



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.**

POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS

**Producción de ácido láctico por medio de
fermentación anaerobia y su polimerización a partir de
reacciones de apertura de anillo**

Tesis que presenta

L.A.Q.B. Fátima Gimena Orozco Olivarez

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS
MATERIALES POLIMÉRICOS**

Mérida, Yucatán, Junio de 2011





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado

Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo

perteneciente al Programa de Maestría en Ciencias en Materiales Poliméricos del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección de la Dra. Liliana Ma. Alzate Gaviria y del Dr. Alex Valadez González.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Mérida, Yucatán, México; a 16 de Junio de 2011

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

FATIMA
OROZCO

Fátima Gimena Orozco Olivarez

A mis hermanos, Carito y Nicolás

A mis padres, Silvia y Rolando

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo con la beca 298166.

A la Dra. Liliana Álzate Gaviria.

Al M. C. Jorge Domínguez Maldonado.

Al Dr. Alex Valadez.

A la Q.I. María Verónica Moreno Chulim.

Al Dr. Felipe Barahona y a la Q.I. Tanit Toledano Thompson, así como al Dr. Luis Carlos Ordoñez López.

Al Dr. Manuel Aguilar Vega y al Dr. Manuel Cervantes Uc.

A los técnicos de la Unidad de Materiales: Q.I. Santiago Duarte Aranda, M. María Isabel Loría Bastarrachea, Q.I. Rossana Faride Vargas Coronado y M. Wilberth Antonio Herrera Kao.

A los integrantes del Depto. de Instrumentación: Ing. Leonardo Gus Peltovich, Ing. César Ortiz Clavel, Ing. Edgar Rubén Pech Cauich y Luis Samuel Flores Mena.

Al M. José Herminsul Mina, al Dr. Fabio Zuluaga y a los integrantes del grupo de Polímeros de la Universidad del Valle.

A la Dra. Marcela Zamudio de la UADY.

A mi amiga y compañera Alejandra Aimeé Gutiérrez y a Adrián Hernández.

A Lorena Esther Figueroa Oyosa

A mis compañeros de Materiales Poliméricos.

A mis compañeros del laboratorio de ER.

A mi familia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
CAPITULO 1	
ANTECEDENTES	6
<i>1.1 ÁCIDO LÁCTICO</i>	<i>7</i>
<i>1.2 FERMENTACIÓN LÁCTICA</i>	<i>10</i>
<i>1.2.1 Microorganismos empleados en el proceso</i>	<i>13</i>
<i>1.3 SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO</i>	<i>14</i>
<i>1.4 GENERALIDADES DEL ÁCIDO POLILÁCTICO</i>	<i>18</i>
<i>1.4.1 Influencia de la pureza óptica en las propiedades del ácido poliláctico</i>	<i>20</i>
<i>1.4.2 Influencia del peso molecular en las propiedades del ácido poliláctico</i>	<i>22</i>
<i>1.4.3 Comparación del ácido poliláctico con otros termoplásticos de uso común</i>	<i>23</i>

1.4.4 Métodos para obtener ácido poliláctico	25
1.5 SÍNTESIS DEL ÁCIDO POLILÁCTICO	25
1.5.1 Polimerización por condensación directa (PCD)	26
1.5.2 Uso de agentes acoplantes de cadena en oligómeros de bajo peso molecular	30
1.5.3 Polimerización por apertura de anillo	31
CAPÍTULO 2	
METODOLOGÍA	34
2.1 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	35
2.1.1 Microorganismos y reactivos	35
2.1.2 Reactivación de bacterias	36
2.1.3 Curva de crecimiento bacteriana	37
2.1.4 Condiciones de fermentación	37
2.1.5 Determinación de azúcares reductores y ácido láctico	39
2.1.6 Preservación de los microorganismos	40
2.2 SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	41
2.2.1 Microfiltración	41
2.2.2 Nanofiltración y Ósmosis Inversa	42
2.2.3 Determinación de concentración de ácido láctico	43
2.3 POLIMERIZACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO.	44
2.3.1 Reactivos	44

2.3.2 Oligomerización del ácido láctico	44
2.3.3 Formación de lacturo	45
2.3.4 Polimerización del lacturo	45
2.3.5 Caracterización del polímero	46
CAPÍTULO 3	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.1 ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO POR FERMENTACIÓN ANAEROBIA	48
3.1.1 Curva de crecimiento bacteriano	48
3.1.2 Consumo de lactosa y producción de ácido láctico	50
3.2 SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	54
3.3 POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO	57
3.3.1 Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier	59
3.3.2 Determinación del peso molecular M_v por viscosimetría capilar	61
3.3.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	63
3.3.4 Resonancia Magnética Nuclear (NMR) ^{13}C y ^1H	64
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFÍA	69

<i>ANEXOS</i>	74
<i>ANEXO A ESCALA DE Mc FARLAND</i>	75
<i>ANEXO B MÉTODO UV PARA DETERMINAR ÁCIDO D- Y L- LÁCTICO BOEHRINGER MANNHEIM/R-BIOPHARM</i>	76
<i>ANEXO C CELDA DE FLUJO CRUZADO PARA FILTRACIONES</i>	79

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Producción de ácido láctico y condiciones de fermentación para distintas BAL.....	14
Tabla 1.2. Producción Industrial de PLA año 2008.....	20
Tabla 1.3. Propiedades del PLA producido por Birmingham Polymers`.....	22
Tabla 1.4. Dependencia de algunas propiedades de PLA con el peso molecular.....	23
Tabla 1.5. Algunas propiedades mecánicas de polímeros de uso común.....	24
Tabla 2.1. Microorganismos utilizados para la fermentación láctica.....	35
Tabla 2.2. pH óptimo de fermentación láctica.....	38
Tabla 3.1. Producción de ácido D- y L- láctico por cepa bacteriana.....	53
Tabla 3.2. Concentración de ácido láctico a través de los procesos de filtración.....	57
Tabla 3.3. Bandas presentes en los espectros FTIR de PLA.....	60
Tabla 3.4. Valores de tiempo y viscosidad de las diluciones de PLA en cloroformo.....	61

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Ácido L(+) láctico a la izquierda y ácido D(-) láctico a la derecha.	8
Figura 1.2. Vista general de los procesos de obtención de ácido láctico; (a) síntesis química y (b) síntesis por fermentación	9
Figura 1.3. Metabolismo de lactosa, galactosa y glucosa en <i>Lactococcus lactis</i> : enzimas responsables de las rutas metabólicas principales.	12
Figura 1.4. Intervalos de presión para la operación de procesos con membrana: El espectro de filtración.....	17
Figura 1.5. Estructura general del PLA.....	18
Figura 1.6. Rutas de síntesis de PLA.	26
Figura 1.7. Reacción de policondensación del ácido láctico.	27
Figura 1.8. Mecanismo de reacción para el PLA.....	28
Figura 1.9. Síntesis de ácido láctico a partir de lacturo con catalizador de estaño.....	33
Figura 2.1. Cepas reactivadas en leche NIDO® y matraz con leche en polvo, extracto de levadura y peptona.....	36
Figura 2.2. BAL en caldo lactosado para las curvas de crecimiento.....	37
Figura 2.3. Fermentación con <i>L. lactis</i> en shaker a 150 rpm.....	38
Figura 2.4. Matraces de fermentación leche NIDO®	39
Figura 2.5. Preservación de colonias de BAL.....	40
Figura 2.6. Dispositivo de filtración de flujo cruzado.....	41
Figura 2.7. Sistema de filtración del proceso de separación.....	42
Figura 2.8. Membranas de nanofiltración y ósmosis inversa.....	42

Figura 2.9. Kit enzimático. A:ácido L-glutámico; B:NAD; C: glutamato-piruvato transaminasa; D: D-lactato deshidrogenasa; E: L-lactato deshidrogenasa.....	43
Figura 2.10. Purificación y oligomerización del ácido D,L-láctico.....	45
Figura 3.1. Curvas de crecimiento de las BAL.....	49
Figura 3.2. Consumo de lactosa y producción de ácido láctico de <i>L. bulgaricus</i> y <i>Lc. lactis</i>	51
Figura 3.3. Consumo de lactosa y producción de ácido láctico de <i>L. plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> y <i>L. lactis</i>	52
Figura 3.4. Matraz con fermentado de leche NIDO®; permeados de Microfiltración (a), Nanofiltración (b) y remanente de Ósmosis Inversa (c). .	55
Figura 3.5. Oligómero de ácido láctico.....	58
Figura 3.6. Cristales de D,L-lacturo.....	58
Figura 3.7. Ácido poli(D,L-láctico)	58
Figura 3.8 Espectros FTIR del ácido láctico obtenido por fermentación con <i>L. delbrueckii</i> y PLA sintetizado.....	60
Figura 3.9. Linealización de la viscosidad reducida e inherente para el PDLLA sintetizado, solvente: cloroformo a 25 °C.....	63
Figura 3.10. Curva de DSC de PDLLA sintetizado, calentado de 20 a 170 °C a 2°C/min.	64
Figura 3.11. Espectro ¹³ C-NMR de PDLLA.....	65
Figura 3.12. Espectro ¹ H-NMR de PDLLA.....	66

RESUMEN

La cantidad de residuos plásticos no biodegradables ha alcanzado límites máximos de contaminación y su reciclaje es cada vez más complicado, generar materiales biodegradables es importante para disminuir los desechos y la contaminación generada, puesto que al ser desechados en ambientes propicios los microorganismos presentes los descomponen en dióxido de carbono, agua, minerales y biomasa sin provocar impacto ambiental o ecotoxicidad¹.

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero biodegradable de amplia versatilidad, puede aplicarse tanto en productos de uso diario: platos, bolsas, etc., como en fármacos o implantes médicos, ya que no es tóxico al ser humano. Una de las ventajas de este polímero es que puede obtenerse a partir de residuos de industrias alimenticias, mediante la fermentación de estos desechos se obtiene el ácido láctico, monómero a partir del cual se sintetiza el PLA.

En el presente trabajo se produjo ácido láctico mediante la fermentación de leche NIDO[®] usando bacterias ácido lácticas con rendimientos de 0.99 g de ácido láctico/g de lactosa, concentrando el mismo hasta 81 g/L utilizando membranas de microfiltración, nanofiltración y ósmosis inversa; el ácido láctico recuperado se polimerizó mediante reacciones de apertura de anillo obteniendo PDLA con peso molecular viscoso, M_v , de 19,264.07 g/mol.

ABSTRACT

Non biodegradable plastic waste have reached maximum pollution levels and its recycling is becoming more difficult. In order to decrease the accumulation of solid plastic waste is important to generate biodegradable materials since they decompose to carbon dioxide, water, minerals and biomass by microorganisms in adequate conditions without environmental impact or ecotoxicity¹.

Poly(lactic acid) (PLA) is a biodegradable polymer with great versatility, it can be used in everyday products like plates, bags, etc., or in drug delivery systems and medical sutures and implants, due to its non-toxicity to the human being. An advantage is that its monomer, the lactic acid, is a natural product obtained by fermentation of food industry waste.

In this work lactic acid was produced from the fermentation of NIDO[®] milk with lactic acid bacteria yielding 0.99 g lactic acid/g lactose. Fermentation broth was concentrated to 81 g/L using microfiltration, nanofiltration and reverse osmosis. The lactic acid was then polymerized by ring opening polymerization obtaining PDLLA with 19,264.07 g/mol viscosity molecular weight, Mv.

INTRODUCCIÓN

La cantidad de residuos plásticos no biodegradables y su reciclaje se complica cada vez más por la pérdida de propiedades en cada ciclo de procesamiento, por lo que realizar productos con materiales biodegradables es importante tanto para mantener las necesidades básicas como para el procesamiento de desechos. Un polímero completamente biodegradable es un material que es convertido a dióxido de carbono, agua, minerales y biomasa por los microorganismos sin impacto ambiental o ecotoxicidad¹.

Uno de los polímeros biodegradables empleados para fabricar artículos desechables de uso comercial como vasos, platos, cubiertos y recipientes para almacenar comida, es el ácido poliláctico (PLA), un biopoliéster con características similares al polietilentereftalato (PET) así como al polipropileno (PP) y al poliestireno (PS). El PLA es un material con muchas aplicaciones, desde implantes y materiales quirúrgicos hasta envases para alimentos, ya que puede ser modificado para impacto, extruido, inyectado, cristalizado térmico e incluso copolimerizado².

El monómero empleado para la síntesis del PLA es el ácido láctico, que es un subproducto de la fermentación anaerobia a partir de un sustrato orgánico como es la glucosa, la cual transforman los microorganismos del género lactobacilo³.

En la naturaleza existen dos esteroisómeros del ácido láctico: el ácido L-láctico y el ácido D-láctico, cuya polimerización y copolimerización da lugar a productos con propiedades físicas diferentes. La pureza del monómero es

importante para que se lleve a cabo una polimerización con buenos rendimientos en cuanto a pesos moleculares y características deseadas para su procesamiento y aplicación. En los últimos años, se han empleado técnicas de separación de ácido láctico por medio de nanofiltración y ósmosis inversa, obteniéndose el monómero en grados de pureza mayores al 80%⁴.

La polimerización del ácido láctico puede llevarse a cabo por medio de apertura de anillo del lacturo, formado a partir de dos moléculas de ácido láctico que se ciclan en la presencia de sales de estaño, calor y vacío⁵.

Es importante resaltar que algunas de las investigaciones que se llevan a cabo actualmente en el Centro de Investigación Científica de Yucatán con aplicaciones biomédicas, por ejemplo el desarrollo de andamios y cementos óseos, emplean PLA, el cual es difícil de conseguir por su costo y disponibilidad. En México un aspecto importante para incentivar el uso del PLA, es la aplicación de la reforma a la Ley de Residuos Sólidos del Distrito Federal que entró en vigor en enero de 2010 con el propósito de disminuir las grandes cantidades de residuos como son las bolsas que se generan por parte del sector comercial.

Por lo anterior, en este estudio se propone la obtención de ácido láctico por medio de fermentación láctica para su posterior separación y purificación, por lo que se empleará nanofiltración y ósmosis inversa con membranas de poliamida, y una posterior polimerización por apertura de anillo.

HIPÓTESIS

El ácido láctico producido por la cepa de bacteria ácido láctica con mayor rendimiento, separado y concentrado del proceso de fermentación podrá polimerizarse de manera satisfactoria por el método de apertura de anillo.

