura de 30°C. Sin embargo, presentaron ligero crecimiento a 45°C. El crecimiento óptimo se logró a 32°C. Según los datos obtenidos, las bacterias productoras de Ácido Láctico aisladas son mesófilas, pues su rango de crecimiento se encuentra entre los 30°C y 45°C, es decir, requieren temperaturas medias para llevar a cabo sus reacciones metabólicas. Según estudios realizados en sistemas de inyección de agua de Chalela ^[43], la temperatura óptima para estas oscila aproximadamente entre 20°C y 40°C, lo cual coincide con los resultados de este trabajo. Ninguna cepa presentó crecimiento a 60°C ^[73].

ANEXO 5

Determinación de Rango de Crecimiento a diferentes Valores de pH.

Se empleó tubos de ensayo de tapa rosca cada uno contiene 9 mL de medio líquido caldo Rogosa y se inoculó 1 mL de las cepas. El pH del medio fue ajustado con soluciones 1M HCl y 1M NaOH a los diferentes valores a evaluar (4.5, 6.0, 8.0) cada cepa por triplicado. Se incubó a 32°C por un lapso de 48 horas, hasta que el medio se tornó turbio oscuro lo que indicó la presunción de un resultado positivo, caso contrario se consideró negativo,

todo resultado fue corroborado mediante la observación al microscopio óptico [33].

Las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* reportaron similitud en el crecimiento a partir de pH 6.0. El medio de cultivo con pH 8.0 ofreció las mejores condiciones para la cepa de *Staphylococcus aureus*, teniendo en conocimiento por fuentes bibliográficas [39] que la bacteria de *Staphylococcus aureus* tiene mayor afinidad a pH's neutros y a su vez tiene crecimiento a pH's ácidos, considerándolo como una bacteria ácido-tolerante.

Según los resultados obtenidos, las bacterias productoras de ácido láctico prefieren un pH ácido para llevar a cabo su crecimiento, es decir valores como (4.5; 5; 6; 6.5). Las cepas la de *Lactobacillus casei* tolera valores ácidos como el pH 4.5 a 6.0. El crecimiento óptimo fue obtenido en pH 6.2.

Resultados similares fueron reportados al evaluar cepas productoras de Ácido Láctico aisladas a partir de estómago de vacuno, las cuales crecieron a valores de pH entre 5.5 [39,45].

ANEXO 6

Conteo Directo de Células

Para el conteo de células se utilizó la cámara de Neubauer, micropipetas, *tips* y microscopio óptico. Luego se realizó los siguientes pasos:

- Se tomaron 10 μ L de la mezcla preparada con una micropipeta.
- Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, y se colocó en posición horizontal sobre la mesa.
- Se introdujo una punta desechable en el extremo de la micropipeta.
- Se ajustó la micropipeta para succionar 10 uL de líquido.
- Se introdujo la punta de la micropipeta en la muestra.
- Se pulso el pistón o embolo superior de la pipeta suavemente.
- Se sacó la punta de la pipeta de la muestra.

- Se colocó la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer.
- Se soltó el pistón suavemente mientras se supervisó que el líquido entre correctamente y de forma uniforme en la cámara.
- Una vez ya la cámara cargada se procedió a colocar en la bandeja del microscopio, para su conteo y posteriormente se realizó las curvas de crecimiento de cada cepa.

Conteo Directo de Células

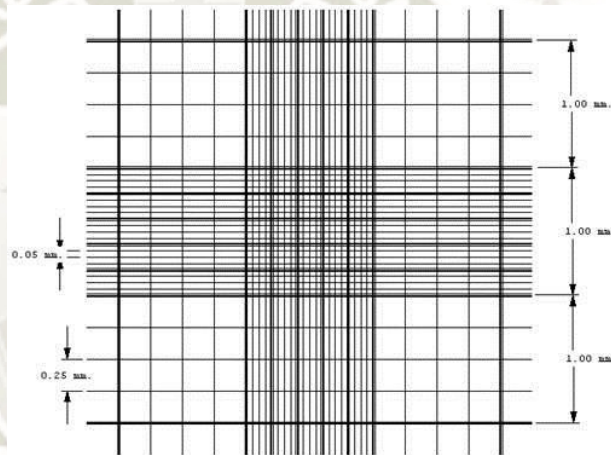


Figura N° 35: Cuadrantes de la cámara de Neubauer [36].