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar ácido poliláctico por medio de la apertura de anillo del lacturo obtenido a partir del ácido láctico previamente separado y purificado del proceso de fermentación de una de las cepas *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* o *L. lactis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener ácido láctico a partir de lactosa por medio de fermentación láctica utilizando 5 cepas de lactobacilos.
- Concentrar el ácido láctico obtenido en la fermentación a través de nanofiltración y ósmosis inversa.
- Sintetizar ácido poliláctico del monómero obtenido por medio de reacciones de apertura de anillo.

CAPITULO 1
ANTECEDENTES

1.1 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico tiene una larga historia en el uso de fermentación y preservación de alimentos, se descubrió en 1780 por el químico Scheele, quien inicialmente lo consideró como un componente de la leche, para 1789 Lavoisier lo llamó “acide lactique”, posible origen de la actual terminología para ácido láctico. Pasteur descubrió que no es un componente de la leche, sino un metabolito generado por la fermentación realizada por ciertos microorganismos, lo que llevó a Fermi a producirlo mediante la fermentación de carbohidratos como la sacarosa, lactosa, manitol, almidón y dextrosa⁶. Para 1881, se comenzó la primer producción comercial de ácido láctico mediante un proceso microbiano en Estados Unidos de América⁷.

El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico), con fórmula $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$, es uno de los ácidos hidroxicarboxílicos más comunes⁸. Este ácido carboxílico es producido por animales, plantas y microorganismos de dos formas ópticamente activas, como se observa en la Figura 1.1, la D(-) levorrotatoria y la L(+) dextrorrotatoria, ambos isómeros existen en los sistemas biológicos, generalmente el obtenido por fermentación es una mezcla racémica (formas D y L)⁹, Socol *et al.*¹⁰ reportaron que el isómero más importante en la industria de los alimentos es el L(+), ya que sólo éste lo asimilan los humanos mediante la producción de la enzima L-lactato deshidrogenasa.

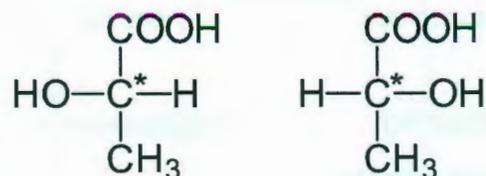


Figura 1.1. Ácido L(+) láctico a la izquierda y ácido D(-) láctico a la derecha. C* es el carbono asimétrico de la molécula de ácido láctico.

Adaptado de Morrison¹¹

Como se dijo anteriormente el ácido láctico puede producirse de manera comercial tanto por ruta química como por ruta bioquímica (Figura 1.2), el método más usado para la producción química es mediante la hidrólisis del lactonitrilo, derivado de la reacción del acetaldehído con cianuro, obteniéndose una mezcla racémica del ácido láctico. El proceso biotecnológico puede producir las dos formas del ácido láctico [D(-) o L(+)] por separado, o una mezcla con proporciones diferentes de los dos isómeros, dependiendo de los microorganismos, del sustrato y de las condiciones de crecimiento usados en el proceso. Otra ventaja importante del proceso biotecnológico es la posibilidad de utilizar una gran variedad de sustratos orgánicos ricos en carbohidratos como melazas, suero de leche, almidón, etc. Uno de los residuos de mayor interés para la obtención de ácido láctico es el suero de leche, mayoritario en la industria dedicada a los procesos de la leche, que contiene lactosa, proteínas, grasas y sales minerales, con deficiencia de nitrógeno peptídico por lo que comúnmente se le adiciona extracto de levadura¹²

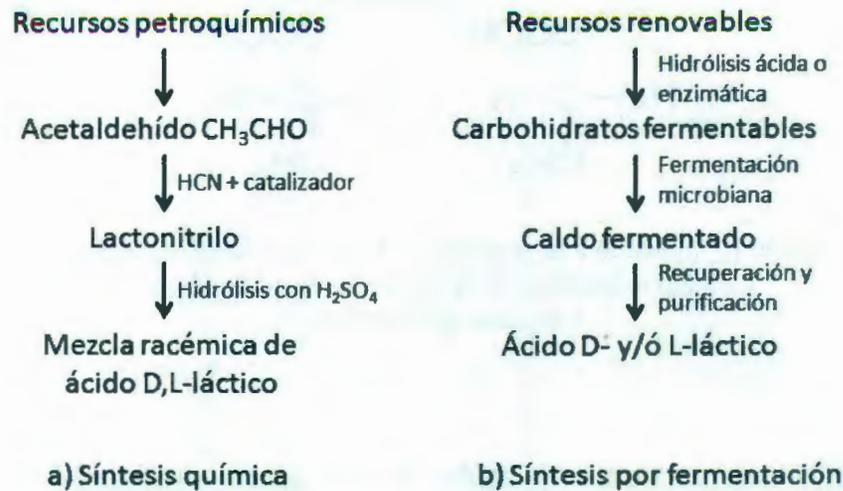


Figura 1.2. Vista general de los procesos de obtención de ácido láctico; (a) síntesis química y (b) síntesis por fermentación¹²

Debido a que el ácido láctico es inocuo por naturaleza, se ha producido como subproducto en muchas industrias, en 1990 la producción mundial creció a aproximadamente 40,000 ton/año, con dos significativos productores, CCA Biochem en Holanda, con subsidiarias en Brasil y España utilizando materias primas ricas en carbohidratos, y Sterling Chemicals en Texas, TX, EUA con tecnología química.

El ácido láctico se considera un compuesto químico con variadas aplicaciones, como monómero en plásticos o intermediario en la síntesis de químicos oxigenados en elevado volumen, lo que significa un incremento en la demanda, para 2003, Sterling incorporó dos nuevos manufactureros, Archer Daniels Midland (ADM) y Cargill Dow (una fusión de Dow Chemical Company y de Cargill Corporation), quienes utilizan la tecnología de fermentación de carbohidratos. En 2005 Cargill compra Dow y establece

NatureWorks LLC como empresa de un solo subsidiario. ADM se enfocó en el ácido láctico y sus derivados convencionales, mientras que NatureWorks LLC ha sido el líder mundial en la producción de polímeros basados en lactatos. La producción global en 2005 se estima en alrededor de 120,000 ton/año, y ha crecido considerablemente, entre el 20 y el 30 %, debido al desarrollo de nuevos usos, la producción tecnológica actual se basa en fermentación de carbohidratos⁸.

1.2 FERMENTACIÓN LÁCTICA

Numerosos microorganismos fermentan la glucosa y otras hexosas a lactato en condiciones anaerobias¹³. Este proceso es llevado a cabo mediante una reacción catalizada por una deshidrogenasa láctica ligada a dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD). En esta reacción se reduce el piruvato a lactato y no se forma gas. El beneficio producido es de 2 moléculas de adenosín trifosfato (ATP) por hexosa, puesto que se consumen 2 ATP en la formación de hexosa-difosfato a partir de la glucosa, y por otra parte, se producen, consecuentemente 4 ATP. Esta fermentación es idéntica a la glucólisis de las células de los mamíferos¹⁴.

La fermentación láctica se lleva a cabo en el citoplasma celular. A través de la glucólisis se obtienen dos moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa¹³. Las vías utilizadas para la asimilación de hexosas y pentosas en ácido láctico son la de Embden-Meyerhof (EMP) y la de pentosa fosfocetolasa (PK)¹².

El transporte y fosforilación de los azúcares ocurre mediante el transporte de glucosa libre y fosforilación por un ATP-dependiente de hexosa quinasa (otros azúcares, como la manosa y fructosa entran en las rutas o vías mayores como glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato después de su isomerización y/o fosforilación); el transporte de azúcares también puede ocurrir mediante el sistema de fosfotransferasa de azúcar (PTS) como el fosfoenolpiruvato (PEP), en el cual el PEP es el donador fosforilado para la recepción de azúcar, algunas especies de bacterias acidolácticas (BAL) utilizan el sistema PTS para la galactosa y otro sistema para los demás azúcares¹⁵.

Bajo condiciones de oxígeno limitado y exceso de glucosa, las BAL homolácticas catabolizan un mol de glucosa en dos moles de piruvato mediante la vía de Embden-Meyerhof. El balance redox intracelular es mantenido a través de la oxidación de NADH (forma reducida de NAD), coordinado con la reducción del piruvato a ácido láctico. Este proceso también produce dos moles de ATP por glucosa consumida¹⁵. Posteriormente, el ácido pirúvico es transformado en ácido láctico por medio de dos moléculas de NADH, siendo uno de los metabolitos principales de las bacterias del género lactobacilo (Figura 1.3)¹⁴.

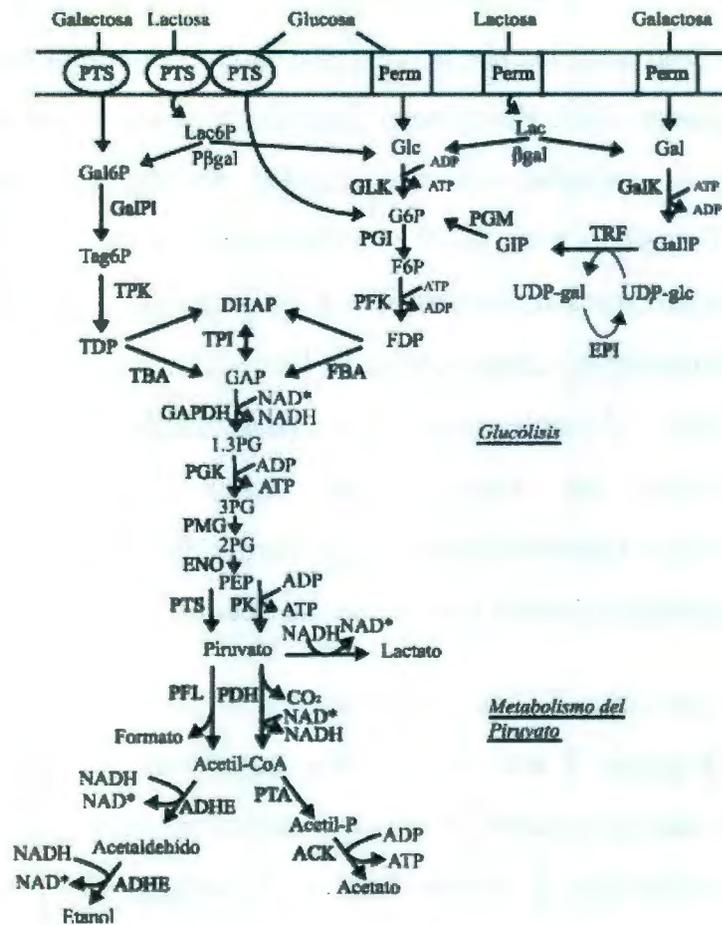


Figura 1.3. Metabolismo de lactosa, galactosa y glucosa en *Lactococcus lactis*: enzimas responsables de las rutas metabólicas principales.

Glc Glucosa, G6P glucosa-6-fosfato, G1P glucosa-1-fosfato, F6P fructosa-6-fosfato, FDP fructosa-1,6-difosfato, DHAP dihidroxiacetona-fosfato, GAP gliceraldehído-3-fosfato, 1,3PG 1,3-difosfoglicerato, 3PG 3 fosfoglicerato, 2PG 2-fosfoglicerato, PEP fosfoenolpiruvato, Tag6P tagatosa-6-fosfato, TDP tagatosa-1,6-difosfato, Gal galactosa, Gal6P galactosa-6-fosfato, Gal1P galactosa-1-fosfato, GLK glucoquinasa, PGI glucosa-fosfato isomerasa, PFK fosfofructoquinasa, FBA fructosa-bifosfato aldolasa, TPI triosa-fosfato isomerasa, GAPDH gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa, PGK fosfoglicerato quinasa, PMG fosfoglicerato mutasa, ENO enolasa, PK piruvato quinasa, GalPI galactosa-fosfato isomerasa, TPK taganosa-fosfato quinasa, TBA taganosa-bifosfato aldolasa, GalK galactoquinasa, TRF galactosa/uridilil transferasa, EPI UDP-glucosa epimerasa, PGM fosfoglucomutasa, LDH lactato deshidrogenasa, PFL piruvato formato liasa, PDH piruvato deshidrogenasa, PTA fosfotransacetilasa, ACK acetato quinasa, ADHE alcohol deshidrogenasa¹⁶

1.2.1 Microorganismos empleados en el proceso

Como se mencionó anteriormente, el ácido láctico puede ser producido por fermentación usando BAL del género *Lactobacillus* que comprende especies con una amplia variedad de propiedades fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas¹⁵. Orla-Jensen en 1919 clasificó por primera vez las BAL y las definió como organismos microaerofílicos, gram positivos, no formadores de esporas que fermentan el azúcar en ácido láctico; también las dividió en dos grupos: a) BAL homofermentativas (homolácticas), que fermentan predominantemente las hexosas en ácido láctico, y b) BAL heterofermentativas (heterolácticas), que fermentan las hexosas a ácido láctico y otros productos como etanol y ácido acético⁹.

El género se ha dividido en tres subgrupos con más de 70 especies reconocidas. El grupo I son lactobacilos homofermentativos obligados y producen ácido láctico a partir de glucosa como producto principal (>85%), están representados por *L. delbrueckii* y *L. acidophilus*, que tienen un crecimiento favorable a temperaturas de 45 °C, e inhibiéndose a 15 °C. El grupo II es también homofermentativo, crece a 15 °C y tiene un crecimiento variable a 45 °C, está representado por *L. casei* y *L. plantarum*, pueden producir “fermentaciones oxidativas” (acetato) si el O₂ está presente. El grupo III de los lactobacilos es heterofermentativo, producen CO₂ y etanol junto con ácido láctico a partir de glucosa, la enzima aldolasa está ausente y la fosfocetolasa presente, las especies representativas incluyen a *L. fermentum*, *L. brevis* y *L. keferi*¹⁵.

Algunas BAL homolácticas alcanzan rendimientos de aproximadamente 1 g de ácido láctico por cada gramo de glucosa presente en el medio, en la Tabla 1.1 se encuentran algunos estudios realizados del 2000 al 2010.