ANEXO 7

Tabla N° 14: Tabla de datos para la elaboración de curvas de crecimiento para la cepa de *Lactobacillus casei*

N° de Muestra	Día	Hora	Tiempo	Peso Vacío	Peso Lleno	Masa	Conteo Celular	Disolución	N° de Bacterias	Log (N° de Bacterias)
1	12-nov	20:00	1	0.9357	0.9493	0.0136	104	20	5200000	6.716
2	13-nov	08:00	12	0.9955	1.035	0.0395	123	20	6150000	6.7889
3	13-nov	20:00	24	0.9779	1.0233	0.0454	146	20	7300000	6.8633
4	14-nov	08:00	36	0.9261	0.9913	0.0652	165	20	8250000	6.9165
5	14-nov	20:00	48	0.9774	1.0671	0.0897	179	20	8950000	6.9518
6	15-nov	08:00	60	0.9445	1.0533	0.1088	202	20	10100000	7.0043
7	15-nov	20:00	72	0.926	1.0699	0.1439	236	20	11800000	7.0719
8	16-nov	08:00	84	0.9486	1.1359	0.1873	258	20	12900000	7.1106
9	16-nov	20:00	96	0.95	1.1426	0.1926	276	20	13800000	7.1399
10	17-nov	08:00	108	0.9533	1.1576	0.2043	293	20	12900000	7.1658
11	17-nov	20:00	120	0.9265	1.1476	0.2211	311	20	13800000	7.1917
12	18-nov	08:00	132	0.422	0.6553	0.2333	327	20	14650000	7.2135
13	18-nov	20:00	144	0.977	1.223	0.246	329	20	15550000	7.2162
14	19-nov	08:00	156	0.941	1.1988	0.2578	332	20	16350000	7.2201

15	19-nov	20:00	168	0.957	1.2146	0.2576	335	20	16600000	7.2240
16	20-nov	08:00	180	0.9695	1.2276	0.2581	336	20	16750000	7.2253
17	20-nov	20:00	192	0.9401	1.1979	0.2578	334	20	16800000	7.2227
18	21-nov	08:00	204	0.9834	1.2397	0.2563	330	20	16700000	7.2175
19	21-nov	20:00	216	0.9784	1.2323	0.2539	327	20	16350000	7.2135
20	22-nov	08:00	228	0.9432	1.1934	0.2502	325	20	16250000	7.2109
21	22-nov	20:00	240	0.9258	1.1767	0.2509	324	20	16200000	7.2095

ANEXO 8

Tabla N° 15: Tabla de datos para la elaboración de curvas de crecimiento para la cepa de *Staphylococcus aureus*

N° de Muestra	Día	Hora	Tiempo	Peso Vacío	Peso Lleno	Masa	Conteo Celular	Disolución	N° de Bacterias	Log (N° de Bacterias)
1	12-nov	20:00	1	0.9357	0.9593	0.0236	30	20	1500000	6.1761
2	13-nov	08:00	12	0.9955	1.0351	0.0396	96	20	4800000	6.6812
3	13-nov	20:00	24	0.9779	1.0233	0.0454	121	20	6050000	6.7818
4	14-nov	08:00	36	0.9261	0.9733	0.0472	151	20	7550000	6.8779
5	14-nov	20:00	48	0.9774	1.0771	0.0997	212	20	10600000	7.0253

6	15-nov	08:00	60	0.9445	1.0523	0.1078	226	20	11300000	7.0531
7	15-nov	20:00	72	0.926	1.0849	0.1589	256	20	12800000	7.1072
8	16-nov	08:00	84	0.9486	1.1475	0.1989	267	20	13350000	7.1255
9	16-nov	20:00	96	0.95	1.1996	0.2456	289	20	14450000	7.1599
10	17-nov	08:00	108	0.9533	1.2246	0.2713	301	20	15050000	7.1775
11	17-nov	20:00	120	0.9265	1.2676	0.3411	345	20	17250000	7.2368
12	18-nov	08:00	132	0.9422	1.2902	0.438	34	20	17000000	7.2304
13	18-nov	20:00	144	0.977	1.346	0.369	38	20	19000000	7.2788
14	19-nov	08:00	156	0.941	1.3388	0.3978	39	20	19500000	7.2900
15	19-nov	20:00	168	0.957	1.3837	0.4267	42	20	21000000	7.3222
16	20-nov	08:00	180	0.9695	1.424	0.4545	45	20	22500000	7.3522
17	20-nov	20:00	192	0.9401	1.4193	0.4792	47	20	23500000	7.3711
18	21-nov	08:00	204	0.9401	1.4266	0.4865	45	20	22500000	7.3522
19	21-nov	20:00	216	0.9834	1.4823	0.4989	50	20	25000000	7.3979
20	22-nov	08:00	228	0.9784	1.4813	0.5029	52	20	26000000	7.415
21	22-nov	20:00	240	0.9432	1.4556	0.5124	55	20	27500000	7.4393

ANEXO 9

Tabla N° 16: Composición para la preparación del caldo incubadora Rogosa

Reactivos	G/L	75mL
Peptona	10	0.75
Extracto de carne	8	0.6
Extracto de levadura	4	0.3
Lactosa	20	1.5
Sorbitán Monoleato	1mL	-
twin 80	1	0.075
Fosfato de potasio	2	0.15
Acetato de sodio	5	0.375
Citrato de amonio	2	0.15
Sulfato de magnesio	0.2	0.015
Sulfato de manganeso	0.05	0.00375
Cloruro de sodio	2.5	2.50%
pH Final:	6.5 [±] 0.2	

ANEXO 10

Preparación del Inóculo Semillero.

Con la fuente carbonada de un pH y temperatura adecuada se preparó en un matraz, 75mL de caldo incubadora MRS o Rogosa, como se demuestra en la Tabla N° 10.

El medio se centrifugó a 3000 RPM por 3 minutos. Pasado ese tiempo se retiraron los tubos de la centrifuga, luego se eliminó el sobrenadante, se agregó agua estéril y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones del tubo inicial. Esta acción se realiza 3 veces y finalmente se hace un último lavado con suero fisiológico el cual se llevó a centrifugar a 3000 RPM por 3 min.

Después del proceso de preparación del inóculo semillero y pasadas las 24 horas de incubación se obtuvo los matraces con caldo nutritivo Rogosa tanto para *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*, en donde se observa turbidez en ambos matraces ^[47].

En la siguiente Tabla N°11 muestra el resultado de la concentración mg/mL y la concentración por conteo en cámara de Neubauer.

Tabla N° 17: Muestra el resultado de la concentración del caldo semillero

BACTERIA	CONCENTRACIÓN DE PESO	CONTEO EN CAMARA NEUBAUER
<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	26.3 mg/MI	8 x 10 ⁷
<i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	23.5 mg/MI	5 X 10 ⁷

Para obtener los resultados de las poblaciones de las cepas sembradas indistintamente en caldos semilleros, se aplicó la **Ecuación (5)**.

ANEXO 11

Medio de Conservación

Para la conservación a corto plazo de las cepas de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*. Se utilizará el método de hibernación ya que existe una facilidad del uso de los equipos que puedan llegar a una temperatura de 4°C, lo cual permitió una conservación a corto plazo de la cepa por 8 días en caldo Rogosa ^[63,64].

Adicionalmente se tomó una alícuota para poder realizar un tratamiento en el cual se puedan conservar durante mucho más tiempo la cepa obtenida, se obtuvieron así, las cepas sin contaminantes y sin medio de cultivo, agregando glicerol al 10% para impedir la formación de cristales de agua que dañasen las estructuras celulares y al finalizar se colocaron a una temperatura de -4°C en un congelador.