Tabla 1.1 Producción de ácido láctico y condiciones de fermentación para distintas BAL

BAL	Sistema	pH/T °C	Rendimiento (g A.L./g Sto)	Autor, año
<i>L. plantarum</i>	Batch	6.0/35	0.84	Guyot <i>et al</i> , 2000 ¹⁷
<i>L. helveticus</i>	Continuo	5.5/42	0.84	Tango <i>et al</i> , 2002 ¹⁸
<i>L. lactis</i>	Batch	6.2/37	0.96	Bai <i>et al</i> , 2003 ¹⁹
<i>L. delbrueckii</i>	Batch	5/50	0.92	Shen <i>et al</i> , 2006 ²⁰
<i>L. lactis</i>	Batch	5.5/42	0.9	Lee <i>et al</i> , 2007 ²¹
<i>Lactococcus lactis</i>	Batch	6.0/38	0.94	Nancib <i>et al</i> , 2009 ²²
<i>L. bulgaricus</i>	Batch	5.5-6.0/38	0.98	Ghasemi <i>et al</i> , 2009 ²³
<i>L. plantarum</i>	Batch	6.4/42	1.5	Brinques <i>et al</i> , 2010 ²⁴

A.L.: ácido láctico; Sto.: sustrato inicial

1.3 SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es producido en varios grados comerciales, los de mayor pureza requieren que el medio de fermentación tenga sustratos bien purificados para reducir los niveles de impurezas que puedan estar presentes

durante la recuperación, ya que estas no pueden ser separadas del ácido láctico.

Uno de los grados comerciales del ácido láctico es el “crudo” o “técnico” con concentraciones que van del 20 al 80 %, para su obtención se utiliza ácido sulfúrico para eliminar el calcio del lactato de calcio obtenido por el calentamiento del caldo de fermentación, seguido por una filtración y concentración para remover el sulfato de calcio formado.

Para la producción del ácido láctico grado comestible, que es de color blanco y tiene una concentración del 80 % se necesita una refinación adicional sobre el ácido láctico de grado “crudo”; el grado plástico debe ser de alta pureza (concentración del 90 %) y transparente, obtenido mediante una posterior refinación del grado crudo y una mínima pérdida en los rendimientos durante la misma¹².

El proceso de producción de ácido láctico incluye dos pasos claves: (a) fermentación y (b) recuperación del producto⁴. A continuación se mencionan distintas formas de recuperación del ácido láctico:

La *extracción por solvente* del ácido láctico del caldo de fermentación es una manera de reducir su concentración, sin embargo, no es muy utilizado ya que causa numerosos problemas físicos, químicos y bioquímicos en la actividad catalítica de las BAL e interfiere en la condición aséptica del sistema de fermentación²⁵.

El proceso de *adsorción* requiere la regeneración de resinas de intercambio iónico con una vida útil de 5 a 10 años de los adsorbentes y filtración adicional.

La *destilación directa* es un proceso que consume energía y causa la transformación del producto, como la polimerización del ácido láctico, la cual no es deseada en este punto.

La *tecnología de membranas* mediante sistemas de filtración, ha probado sus avances en los campos de separación y concentración, tiene numerosas ventajas sobre varias técnicas de separación tradicional como la extracción por solvente, adsorción y destilación directa, además que son más eficientes energéticamente y el elevado costo de solventes o adsorbentes no son necesarios en la separación por membrana, la cual hace posible la concentración de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos²⁶.

La filtración es el transporte convectivo de masa de una mezcla líquida o dispersión de gases a través de barreras porosas, se lleva a cabo idealmente en los espacios vacíos de la barrera, en el caso de partículas se llama tamizado y difusión cuando los componentes son gaseosos, la exclusión de partículas es por tamaño de moléculas (Figura 1.4). Debido al tamaño de los poros de algunas membranas la fuerza de gravedad a veces no es suficiente para vencer la resistencia hidráulica de la barrera por lo que se emplean diferenciales de presión para favorecer el proceso.

Clasificar los solutos mediante estas categorías se basa en el argumento geométrico de la difusividad del mismo en solución acuosa y su diámetro en razón a la masa molecular: $d[nm] \approx 0.13 \times MW^{1/3}$ ²⁶.

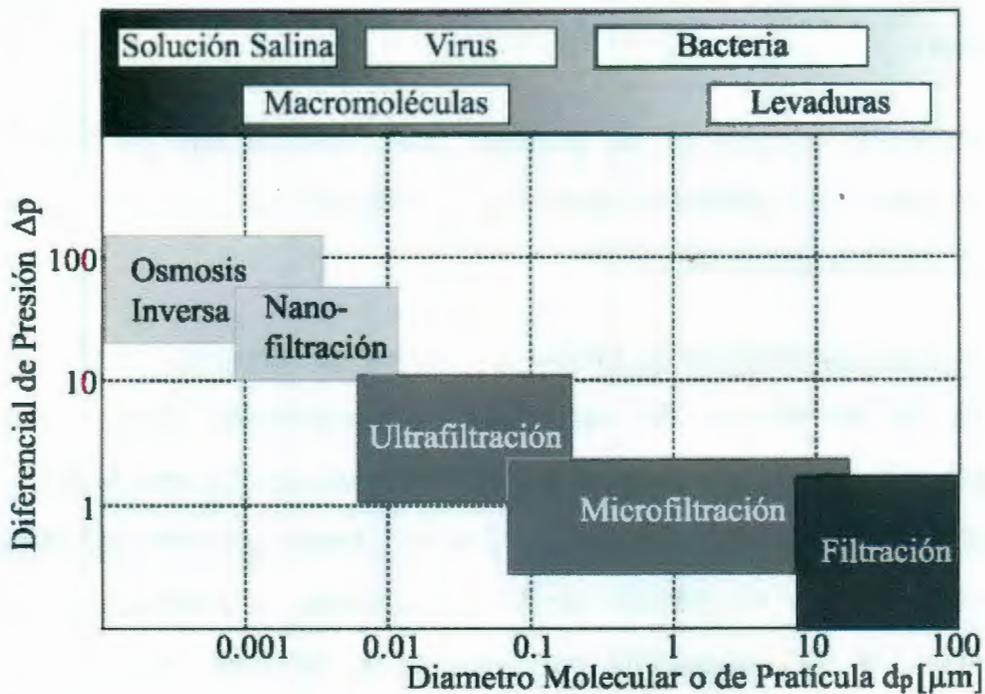


Figura 1.4. Intervalos de presión para la operación de procesos con membrana: El espectro de filtración.

El incremento en la presión de operación significa el incremento en la resistencia hidráulica de las barreras empleadas²⁶

Tipos de filtraciones utilizadas en los procesos de separación:

Ultrafiltración: Puede remover macromoléculas disueltas con corte de peso molecular (MWCO –Molecular Weight Cutoff–) entre 1000 y 20,000 Da, con diámetro de poro de 0.01-0.1 μm . Las células y las proteínas pueden ser separadas con éxito en el caldo de fermentación usando membrana de ultrafiltración con MWCO alrededor de 20,000 Da.

Nanofiltración: Proceso impulsado por la presión de membrana con un MWCO situado entre la ósmosis inversa y ultrafiltración, el diámetro de poro va de los 0.001 a 0.01 μm . El proceso podría separar las sales monovalentes y orgánicas en el intervalo de peso molecular 200-1000 Da⁴.

Ósmosis Inversa: Se basa en un mecanismo de difusión de una solución a presiones elevadas. Esta técnica es apropiada para moléculas con un intervalo de 50-500 Da, los poros van de 0.1-1.0 nm²⁷.

1.4 GENERALIDADES DEL ÁCIDO POLILÁCTICO

El ácido poliláctico (PLA) (Figura 1.5) es un poliéster biodegradable, biocompatible y compostable derivado del ácido láctico, por lo que tiene un futuro prometedor como un polímero termoplástico biodegradable²⁸. Es además un termoplástico rígido que puede ser semicristalino o totalmente amorfo, dependiendo de la pureza del estereoisómero² y muchas de sus propiedades son equivalentes o mejores que las de muchos plásticos derivados del petróleo, las cuales lo hacen competitivo en una amplia variedad de aplicaciones como en la industria textil, de empaque y embalaje así como en la medicina²⁹.

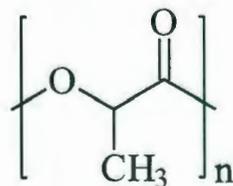


Figura 1.5. Estructura general del PLA.
Adaptado de Odian³⁰

El interés en este material data desde 1930 cuando W. Carothers en sus estudios de polimerización por etapas de diferentes ácidos, obtuvo calentando ácido láctico al vacío, un polímero de bajo peso molecular con pobres propiedades mecánicas y susceptible a la degradación hidrolítica. Con trabajos posteriores de DuPont™, en 1954 se obtuvo PLA de alto peso molecular, siendo patentado, sin embargo, la susceptibilidad a la degradación hidrolítica que presenta este polímero llevó a abandonar los estudios en el área. Fue hasta 1972, que Ethicon® creó una fibra biocompatible de muy buena resistencia, usada para suturas médicas, la cual era un copolímero del ácido láctico y glicólico que se hidrolizaba en el cuerpo en ácidos constituyentes²⁹.

Los altos costos para producir ácido láctico por vía química restringieron su uso sólo al campo de la medicina, sin embargo para 1980 estos costos disminuyeron significativamente cuando se realizaron avances importantes en la obtención de ácido láctico por la vía biotecnológica, lo cual hizo accesible generarlo a gran escala. La producción de ácido poliláctico en 2008 sobrepasó las 100,000 ton/año y muestra un crecimiento anual del 15%. En la Tabla 1.2 se listan las empresas más importantes en este mercado³¹.

Tabla 1.2. Producción Industrial de PLA año 2008³¹

Compañía/país	Marca registrada®	Producción anual (ton/año)
Cargill/ EUA	NatureWorks PLA	140,000
Toyota (Shimadzu Co.)/Japón	LACTY	200
Dupont/EUA	Medisorb	>100
Purac/Holanda	Purasorb	>100
Quimicos Mitsui/Japón	LACEA	500
Biomateriales Hisun/China	RECODE	5,000

Las ventajas del PLA son numerosas e incluyen: (1) producción del monómero por fermentación de mono o disacáridos, (2) fijación de cantidades significativas de dióxido de carbono, principal gas invernadero, (3) importante ahorro de energía; (4) posibilidad de reciclar de nuevo a ácido láctico (un no-tóxico, metabolito natural) por hidrólisis o alcoholisis; (5) capacidad de producción de plástico para embalaje con una biodegradación de 6 meses a 2 años, (6) reducción de los volúmenes de los vertederos³².

1.4.1 Influencia de la pureza óptica en las propiedades del ácido poliláctico

El ácido láctico es una molécula quiral, existe en dos formas estereoisómeras que dan lugar a tres polímeros morfológicamente diferentes y con propiedades totalmente diferentes. Dos polímeros estereorregulares, ácido poli(L-láctico)

(PLLA) y ácido poli(D-láctico) (PDLA), y la forma racémica ácido poli(D,L-láctico) (PDLLA). Los polímeros derivados de los monómeros D y L del ácido poliláctico son materiales semicristalinos, mientras que el PDLLA es siempre amorfo¹².

El PLA comercial es un copolímero con mayor concentración de L-lactato al que se le adiciona D-lactato, la pureza óptica se encuentra estrechamente ligada a sus propiedades y al disminuir el grado de estereorregularidad y cristalinidad ésta se reduce; el PLA ópticamente puro es isotáctico y cristalino³³. Las unidades de ácido D(-)láctico son incorporadas al PLLA para optimizar la cinética de cristalización en los procesos de fabricación y aplicaciones².

El PLLA, debido a su alto grado de cristalinidad y estereorregularidad, tiene alta resistencia a la tensión y baja elongación, y consecuentemente tiene un módulo de Young elevado, lo que hace al polímero muy adecuado para aplicaciones que tienen que soportar cargas mecánicas. Térmicamente, se caracteriza por tener un punto de fusión elevado (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea comprendida entre 60 y 65°C de acuerdo con el peso molecular³¹; el PDLA presenta las mismas características que el PLLA, cambiando sólo la conformación espacial de las moléculas y por lo tanto la orientación de los cristales formados³⁴. El PDLLA, por el contrario, es un polímero amorfo, ya que está formado por los dos isómeros del ácido láctico con una distribución aleatoria, hecho que impide que su estructura sea cristalina. Consecuentemente, este polímero tiene una resistencia a la tensión más baja, alta elongación, y una elevada velocidad de degradación que hace que sea un material muy atractivo para los sistemas de liberación de fármacos.

También se preparan copolímeros de PLLA Y PDLLA para disminuir la cristalinidad del polímero quiral y controlar el proceso de degradación. En la Tabla 1.3 se listan algunas de estas propiedades³¹

Tabla 1.3. Propiedades del PLA producido por Birmingham Polymers, EEUU³¹

Propiedad	PLLA	PDLLA
T _g (°C)	60-65	50-60
T _f (°C)	180	Amorfo
Densidad (g/cm ³)	1.24	1.25
Tensión (MPa)	55.2-82.7	27.6-41.4
Modulo Elástico Tensión (GPa)	2.7-4.1	1.4-2.7
Tiempo de degradación (meses)	>20	12-16

T_g : temperatura de transición vítrea, T_f: temperatura de fusión

1.4.2 Influencia del peso molecular en las propiedades del ácido poliláctico

El peso molecular también influye en las propiedades del polímero, ya que a medida que este aumenta, las propiedades térmicas y mecánicas aumentan. En general las propiedades del PLA empiezan a cobrar importancia después de alcanzar un peso molecular de 35,000 g/mol para el PLLA y 55,000 g/mol para el PDLLA. En la Tabla 1.4, se observan las diferencias en propiedades térmicas y mecánicas de polímeros de PLA tanto amorfo como semicristalino con diversos pesos moleculares³⁵.

Tabla 1.4. Dependencia de algunas propiedades de PLA con el peso molecular³⁵

Polímero	T_g	T_f	Tensión	Módulo
PM (g/mol)	(°C)	(°C)	(MPa)	Elástico (GPa)
PLLA / 50.000	54	159	28	1.2
PLLA / 100.000	58	170	50	2.7
PLLA / 300.000	59	178	48	3
PDLLA / 20.000	50	-	-	-
PDLLA / 107.000	51	-	29	1.9
PDLLA / 550.000	53	-	35	2.4

1.4.3 Comparación del ácido poliláctico con otros termoplásticos de uso común

El PLA tiene propiedades mecánicas en el mismo intervalo de los polímeros petroquímicos, a excepción de una baja elongación, sin embargo, esta propiedad puede ser afinada durante la polimerización por copolimerización o por modificaciones post polimerización, por ejemplo con la adición de plastificantes. La Tabla 1.5 muestra una comparación de algunas propiedades mecánicas de plásticos de origen petroquímico con las propiedades del PLA³⁶.