El glicerol al 10% fue utilizado ya que ha sido demostrado que es uno de los componentes que preservan mejor las estructuras celulares ,según Restrepo *et al*, 2011 en un estudio donde se utilizaba glicerol junto con

dimetilformamida como criopreservadores en la rápida congelación de semen canino; el glicerol ya que es una sustancia no electrolítica y de bajo peso molecular preserva adecuadamente material biológico; adicionalmente, el glicerol al estar en una concentración del 10% con el restante de agua convierte a la solución en hipertónica, lo cual estimula a la célula a eliminar agua, al descender la temperatura el glicerol ingresa en la célula evitando daño celular por los cristales y cuando se desee descongelar la muestra, se deberá calentar lentamente a baño maría a 37°C, se lava las células con agua, esto incita al glicerol a salir de la célula y que el agua comience a ingresar de nuevo ^[65,66].

ANEXO 12

Preparación de Lacto-suero.

Se utilizó dos litros de leche fresca de la zona de Carmen Alto – Arequipa-Perú, se procedió a calentar a una temperatura de 45°C, por un tiempo aproximado de 18 minutos, se dejó enfriar hasta llegar a los 26°C, a continuación se añadió 20 mL de jugo de limón y 10 mL de vinagre de uva blanca a cada litro de leche ^[69].

Pasando 8 minutos de haber añadido el jugo de limón y el vinagre, se observó la separación de la fase sólida (Figura N°37).

Se procedió a retirar la parte solida flotante de mayor volumen con una cuchara y un colador, luego la parte solida de menor tamaño se filtró con gasa estéril.



Figura N° 36: Muestra de corte de leche

Para obtener una mejor separación de la fase sólida con la fase líquida (lacto-suero), se centrifugó en tubos Falcón las muestras a 5000 RPM por 5 minutos, luego se retiró el sobrenadante tal y como se aprecia en la Figura N°38.

Para obtener lacto-suero líquido (libre de partes solidas sobrenadantes), se procedió a filtrar con gasa estéril y bomba al vacío, no llegando a obtener el suero esperado. Para ello se utilizó una centrífuga a fin de poder separar y obtener solo lacto-suero.

Luego como un segundo método de conservación de cepas, se procedió a la adaptación de los microorganismos a lacto-suero; se adaptó inoculando con 10 mL de *Lactobacillus casei* activado en 500 mL de lacto-suero e incubando a 37°C durante 24 h, luego se procedió a la congelación de -5°C. El mismo procedimiento se repitió para la cepa de *Staphylococcus aureus*.

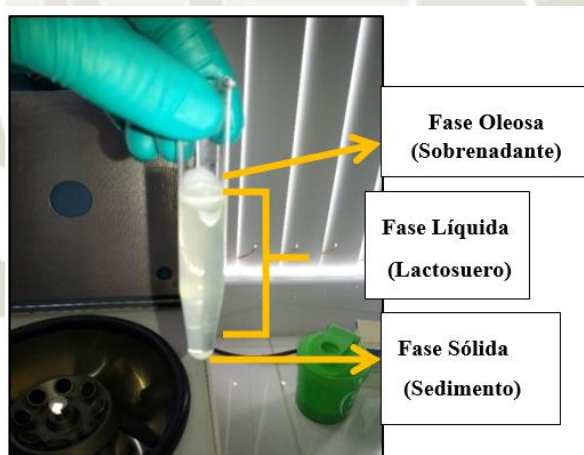


Figura N° 37: Lacto-suero con tres fases, oleosa, líquida y sólida

Determinación de Grados Brix del Lacto-suero

Para determinar el Potencial Fermentativo, se utilizó un refractómetro y así poder hallar los grados Brix (°Bx) presente en el material de fermentación, que vendría ser el lacto-suero.

El Brix es una medida comúnmente usada en la determinación de la concentración de azúcar en la leche. Por ejemplo una solución de 25 °Bx

contiene 25 g de azúcar (sacarosa) por 100 g de líquido. La medición del Lacto-suero previamente filtrado, centrifugado y a una temperatura de 12 °C fue de 10 °Bx, esto quiere decir que el lacto-suero utilizado como precursor de Ácido Láctico contiene 10 g de sacarosa por 100 g de disolución total.

ANEXO 13

Comparación de las Cepas *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* en su Capacidad de Acidificación.

Se observa la tendencia de fermentación reflejada en la acidez (pH), las variaciones resultantes del pH y el cambio de concentración de sustrato a lo largo del tiempo. Existe una relación directa entre la acidificación del medio con respecto a la disminución de concentración de sustrato. Tras 20 horas de iniciado el experimento, el suministro de la fuente de carbono se ha visto agotado. En dicho momento, la tendencia de producción de Ácido Láctico se estabilizo para ambas cepas. En donde se observa un rango de disminución de pH lento ^[12,34].

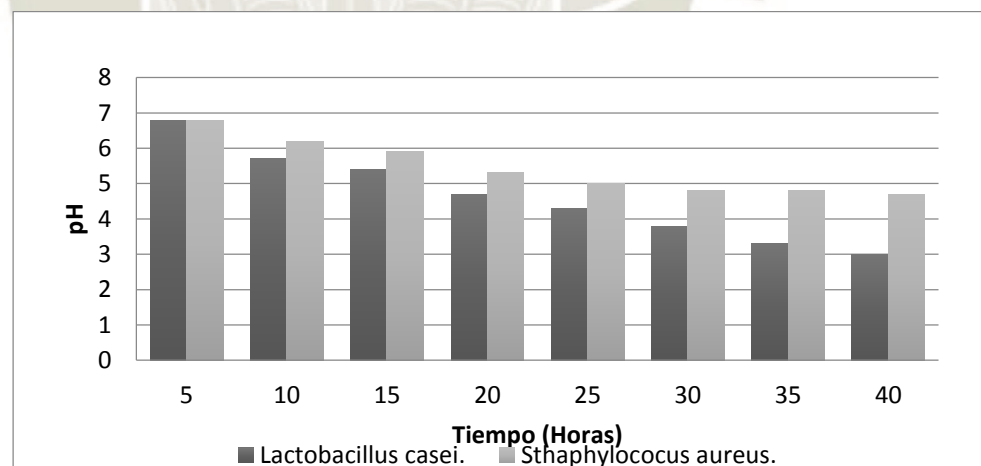


Figura N° 38: Comparación de la producción de Ácido Láctico entre las dos cepas.

En la literatura se ha reportado producción de Ácido Láctico de pH 2.9 para la cepa de *Lactobacillus casei* y para la cepa de *Staphylococcus aureus* fue un pH de 4.0; fuente basada por D. Leon ^[34], quienes utilizaron

suero desproteizado y enriquecido, usando una mezcla de cepas de *L.casei* y *Staphylococcus aureus* en la Universidad de Zulia – Venezuela.

ANEXO 14

Método de Ruptura del Anillo Polimérico (ROP)



Figura N° 39: Realización del método ROP en laboratorios fisicoquímica de la empresa de SEDAPAR



Figura N° 40: Mezcla de Lactida más alcohol metílico en agitación magnética.



Figura N° 41: A la izquierda formación de la coloración Cajeta con aroma acaramelada y a la derecha mezcla de *Lactida* + Alcohol Metílico + Cloruro de Estaño II.

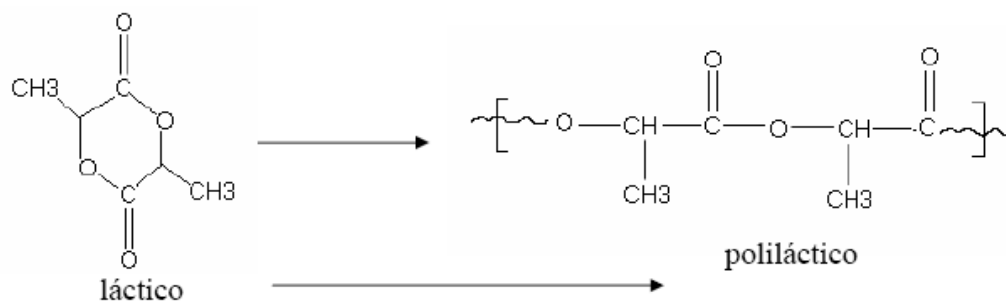


Figura N° 42: Síntesis del Ácido Poliláctico (PLA)
Fuente: Camargo, “Estudio de Electropolimerización”; 1999 [50].