Tabla 1.5. Algunas propiedades mecánicas de polímeros de uso común³⁵

Polímero	Tensión (MPa)	Modulo Elástico (GPa)
LDPE	8-20	0.3-0.5
HDPE	20-37.2	-
PET	73-80	2.8-4.1
PS	70-115	2.3-3.3
PA	62-82.7	1.2-2.8
PP	33-37.9	1.1-1.5
PLLA (96 % L)	55.2-82.7	2.7-4.1

LDPE: polietileno de baja densidad; HDPE: polietileno de alta densidad;
PET: polietileno tereftalato; PS: poliestireno; PA: poliamida; PP:
polipropileno; PLLA: ácido poli L-láctico.

El PLA es un polímero que se comporta como el PET, pero también como el PP. Fundamentalmente podría ser un polímero con amplias aplicaciones debido a su capacidad de ser cristalizado térmicamente, modificado por impacto, inyectado, copolimerizado y procesado en una gran cantidad de equipo. Puede ser producido como películas transparentes, fibras, o moldeado por inyección para producir, por ejemplo botellas. El PLA, también tiene excelentes características organolépticas que lo hacen único en el mercado, incluso para la química verde².

1.4.4 Métodos para obtener ácido poliláctico

Existen dos métodos ampliamente usados para producir PLA a partir del monómero de ácido láctico. El primero comprende la condensación-remoción de agua mediante el uso de solventes en alto vacío y temperaturas elevadas. Esta técnica fue usada por Carothers y aún se aplica por *Mitsui Toatsu Chemicals* para producir intermediarios de bajo peso molecular (prepolímero) del polímero que pueden ser sintetizados solos o acoplados a isocianatos, epóxidos o peróxidos para producir un amplio intervalo de pesos moleculares. El segundo consiste en remover el agua bajo condiciones menos reactivas sin solventes, para producir un dímero cíclico, conocido como lacturo. En el año 2002, *Cargill Dow Co.* lanzó una producción en masa basada en PLA de 300 millones de dólares bajo la marca registrada de NatureWorks™³⁷.

1.5 SÍNTESIS DEL ÁCIDO POLILÁCTICO

La síntesis de PLA de alto peso molecular se puede llevar a cabo por diversos métodos (Figura 1.6):

1. Polimerización por condensación directa (PCD)
2. Uso de agentes acoplantes de cadena en oligómeros de bajo peso molecular.
3. Polimerización por apertura de anillo (ROP –Ring Opening Polymerization–) de un dímero cíclico intermediario (lacturo)³¹.

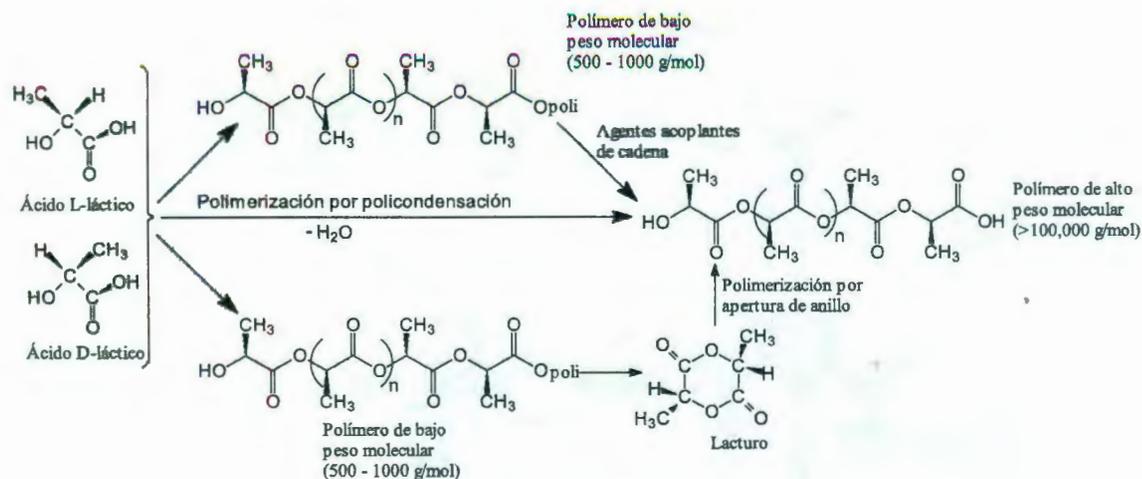


Figura 1.6. Rutas de síntesis de PLA³¹

1.5.1 Polimerización por condensación directa (PCD)

Esta polimerización sucede porque el ácido láctico es un hidroxiaácido de estructura simple, el cual puede ser polimerizado por poliesterificación directa entre los grupos carboxilo e hidroxilo en su estructura. Las reacciones de policondensación están descritas como polimerizaciones por etapas; para este monómero la reacción empieza con la protonación del oxígeno, debido a la temperatura, del grupo carbonilo por un ión H⁺ procedente del medio de reacción, posteriormente el carbono de este mismo grupo sufre un ataque nucleofílico por parte de un hidroxilo de otra molécula de monómero, formándose una estructura tetraédrica, luego se elimina una molécula de agua y un protón y se forma de esta manera un enlace éster; este proceso continúa varias veces hasta formar las cadenas largas de polímero³⁵. Para que estas reacciones sean más eficientes se aplica vacío, de esta manera el agua producto de la policondensación es eliminada del medio. Esta reacción se esquematiza en la figura 1.7.

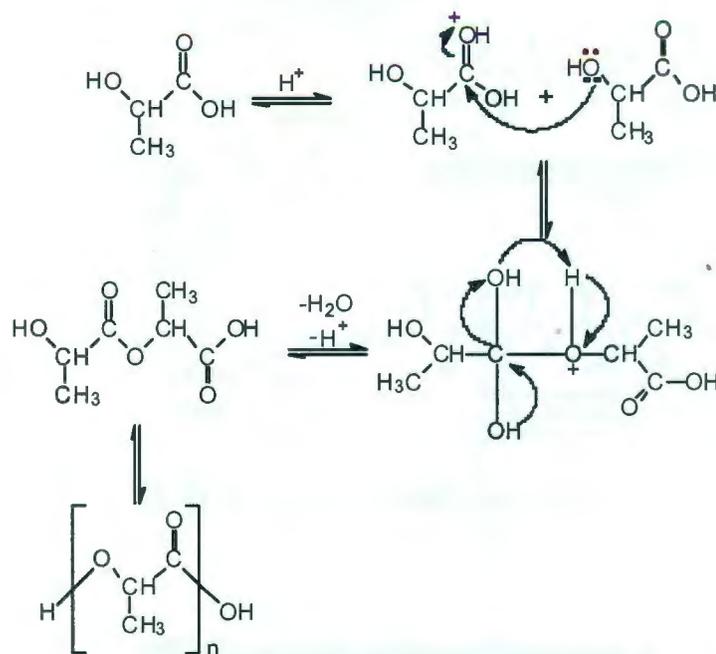


Figura 1.7. Reacción de policondensación del ácido láctico.
Adaptado de Odian, 2004³⁰

La Figura 1.8 muestra la reacción para la formación de PLA. El agua en la solución de ácido L-láctico (L-LA) y la producida por la auto-esterificación es removida por destilación a 150°C. Subsecuentemente, se forman oligómeros de L-LA con pesos moleculares de 1000-5000 Da, como se muestra en el paso 1. El lacturo no puede ser producido directamente de la forma L-LA debido a la presencia de agua en el reactor. La polimerización inicia al vacío, para formar el PLA de bajo peso molecular, como se observa en el paso 2, sin embargo la degradación térmica de las cadenas poliméricas forma moléculas pequeñas, por escisiones específicas y lo llevan a lacturo y no a compuestos vinílicos por escisiones al azar⁵.

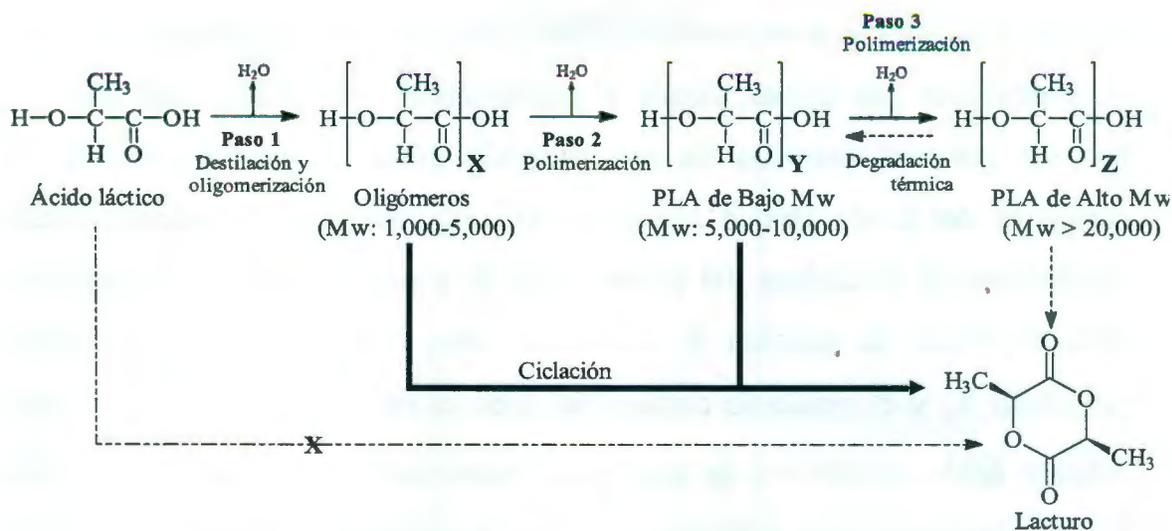


Figura 1.8. Mecanismo de reacción para el PLA. Polimerización y degradación térmica del PLA por escisiones específicas⁵

Esta polimerización se realiza en ausencia de catalizador, por lo tanto es una reacción de tercer orden que conduce a admitir que los grupos terminales -COOH juegan el papel de catalizador, el monómero es el propio catalizador. Esta reacción tiene una dependencia de segundo orden con la concentración del carboxilo y consta de dos dependencias de primer orden, una para el carboxilo como reactivo y otra como catalizador.

La velocidad de polimerización está dada por:
$$-\frac{d[\text{COOH}]}{dt} = k[\text{COOH}]^2[\text{OH}];$$

donde $[\text{COOH}] = [\text{OH}] = [\text{M}]$. Como en la molécula de ácido láctico, la concentración de grupos funcionales hidroxilo y carboxilo son iguales, la ecuación anterior se puede escribir de la siguiente manera para representar que es una reacción de tercer orden:

$$-\frac{d[\text{M}]}{dt} = k[\text{M}]^3.$$

La condensación de ácido láctico a ácido poliláctico es considerada como una polimerización por etapas, donde el crecimiento de la cadena del polímero procede por una reacción de esterificación entre los grupos hidroxilo y carboxilo del ácido láctico monomérico, oligomérico y polimérico. Cada crecimiento de la cadena del polímero se da a una velocidad relativamente lenta siguiendo la relación de Carothers entre el grado de polimerización promedio X_n y el grado de conversión p de la reacción, $X_n = 1/(1-p)$. Para obtener ácido poliláctico de alto peso molecular con buenas propiedades físicas necesarias para películas y fibras, la reacción se debe conducir por encima de un 99.5 % ($p=0.995$) de conversión, esto no es fácil de lograr debido a que es complejo remover el agua del ácido poliláctico fundido con alta viscosidad, y además por la formación simultánea de lacturo. Por policondensación se obtienen generalmente polímeros de bajo peso molecular, frágiles, un polímero cristalino, e inadecuado en cualquier aplicación a menos que se usen agentes de acople o coadyuvantes promotores de esterificación para incrementar el peso molecular del polímero. El peso molecular de este polímero de condensación es bajo debido a la viscosidad del polímero fundido, la presencia de agua, impurezas, la ausencia estadística (baja concentración) de grupos finales reactivos, y la reacción de equilibrio “back-biting” que forma el anillo de lacturo de seis miembros³⁸.

Moon *et al.*³⁹ lograron la preparación de PLA de alto peso molecular por la policondensación directa del ácido láctico, utilizando compuestos de Sn(II) activados por protones ácidos como co-catalizadores. En este proceso, la actividad del Sn(II) se encuentra controlada por los protones, aunque su acción y mecanismo de reacción no han sido del todo claras.

Chen *et al.*⁴⁰ practicaron diferentes estrategias operativas mediante el control de la descompresión y la tasa de eterificación para producir polímero de alto peso molecular. Se informó por primera vez un peso molecular del PLA de aproximadamente ~130,000 Da.

1.5.2 Uso de agentes acoplantes de cadena en oligómeros de bajo peso molecular

La PCD es la ruta que implica menor gasto, pero el sistema libre de solventes complica la obtención de polímero de alto peso molecular, por lo que el uso de agentes acoplantes o promotores de la esterificación es necesario para lograrlos, aumentando el costo y la complejidad del sistema.

Los agentes acoplantes deben de reaccionar preferentemente con el grupo hidroxilo o carboxilo, lo que provoca diferentes tasas de cinética de reacción para cada acoplamiento, el PLA condensado se puede modificar para producir polímeros con grupos hidroxilo o carboxilo terminales dependiendo del agente empleado, de esta manera al utilizar pequeñas cantidades de compuestos hidroxilo multifuncionales como el 2-buteno-1,4-diol, glicerol o 1,4-butanodiol, se obtendrán cadenas con grupos terminales hidroxilo y para obtener grupos terminales carboxilos se pueden emplear ácidos grasos como el maleico, succínico, adípico o itacónico.

Varios promotores de esterificación y agentes extendedores de cadena se utilizan para incrementar el peso molecular del PLA a partir de productos de condensación directa, algunos ejemplos son el carbonato de

bis(triclorometilo), la dicitclohexilcarbodiimida y el carbonil diimidazol, estos compuestos producen subproductos que pueden degradar el polímero, por lo que deben ser removidos o neutralizados.

Este proceso tiene como desventajas el elevado costo del proceso debido al incremento de pasos en la reacción, el uso de solventes inflamables o peligrosos, no poder formar copolímeros con diferentes grupos funcionales y los pasos adicionales de separación y purificación de subproductos no recuperables⁴¹.

1.5.3 Polimerización por apertura de anillo

La ROP de lactonas ha sido estudiada ampliamente en los últimos 40 años, debido a su capacidad de producir una variedad de polímeros de manera controlada. Los primeros estudios en el área fueron realizados por Carothers y colaboradores quienes exploraron la técnica de ROP para lactonas, anhídridos y carbonatos⁴².

Este tipo de polimerización se asemeja a la polimerización en cadena pues consiste en una secuencia de iniciación, propagación y terminación, en la cual en el paso de propagación sólo se adiciona más monómero a las cadenas en crecimiento y a diferencia de la polimerización por etapas un monómero no reacciona con otros monómeros ni tampoco dímeros, trímeros, etc³⁰.

El proceso ROP comprende de la polimerización del ácido láctico hasta obtener ácido poliláctico de bajo peso molecular, como se muestra en la Figura 1.7, una posterior depolimerización para formar el dímero cíclico

(lacturo), y una nueva polimerización para obtener ácido poliláctico de alto peso molecular con octoato de estaño o algún otra sal orgánica de estaño como catalizador (Figura 1.9). La reacción de policondensación del ácido láctico se lleva a cabo generalmente a un intervalo de temperatura de 160 a 180 °C bajo presión reducida de 20 torr para sintetizar un polímero con un peso molecular que se encuentre entre 500 y 1000 Da. Esto debido a que pesos moleculares menores a 500 no favorecen la formación del dímero cíclico, y pesos moleculares mayores a 1000 acarrear problemas de fenómenos de transporte por el aumento en la viscosidad. La síntesis del lacturo se realiza combinando el prepolímero mencionado anteriormente con un catalizador seleccionado a presión reducida, generalmente no mayor a 20 torr, y temperaturas de 180 a 230 °C pues en este intervalo se genera lacturo sin la degradación del oligómero⁴³.

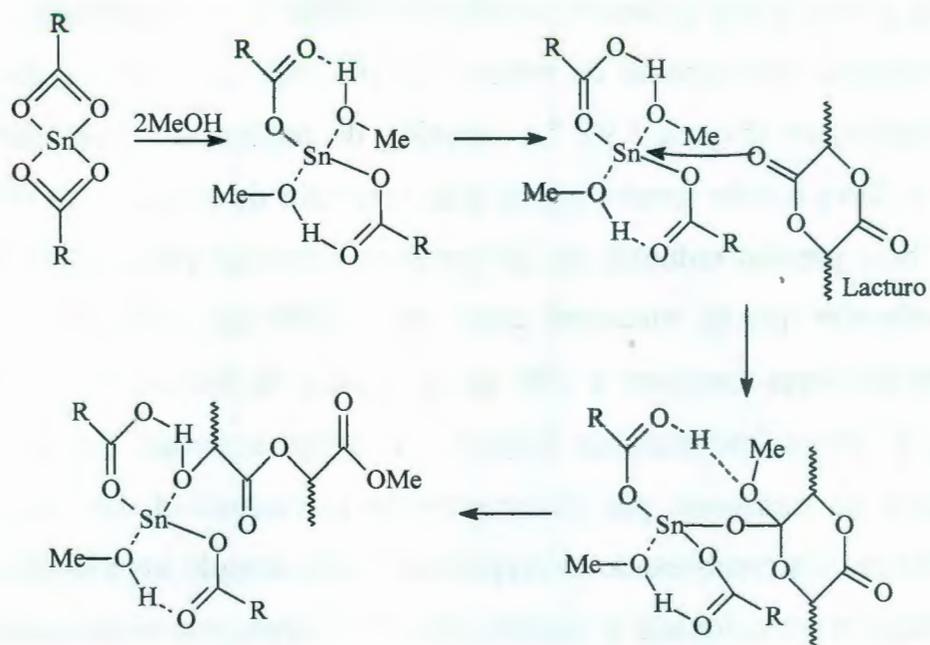


Figura 1.9. Síntesis de ácido láctico a partir de lacturo con catalizador de estaño⁴⁴

CAPÍTULO 2
METODOLOGÍA

2.1 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

2.1.1 Microorganismos y reactivos

Las cepas utilizadas en la producción de ácido láctico por fermentación anaerobia fueron adquiridas de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV y de la Distribuidora Alcatraz, S.A. de C.V. de marca Danisco, (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Microorganismos utilizados para la fermentación láctica

Procedencia	Microorganismo
Danisco	
Yo-Mix 401	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Choozit RA-24	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i>
CINVESTAV	<i>L. plantarum</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. lactis</i>

Las BAL que realizan la fermentación ácido láctica de los cultivos mixtos Yo-Mix 401 y Choozit RA-24 son *L. bulgaricus* y *Lc. lactis* respectivamente, a lo largo del texto estos cultivos se identificarán con el nombre del microorganismo responsable de la producción de ácido láctico.

Los reactivos empleados en la fermentación y preservación de las bacterias fueron:

- Leche NIDO[®] Nestlé
- Extracto de levadura de MCD Lab
- Peptona bacteriológica de MCD Lab
- Suero de leche procedente de la empresa Lattia
- Agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe) de BD Difco
- Caldo MRS de BD Difco
- Caldo lactosado de BD Difco
- Glicerol de Sigma Aldrich

2.1.2 Reactivación de bacterias

Para reactivar las bacterias se utilizó 1 L de agua residual sintética, la fuente de carbono es la lactosa que contiene la de leche Nido[®], incubándolas durante 14 h a 30 °C sin agitación (Figura 2.1), a partir de estos cultivos se realizaron las curvas de crecimiento, las fermentaciones y la preservación de las bacterias.



Figura 2.1. Cepas reactivadas en leche NIDO[®] y matraz con leche en polvo, extracto de levadura y peptona

2.1.3 Curva de crecimiento bacteriana

Para conocer el tiempo de crecimiento en el cual las bacterias alcanzan la fase exponencial, que es en la que deben encontrarse las BAL para inocular el caldo de fermentación^{45,46,47,48}, se realizó una curva de crecimiento bacteriano según la escala de McFarland (Anexo A) a 600 nm (Figura 2.2), utilizando tubos de rosca con 10 ml de caldo lactosado para cada cepa (por triplicado), haciendo una lectura cada 6 horas en espectrofotómetro JENWAY 6405 UV-Vis Spectrophotometer.



Figura 2.2. BAL en caldo lactosado para las curvas de crecimiento

2.1.4 Condiciones de fermentación

El ácido láctico se obtuvo en sistemas Batch a partir de la fermentación de leche NIDO[®] en polvo re-suspendida con agua destilada, por cada 100 ml de agua destilada se utilizaron 15 g de leche en polvo (aproximadamente 50 g/L de lactosa), enriqueciendo el medio con 2 g de extracto de levadura y 1 g de peptona bacteriológica, como fuentes de nitrógeno peptídico. El inóculo de cada cepa se preparó en 20 ml de leche NIDO[®] con la misma metodología empleada en la reactivación de las bacterias, se inoculó el 10 % del volumen total del caldo de fermentación por cada matraz^{19,24,45,49}.

La fermentación se realizó por triplicado para cada cepa en una incubadora con agitación Zhicheng ZHWY-200B a 38 °C con una agitación de 150 rpm en atmósfera anaerobia de N₂ hasta el consumo total de lactosa (Figura 2.3); cada cepa se ajustó a un pH de acuerdo a la Tabla 2.2, utilizando NaOH 4N, estos valores fueron estimados mediante varios ensayos previos, comenzando con la acidez mencionada en la literatura para cada cepa: 6.0 para *Lc. lactis*²², 6.2 para *L. bulgaricus*⁵⁰, 6.0 para *L. plantarum*²⁴, 5.5 para *L. delbrueckii*⁴⁵ y 6.2 para *L. lactis*¹⁹.



Figura 2.3. Fermentación con *L. lactis* en shaker a 150 rpm

Tabla 2.2. pH óptimo de fermentación láctica

Microorganismo	pH
<i>Lc. lactis</i>	6.0
<i>L. delbrueckii</i>	6.0
<i>L. plantarum</i>	6.5
<i>L. lactis</i>	6.0
<i>L. bulgaricus</i>	5.5

Se realizó una fermentación con suero de leche en paralelo utilizando la cepa con mejores rendimientos (Figura 2.4), este residuo fue proporcionado por la empresa Lattia (Planta Hacienda Santa María, ubicada en carretera Baca a Tixconchei), al cual se le añadió peptona bacteriológica y extracto de levadura⁵¹, así mismo se le determinó la concentración de lactosa que fue de aproximadamente 45 g/L, las condiciones de fermentación fueron las mismas que se utilizaron con leche NIDO[®].



Figura 2.4. Matraces de fermentación leche NIDO[®] (A, B, C) y suero de leche (D, E, F)

Las fermentaciones a partir de las cuales se obtuvo el ácido láctico para ser separado y polimerizado, se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml con las concentraciones de lactosa, aminoácidos peptídicos y condiciones antes mencionados, con un inóculo de 20 ml de BAL y un volumen de trabajo experimental de 200 ml de caldo de fermentación a base de leche NIDO[®].

2.1.5 Determinación de azúcares reductores y ácido láctico

Para el control de consumo de lactosa y producción de ácido láctico se tomaron muestras del caldo cada 6 h analizando tanto la concentración de lactosa por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS), usando glucosa como

estándar⁵², y la concentración de ácido láctico mediante el kit enzimático de Boehringer Mannheim/R-Biopharm (Anexo B) para determinar ácido L-láctico y ácido D-láctico así como sus formas ionizadas^{53,54}.

2.1.6 Preservación de los microorganismos

La preservación de los lactobacilos fue por resiembras periódicas entre 6 y 8 semanas bajo campana de flujo laminar vertical AIREsteril de Scorpion Scientific bajo asepsia, cada cepa se sembró por triplicado con asa bacteriológica por estriado en placas petri de 15-20 ml de agar MRS, posteriormente incubadas por 48 h a 38 °C en atmósfera anaerobia rica en CO₂ y preservadas a 4 °C una vez que se observó crecimiento (Figura 2.5). Los lactobacilos se conservan en microinóculo de 0.600 ml en tubo eppendorf con caldo MRS y glicerol al 10 % a -20 °C, todos los medios preparados y el material utilizado fueron previamente esterilizados en autoclave Felisa a 121 °C con presión de 15 psi durante 15 min.

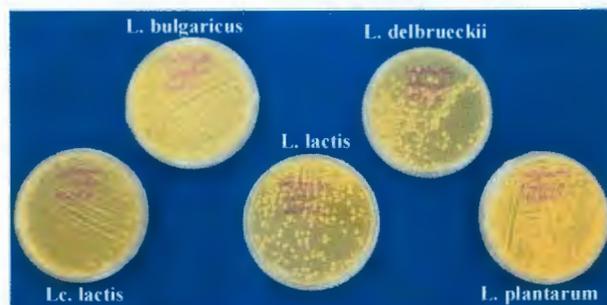


Figura 2.5. Preservación de colonias de BAL

2.2 SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

El caldo de fermentación contiene bacterias y partículas suspendidas que deben de ser retiradas antes de realizar la microfiltración, para lo cual se realizó primero una centrifugación del caldo fermentado a 4000 rpm por 30 minutos en tubos Falcon con una centrífuga IEC HN-SII, recuperando el sobrenadante que contiene el ácido láctico.

2.2.1 Microfiltración

El sobrenadante recuperado se filtró en membranas con tamaño de poro de $0.22\mu\text{m}$ en un dispositivo de filtración de flujo cruzado (Figura 2.6) diseñado y construido con la colaboración del Departamento de Instrumentación del Centro de Investigación Científica de Yucatán, el diseño se encuentra en el Anexo C, el flujo del caldo osciló entre los 10 y 150 ml/min mediante el uso de una bomba peristáltica marca Milton Roy, aplicando vacío de 100 torr con una bomba Siemens (Figura 2.7), cada 10 ml de permeado recuperado en un tubo de ensayo, el sistema se detenía para retirar y almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ el producto filtrado evitando así su contaminación o degradación.



Figura 2.6. Dispositivo de filtración de flujo cruzado



Figura 2.7. Sistema de filtración del proceso de separación y concentración de ácido láctico

2.2.2 Nanofiltración y Ósmosis Inversa

Las membranas empleadas en la nanofiltración y la ósmosis inversa fueron adquiridas de Industrias SEPRO, con el número de catálogo NF 5 y RO 4 respectivamente (Figura 2.8), en pliegos de 30 x 30 cm, se recortando círculos de 19.64 cm².



Figura 2.8. Membranas de nanofiltración y ósmosis inversa

La nanofiltración se realizó en el mismo sistema empleado para la microfiltración (Figura 2.7) aplicando un vacío de 100 torr. Nuevamente, para preservar el ácido láctico, cada 10 ml el proceso se detenía para retirar y almacenar a 4 °C evitando así su degradación.

La ósmosis inversa se llevó a cabo aplicando un vacío de hasta 10 torr, debido a la sobresaturación de los poros de la membrana, ésta se reemplazó diariamente para poder obtener al menos 30 ml de producto para ser analizada y polimerizada. El cambio diario de membrana se realizó porque no se cuenta con equipo de retrolavado con salmuera ácida, como el realizado por Durhan *et al.*⁵⁵, para mejorar la viabilidad de la membrana y realizar el proceso en continuo.

2.2.3 Determinación de concentración de ácido láctico

Para conocer la concentración de ácido láctico después de cada proceso de filtración se utilizó un kit enzimático de Boehringer Mannheim/R-Biopharm (Figura 2.9) que tiene un límite de detección de 0.3 mg/L.



Figura 2.9. Kit enzimático. A: ácido L-glutámico; B: NAD; C: glutamato-piruvato transaminasa; D: D-lactato deshidrogenasa; E: L-lactato deshidrogenasa

2.3 POLIMERIZACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Posterior a los procesos de filtración (microfiltración, nanofiltración y ósmosis inversa) se realizó la polimerización del ácido láctico recuperado.