ANEXO 15

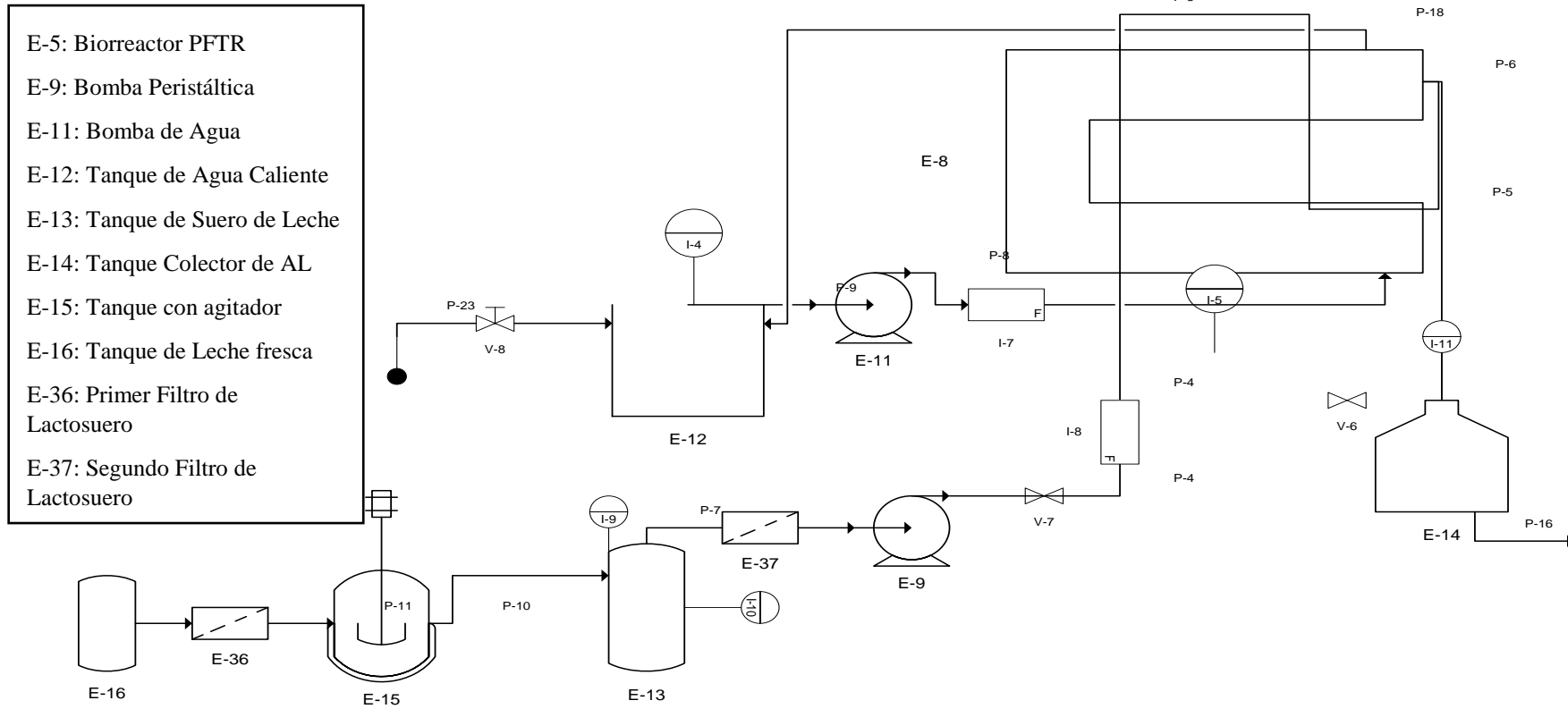


Figura N° 43: Diagrama de proceso de transformación de Ácido Láctico