El ácido DL-láctico se polimerizó por reacciones apertura de anillo, metodología adquirida en el laboratorio SIMERQO-Polímeros de la Universidad del Valle en Cali, Colombia, a cargo del Dr. Fabio Zuluaga, la estancia se realizó a través de una beca mixta de CONACYT entre el 03 de mayo y el 05 de junio de 2010.

2.3.1 Reactivos

Los reactivos empleados en la polimerización del ácido láctico fueron:

Ácido DL-láctico producido en el laboratorio de Energía Renovable

Tolueno de Sigma-Aldrich

Cloruro de estaño II dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de JTBaker

Octoato de estaño (SnOct_2) de Aldrich

2.3.2 Oligomerización del ácido láctico

Se purificó el ácido DL-láctico con tolueno (relación ácido:tolueno 1:2.5) mediante una destilación azeotrópica a 90 °C con agitación constante durante 4 horas, posteriormente el ácido purificado se polimerizó realizando rampas de temperatura y vacío hasta alcanzar los 170 °C y 120 torr respectivamente,

manteniéndose estas condiciones durante 3 horas que permitió obtener un oligómero de peso molecular entre 500 y 1000 Da (Figura 2.10).



Figura 2.10. Purificación y oligomerización del ácido D,L-láctico

2.3.3 Formación de lacturo

Posteriormente el oligómero se enfrió a temperatura ambiente y se pesó para añadir el 1 % en peso de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como catalizador para la formación de lacturo, que se realizó mediante una sublimación inversa, con rampas de temperatura y presión alcanzando los 220 °C y 60 torr. El lacturo obtenido se recristalizó cinco veces en acetato de etilo a 70 °C y se almacenó en el desecador durante 24 horas al vacío⁵⁶.

2.3.4 Polimerización del lacturo

La síntesis de ácido poli DL-Láctico (PDLLA) se realizó mediante ROP del DL-Lacturo sintetizado utilizando como catalizador octoato de estaño (SnOct_2) en ausencia de solvente, el matraz de reacción fue sellado y sumergido en un baño de arena térmicamente controlado a 130 °C durante 24

horas. Transcurrido el tiempo de polimerización y una vez frío, el producto fue disuelto en 20 ml de cloroformo que se agregó a 100 ml de metanol en agitación vigorosa, se filtró y dejó secar al vacío a 40°C⁵⁷.

2.3.5 Caracterización del polímero

Finalmente el polímero fue caracterizado para conocer su composición química mediante Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) en un espectrofotómetro Nicolet Protegé 460 Magna IR, con pastilla de KBr en modo de transmitancia, en el intervalo espectral de 4000-400 cm⁻¹, promediando 100 barridos y con 40 cm⁻¹ de resolución.

El peso molecular se determinó por viscosimetría capilar, utilizando un viscosímetro Ubbelohde, según Norma ASTM D2857⁵⁸ con cloroformo como solvente a temperatura de 25 °C.

La temperatura de transición vítrea (T_g) fue estimada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un DSC-7 Perkin-Elmer de 20 a 170 °C incrementando 2 °C/min, eliminando el historial térmico.

Se enviaron muestras a la Univesidad del Valle en Cali, Colomiba donde se realizó el análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ¹H y ¹³C en un equipo Bruker con CDCl₃ como solvente y se procesó a 400MHz.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO POR FERMENTACIÓN ANAEROBIA

3.1.1 Curva de crecimiento bacteriano

En la Figura 3.1 se observan las curvas de crecimiento en escala logarítmica según la regresión lineal de la escala de McFarland, cabe mencionar que la medición por este procedimiento considera también las bacterias muertas.

Las cepas *L. lactis* y *Lc. lactis* tienen una fase lag menor de 6 horas, la fase exponencial de *L. lactis* y *Lc. lactis* finaliza hasta las 30 horas, a partir de este tiempo y hasta las 48 horas las mediciones no mostraron cambios en la absorbancia, por lo que se presume que las bacterias se encontraban en la fase estacionaria, Bai *et al.*¹⁹ obtuvieron curvas de crecimiento con fases exponenciales de *L. lactis* de 20 horas en medio MRS y Nancib *et al.*²² reportaron una etapa exponencial para *Lc. lactis* de las 2 a las 12 horas cuando fermenta jugo de dátil, estas variaciones pueden deberse al tipo de sustrato en el que se encuentran los microorganismos y la facilidad para aprovecharlo, en este proyecto las BAL separan la lactosa en galactosa y glucosa para poder llevar a cabo su metabolismo, mientras que en los experimentos reportados los carbohidratos de los medios de fermentación son azúcares simples que entran en la ruta metabólica de manera directa.

En el caso de *L. plantarum* y *L. bulgaricus*, al igual que los anteriores, la fase lag es menor a 6 horas y la fase exponencial se reporta desde el inicio hasta las 30 horas, a partir de este tiempo se observa una fase estacionaria, Brinques *et al.*²⁴ trabajaron con caldo lactosado fermentado por *L. plantarum* presentando la etapa de crecimiento exponencial desde el inicio de la

fermentación hasta las 20 horas, mientras que Welman *et al.*⁵⁰ utilizaron *L. bulgaricus* para fermentar un medio rico en lactosa con el cual obtuvieron un tiempo de fase exponencial de las 8 a las 20 horas, ambos autores realizaron las mediciones de crecimiento durante el proceso de fermentación, el cual lleva agitación constante, las diferencias de 10 horas en la fase exponencial que presentan ambas cepas comparadas con las de la bibliografía se deben a que las curvas de crecimiento en este proyecto se realizaron en tubos de ensayo sin agitación, esto disminuye el contacto de las células con el sustrato y dificulta su aprovechamiento.

L. delbrueckii es la cepa que presenta fase lag de 6 horas, fase exponencial de las 6 a las 18 horas y una fase estacionaria que se observa de las 18 a las 36 horas, comportamiento similar al obtenido por Kadam *et al.*⁴⁶ al trabajar con jugo de caña de azúcar, lo que nos indica que esta cepa tiene mayor actividad metabólica, separa la molécula de lactosa y la aprovecha en menor tiempo para favorecer su crecimiento.

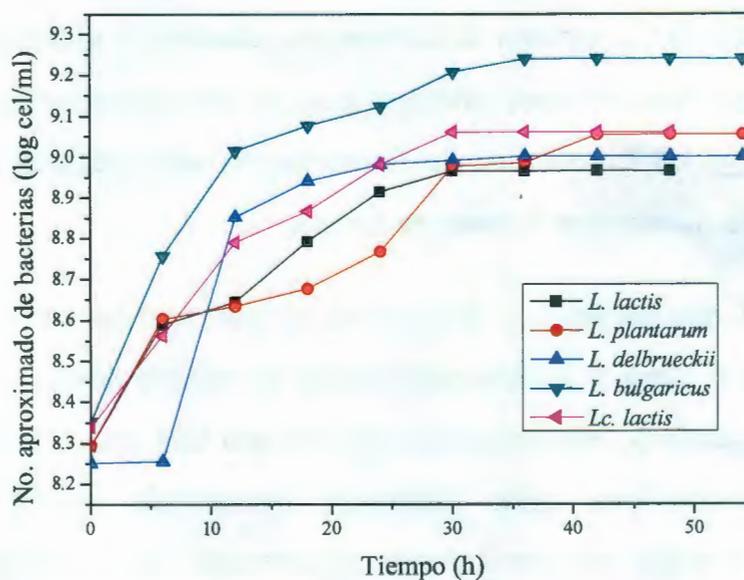


Figura 3.1. Curvas de crecimiento de las BAL

Los productos de las fermentaciones dependen de la fase de crecimiento en que se encuentren los microorganismos⁵⁹, las BAL producen ácido láctico en la fase exponencial de su crecimiento⁶⁰, como se ve en la Figura 3.1 las cinco cepas se encuentran en esta etapa de crecimiento entre las 10 y las 20 horas, es por esta razón que el inóculo es incubado por 14 horas antes de agregarlo al caldo de fermentación.

3.1.2 Consumo de lactosa y producción de ácido láctico

Las BAL *Lc. lactis* y *L. bulgaricus* consumieron la lactosa en 56 y 59 h respectivamente, se prescindió de ambas debido al bajo rendimiento que presentaron, obteniendo 30.29 g/L (rendimiento: 0.55 g ácido láctico/g lactosa) con *Lc. lactis* y 27.91 g/L (rendimiento: 0.52 g/g) con *L. bulgaricus* (Figura 3.2), esta cantidad es similar a la producida por los lactobacilos cuando se trabaja con cultivos mixtos con *S. thermophilus*, como lo hicieron Tanaka *et al.*⁶¹ con rendimiento de 0.68 g/g y Gueguim-Kana *et al.*⁶² con rendimiento de 0.75 g/g, ambos trabajos superan la concentración de ácido láctico producida en este trabajo, según Bozoglu *et al.*⁹ el origen de los cultivos mixtos puede ser un factor importante en cuanto a la capacidad de realizar la fermentación láctica. En el caso del cultivo mixto de *Lc. lactis* aparte de *S. thermophilus* hay que recordar la presencia de *Lc. cremoris* que al pertenecer a la familia de las BAL se podría asumir una mayor producción de ácido láctico, sin embargo, se ha visto que en el caso de utilizar cultivos mixtos en los cuales sólo están presentes BAL, como Nancib *et al.*²², quien trabajó con *Lc. lactis* y *L. casei*, el rendimiento llega a los 0.68 g/g.

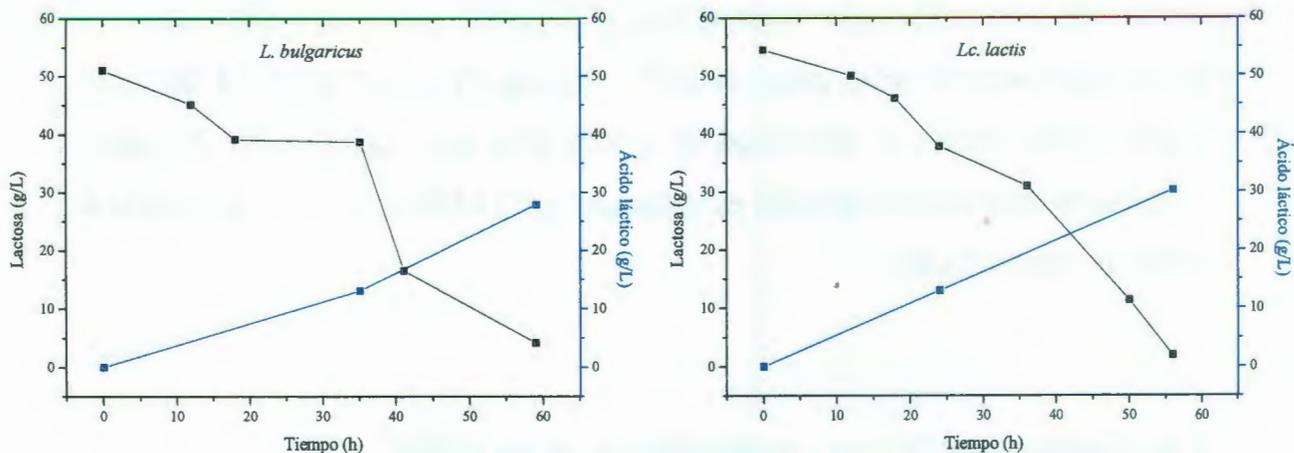


Figura 3.2. Consumo de lactosa y producción de ácido láctico de *L. bulgaricus* y *Lc. lactis*

En la Figura 3.3 se puede observar que el tiempo máximo en el cual *L. plantarum* consume la mayor cantidad de lactosa es de 45 h, con concentración de ácido láctico de 46.03 g/L (rendimiento: 0.94 g/g), un comportamiento similar tiene la cepa *L. delbrueckii* que produjo 50.93 g/L (rendimiento: 0.99 g/g) en 48 h, ambas BAL presentan tiempos de fermentación y una conversión del sustrato similares a las reportadas por Brinques *et al.*²⁴ trabajando con *L. plantarum* y Kadam *et al.*⁴⁶ con *L. delbrueckii*, obteniendo rendimientos de 1.08 g/g y 0.97 g/g, respectivamente, ambos en 48 h, lo que las hizo candidatas notables para la producción del ácido láctico que se separó y concentró del caldo de fermentación.

Mientras que para *L. lactis* el tiempo máximo de consumo de lactosa fue 73 h produciendo un total de 41.01 g/L de ácido láctico (rendimiento: 0.93 g/g), tanto Bai *et al.*¹⁹ con rendimiento de 0.97 g/g, como Lee *et al.*⁴⁵ con rendimiento de 0.70 g/g, realizaron las fermentaciones en 100 h, en cuanto al tiempo de fermentación, la cepa *L. lactis* adquirida, tiene una ventaja sobre las

utilizadas por los autores mencionados, de aproximadamente 24 h menos de conversión de sustrato, sin embargo, al compararla con *L. plantarum* y *L. delbrueckii* nos damos cuenta que no es conveniente utilizar la cepa por que estas últimas son capaces de consumir lactosa y producir ácido láctico en menor tiempo, que al pensar el proceso en escala industrial, disminuye costos de producción.

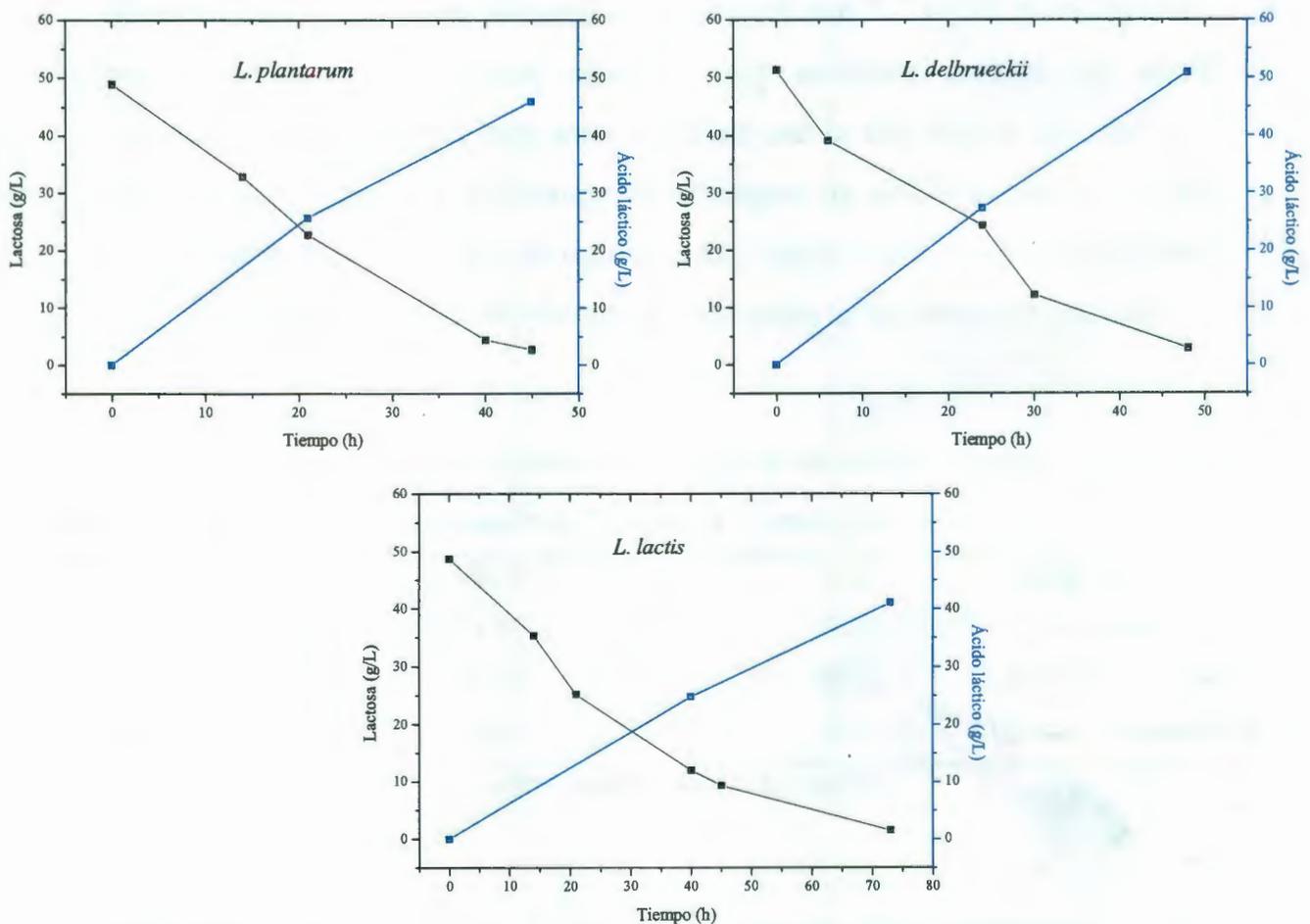


Figura 3.3. Consumo de lactosa y producción de ácido láctico de *L. plantarum*, *L. delbrueckii* y *L. lactis*

Bozoglu *et al.*⁹ y Okano *et al.*⁶³ mencionan que algunas familias de BAL son capaces de producir en mayor concentración un isómero del ácido láctico que el otro, *L. delbrueckii* y *L. lactis* tienen mayor cantidad de subtipos que producen casi en su totalidad ácido L-láctico y ácido D-láctico, respectivamente mientras que las demás BAL empleadas en este trabajo producen mezcla racémica (ácido D,L-láctico), sin embargo, podemos observar en la Tabla 3.1 que la cepa *L. delbrueckii* utilizada es productora de ácido D,L-láctico, mientras que *L. lactis* produce ácido D-láctico, sin embargo, se decidió por el uso de la primera para trabajar en las siguientes fermentaciones debido a su capacidad de conversión que nos indica menores concentraciones de otros ácidos grasos como lo son el acético, propiónico o butírico favoreciendo así la separación y conversión del ácido láctico.

Tabla 3.1. Producción de ácido D- y L- láctico por cepa bacteriana

	<i>L. bulgaricus</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. lactis</i>
D-láctico (g/L)	12.35	15.40	23.87	23.44	33.42
L-láctico (g/L)	15.55	14.89	22.11	27.49	7.60
Concentración (g/L)	27.90	30.29	45.98	50.93	41.02
Rendimiento (gAL/gL)	0.52	0.55	0.94	0.99	0.93

Donde: AL =ácido láctico; L=lactosa.

Las fermentaciones realizadas en paralelo con *L. delbrueckii* utilizando leche NIDO[®] y suero de leche Lattia[®] obtuvieron el mismo rendimiento de 0.99 g/g; en trabajos previos que han utilizado suero de leche como medio de fermentación como el de Roy *et al.*⁵¹ y Tango *et al.*¹⁸ tuvieron rendimientos

de 0.94 y 0.96 g/g, respectivamente, en el presente trabajo se superaron estos valores. Las siguientes fermentaciones debían ser con suero, sin embargo, debido a la presencia de proteínas y sólidos disueltos que no se separaron previos a la fermentación, como lo hizo Li *et al.*⁴ mediante una hidrólisis de las proteínas y una ultrafiltración, el proceso de separación y concentración se vio afectado, estos pasos se omitieron debido a que a escala industrial se verían reducidos los costos, pero para poder definir si esto es prescindible se necesitan más estudios.

3.2 SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

La separación del ácido láctico se logró mediante las membranas de microfiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, incrementando en cada paso la concentración final del mismo (Tabla 3.2), en el proceso de microfiltración se eliminaron partículas de tamaño mayor a 0.22 μm , produciendo un aclaramiento del caldo de fermentación (Figura 3.4.a), cuando el permeado pasa por la membrana de nanofiltración el permeado continúa con el color amarillo (Figura 3.4.b) pero se observa más traslúcido, Milcent *et al.*⁶⁴ trabajaron con microfiltración utilizando un diámetro de poro de 0.1 μm y lograron la completa retención de microorganismos, aclarando de esta manera el caldo de fermentación. La coloración amarilla disminuye casi totalmente cuando se utiliza la membrana para ósmosis inversa (Figura 3.4.c), en la cual el ácido láctico permanece en el remanente, mientras que las sales son eliminadas en el permeado, este producto final tuvo una consistencia aceitosa.



Figura 3.4. Matraz con fermentado de leche NIDO®; permeados de Microfiltración (a), Nanofiltración (b) y remanente de Ósmosis Inversa (c)

A partir de la NF se comenzó a concentrar el ácido láctico, que incrementó de 51.15 g/L a 65.35 g/L, como se observa en la Tabla 3.2, Li *et al.*⁶⁵ reportan el aumento de concentración de ácido láctico de 54 a 70 g/L a partir de una filtración con membrana U01-Lab con MWCO de 200 Da, mientras que en el presente trabajo fue de 250 Da, lo que nos indica que esa diferencia en el tamaño de poro de membrana es de importancia para lograr mayores concentraciones del ácido.

El rendimiento de la membrana se calculó en base al flujo de permeado (FP) utilizando la siguiente ecuación:

$$FP = \frac{\text{volumen del permeado}}{\text{área de membrana} \times \text{tiempo}} (\text{Lm}^{-2}\text{h}^{-1})$$

Para la membrana de NF el volumen de permeado manejado fue de 10 ml, cantidad que se almacenó para preservar el ácido láctico, el tiempo en el que se recolectaron los 10 ml fue de 5 horas, lo que nos dio un FP de 0.06 Lm⁻²h⁻¹. En 7 días se recuperaron 100 ml de permeado, los cuales fueron empleados

para realizar la concentración de ácido láctico por ósmosis inversa. El FP puede incrementarse, sin que se vea afectada la recuperación y concentración del ácido láctico, utilizando un diseño que aumente el área de membrana y aplicando presión, como lo presentan Jeantet *et al.*⁶⁶ trabajando con un diseño en espiral con presión de 4.0-6.0 MPa en el cual alcanza un FP de $20 \text{ Lm}^{-2}\text{h}^{-1}$, mientras que Li *et al.*⁶⁵ utilizan un área de membrana de 140 cm^2 en un módulo de flujo cruzado a presiones de 7.0 MPa obteniendo FP de $37 \text{ Lm}^{-2}\text{h}^{-1}$, en ambos casos no se afecta la separación del ácido láctico y el tiempo de recuperación es menor al reportado en este trabajo.

En el proceso de NF no se filtró el volumen total del caldo de fermentación debido a la lentitud del proceso y lo pronto que se tenía que cambiar la membrana por que se tapaban los poros, se observó que después de 5 lavados la membrana comenzaba a presentar fallas de rompimiento por la obstrucción de los poros.

Para lograr una mayor concentración de ácido láctico se empleó una membrana de ósmosis inversa, alcanzando 81 g/L de ácido láctico, Li *et al.*⁶⁵ lograron una recuperación completa de ácido láctico utilizando membranas de OI de GE Osmonics trabajando con una presión de 5.5 MPa.

El proceso de OI resultó mucho más lento que el de NF, se redujo el volumen de proceso a 50 ml, obteniendo un volumen final de 40 ml de todo el proceso y con lo que se trabajó para la polimerización; el ácido láctico concentrado se obtuvo después de 6 días de proceso. Como se mencionó anteriormente, estos rendimientos se pueden mejorar con el diseño de la celda de flujo cruzado aumentando el área de membrana y aplicando presión.

Tabla 3.2. Concentración de ácido láctico a través de los procesos de filtración.

	Filtración		
	MF	NF	OI
Ácido D-láctico (g/L)	23.34	31.15	38.23
Ácido L-láctico (g/L)	27.81	34.20	42.72
Ácido láctico (g/L)	51.15	65.35	80.95

Donde: MF=microfiltración; NF=nanofiltración; OI=ósmosis inversa

3.3 POLIMERIZACIÓN POR APERTURA DE ANILLO

La oligomerización del ácido láctico obtenido por fermentación de *L. delbrueckii* se realizó mediante condensación directa aplicando vacío y temperatura como se menciona en el capítulo 2, durante la reacción de polimerización por etapas se elimina una molécula de agua (H₂O) por cada molécula de ácido láctico, dímero, trímero o molécula de mayor tamaño que reacciona con otra molécula similar, es decir que 18 g/mol son eliminados por destilación en cada una de estas reacciones, el peso molecular del ácido láctico deja de ser 90 y la masa neta producida se normalizó mediante (90-18)/90=0.8, el rendimiento del oligómero es entonces:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{g producto}}{\text{g reactivo} \times 0.8} \times 100$$

El rendimiento alcanzado fue de 51.44 %, obteniéndose un oligómero (Figura 3.5) blanco, higroscópico y dúctil.

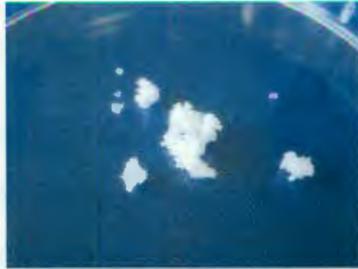


Figura 3.5. Oligómero de ácido láctico

A partir del oligómero se sintetizaron los cristales de lacturo (Figura 3.6) utilizando como catalizador $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a temperatura de $220\text{ }^\circ\text{C}$ y vacío de 60 torr, obteniéndose 1.8 g de meso lacturo, este tipo de anillo tiene la conformación estructural que le proporciona la unión de una molécula de ácido D-láctico y otra de L-láctico; a partir de estos cristales se produjo 1 g de PDLLA (Figura 3.7).

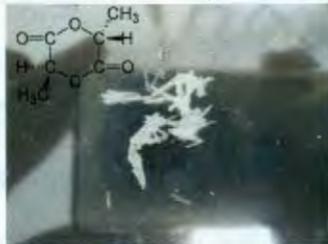


Figura 3.6. Cristales de D,L-lacturo



Figura 3.7. Ácido poli(D,L-láctico)

3.3.1 Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier

Del proceso de purificación del ácido láctico con tolueno, se tomó una gota que se aplicó a una pastilla de KBr para poder realizar la FTIR (Figura 3.8), donde podemos observar la tensión del enlace -OH en el número de onda 3469 cm^{-1} , las vibraciones de tensión del enlace -C=O en 1741 cm^{-1} y del enlace -C-O^- en 1392 cm^{-1} , la vibración de tensión asimétrica del enlace -COO^- en 1593 cm^{-1} , así como la deformación de los enlaces -OH en 1217 cm^{-1} , también podemos observar la tensión de los enlaces -C-H y -CH_3 presentes en la molécula en el número de onda en 3000 cm^{-1} y la deformación asimétrica del grupo metilo en 1452 cm^{-1} ; en comparación con el espectro obtenido del oligómero sintetizado a partir de este ácido láctico se puede observar la aparición del enlace -C-O-C- caracterizado por la señal en el número de onda 1174 cm^{-1} , lo cual demuestra que el ácido láctico se polimeriza mediante reacciones de condensación directa para formar un poliéster, así como la desaparición del enlace -C-O^- en 1392 cm^{-1} que estaba presente en el ácido láctico. Achmad *et al.*⁵ realizaron la comparación de los enlaces presentes en el FTIR del ácido láctico y del polímero que sintetizaron por medio de reacciones de condensación directa, así como se sintetizó el oligómero en este trabajo, identificando el enlace éster del PLA que no está presente en el ácido.

En el caso del ácido poli(D,L-láctico) formado a partir de lacturo el espectro FTIR muestra claramente la tensión asimétrica del enlace poliéster formado en el número de onda 1182 cm^{-1} y la deformación del enlace -C-O en 1091 cm^{-1} . Un condensado de las bandas presentes en el PLA se observa en la Tabla 3.3.

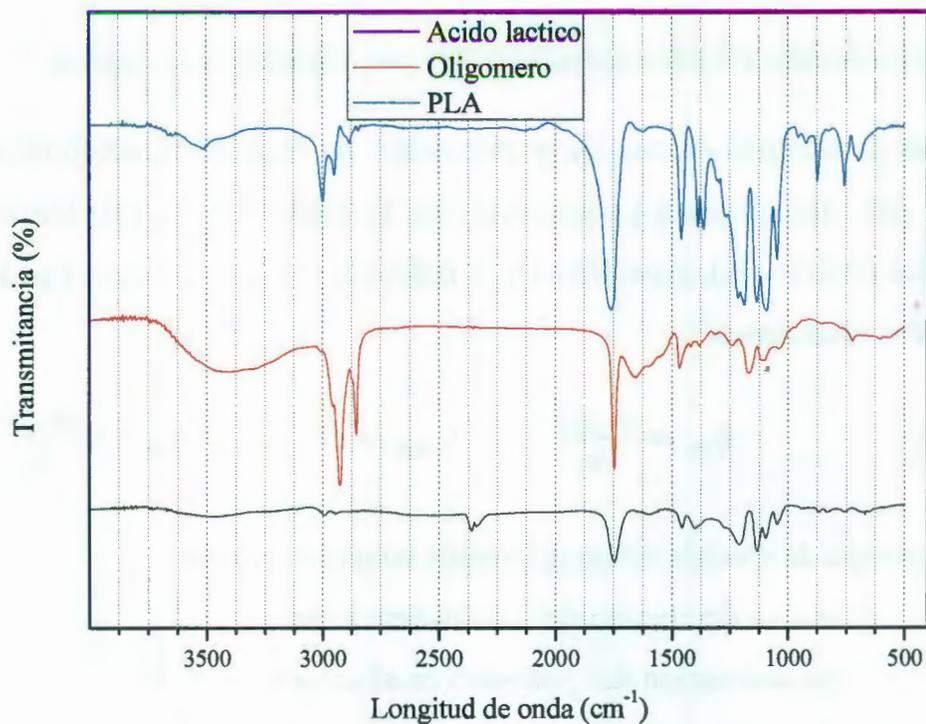


Figura 3.8 Espectros FTIR del ácido láctico obtenido por fermentación con *L. delbrueckii* y PLA sintetizado

Tabla 3.3. Bandas presentes en los espectros FTIR de PLA

Banda	Numero de onda (cm⁻¹)
Tensión del enlace OH	3510
Tensión del grupo CH	3000
Tensión del grupo CH ₃	2942
Tensión del enlace carbonilo C=O	1757
Deformación asimétrica del enlace CH ₃	1460-1361
Tensión asimétrica del enlace C-O-C	1182
Deformación del enlace C-O	1091
Enlace C-CH ₃	1041
Tensión del enlace C-C-O fase amorfa	870

3.3.2 Determinación del peso molecular M_v por viscosimetría capilar

Los valores de tiempos de elución y viscosidad de la determinación de peso molecular por viscosimetría se presentan en la Tabla 3.4, se calcularon las viscosidades relativa (η_r), específica (η_{sp}), reducida (η_{red}) e inherente (η_{inh}) con las siguientes ecuaciones⁵⁸:

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad \eta_{sp} = \frac{(t-t_0)}{t_0} \quad \eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad \eta_{inh} = \frac{(\ln \eta_r)}{c}$$

Donde: t=tiempo de elución de las diferentes concentraciones

t_0 =tiempo de elución del cloroformo puro

c= concentración del polímero en el solvente

Tabla 3.4. Valores de tiempo y viscosidad de las diluciones de PLA en cloroformo

Concentración [g/ml]	Tiempo [s]	η_r [-]	η_{sp} [-]	η_{red} [ml/g]	η_{inh} [ml/g]
0.007	103.27	1.27	0.27	38.90	34.40
0.006	100.25	1.24	0.24	39.17	35.18
0.0045	94.69	1.17	0.17	37.01	34.24
0.0037	91.36	1.13	0.13	34.03	32.06

Los valores de η_{red} y η_{inh} se graficaron y linearizaron (Figura 3.9) para calcular la viscosidad intrínseca $[\eta]$ cuando la concentración es nula, es decir, el punto donde ambas líneas coinciden en el eje de las abscisas. En la Figura 3.9 se observa que no existe un cruzamiento entre las rectas obtenidas cuando la concentración es nula, sin embargo, existe una tendencia perpendicular entre ambas y una proximidad de 0.753 cuando tocan el eje de las abscisas, por lo que se calcula el promedio entre ambas pendientes, la viscosidad intrínseca

calculada es de 30.028, las constantes de Mark-Howink K y a utilizadas son 0.0549 y 0.639 respectivamente, valores encontrados por Stolt *et al.*⁶⁷ al estudiar el PLA para aplicaciones en caliente para empaques, a partir de este valor se calculó el peso molecular mediante la ecuación:

$$[\eta] = KM^a$$

Obteniendo M_v de 19,264.07 g/mol, este valor se considera como bajo peso molecular, ya que para tener propiedades mecánicas considerables, se necesita alcanzar al menos 35,000 g/mol, como lo menciona Bastioli³⁵, la presencia de impurezas que no se lograron eliminar por medio del proceso de condensación con OI, el agua absorbida durante un mal proceso de secado o antes de la polimerización, y la que puede contener el catalizador originalmente, pueden afectar la polimerización del lacturo provocando una degradación del polímero e interferencias durante la reacción de apertura de anillo evitando que el peso molecular del PLA pueda incrementarse, como lo han demostrado Brás *et al.*⁶⁸, y Kimura *et al.*⁶⁹, entre otros, la molécula del agua produce la hidrólisis del poliéster provocando rupturas de enlaces en las cadenas, por lo que el peso molecular se ve afectado.

Por otro lado, trabajar con una mezcla de isómeros provoca impedimentos estéricos entre moléculas al intentar reaccionar con una conformación estructural opuesta una a la otra, lo que complica el crecimiento de la cadena polimérica y por lo tanto el peso molecular, en trabajos realizados por Dorgan *et al.*³², Martino *et al.*³³ y Zhao *et al.*⁷⁰ quienes trabajan con una solución líquida de meso lacturo para sintetizar PDLLA han reportado pesos moleculares que van de 1000 a 64000 g/mol para utilizarlo en liberación controlada de fármacos o como plastificante al añadirlo en la síntesis de otros polímeros.

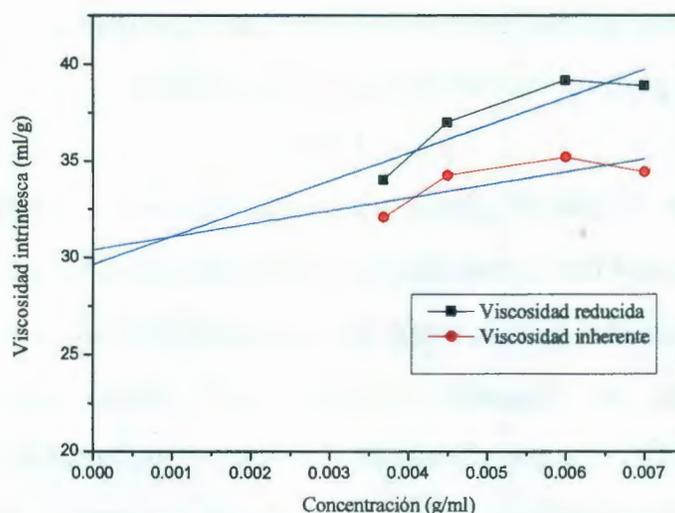


Figura 3.9. Linealización de la viscosidad reducida e inherente para el PDLA sintetizado, solvente: cloroformo a 25 °C

3.3.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La temperatura de transición vítrea T_g del PDLA, obtenido en este trabajo por apertura de anillo, es de 54.34 °C, en la Figura 3.10 podemos ver que en el intervalo de 50 a 58 °C se encuentra la fase endotérmica que presenta el polímero al acercarse a su T_g y pasar de la misma, después de esto no ocurren cambios en el material que indiquen otra transición del material, de manera que podemos afirmar que el PDLA sintetizado es un polímero amorfo de bajo peso molecular.

Se han reportado T_g de PDLA de bajo peso molecular por Stolt *et al.*⁶⁷ quienes reportaron un peso molecular en número M_n de 3500 g/mol con T_g de 22 °C, mientras que Zhao *et al.*⁷⁰ obtuvieron un PDLA con M_v de 4100 g/mol y T_g de 48.17 °C, cuando el peso molecular del PLA alcanza los 33 000

g/mol la T_g reportada por Kim *et al.*⁷¹ fue de 59 °C, la temperatura de transición vítrea aumenta conforme aumenta el peso molecular, la alcanzada en este trabajo se encuentra en valores intermedios a los mencionados, que corresponde a lo esperado con respecto a su peso molecular.

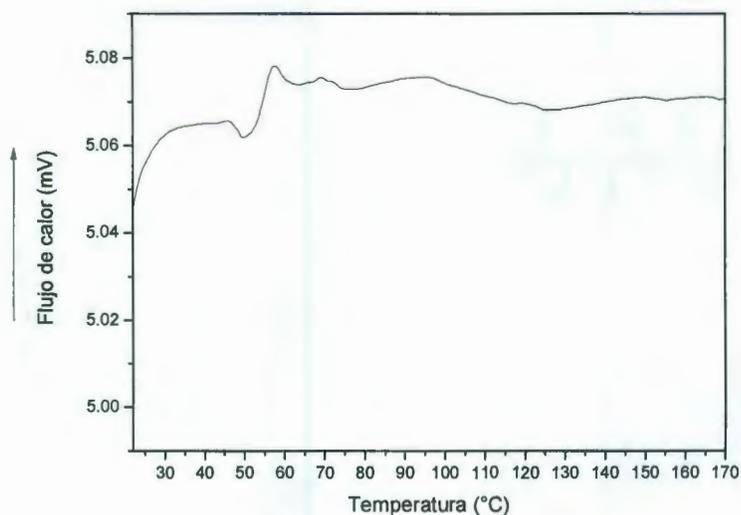


Figura 3.10. Curva de DSC de PDLLA sintetizado, calentado de 20 a 170 °C a 2°C/min

3.3.4 Resonancia Magnética Nuclear (NMR) ^{13}C y ^1H

En el espectro ^{13}C -NMR de la Figura 3.11 podemos corroborar la estructura química del PDLLA, donde las señales a $\delta = 16.6$, 69.1, 169.6 y 175.1 ppm corresponden a los grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}-$, $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ y $-\text{COOH}$, señales similares a las que obtuvieron Chen *et al.*⁴⁰ al caracterizar la estructura química del PLLA cuando es polimerizado por condensación directa con butóxido de titanio IV como catalizador, el cual provoca reacciones de

racemización en el ácido L-láctico y se obtienen señales del polímero cercanas a un PDLLA, por otro lado, las señales concuerdan con las obtenidas por Lei *et al.*⁷² quienes realizaron el análisis cualitativo de la estructura química del PDLLA mediante esta técnica para confirmar los resultados obtenidos por FTIR y ¹H-NMR.

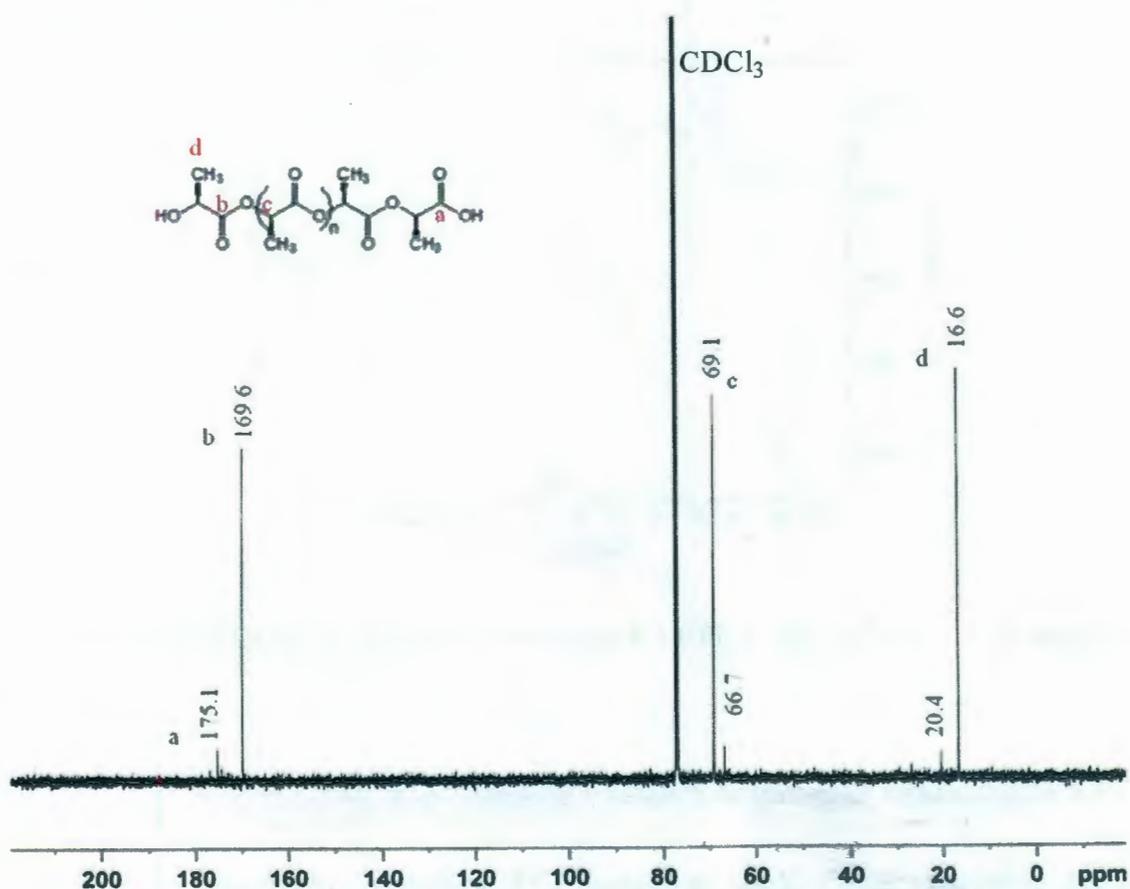


Figura 3.11. Espectro ¹³C-NMR de PDLLA

Las señales del espectro ¹H-NMR que observamos en la Figura 3.12 donde se observa el doblete de 1.569 a 1.617 ppm corresponden a los hidrógenos del grupo -CH₃ del cuerpo del polímero, las señales en 1.49 ppm son de metilos terminales, mientras que el cuartete observado a 5.20 ppm es característica de

los hidrógenos presentes en el $-\text{CH}-$ del polímero, las señales en 4.35 a 4.38 son de los $-\text{CH}-$ terminales, los hidrógenos del grupo hidroxilo correspondientes a los extremos de las cadenas poliméricas se observan con el singulete a 3.89 ppm. Estas señales se encuentran muy cercanas a las reportadas por Lei *et al.*⁷² y Konishi *et al.*⁷³ quienes trabajaron con PDLLA, en el primer caso realizaron una policondensación con catalizador de cloruro de estaño; mientras que el grupo de Konishi trabajó con platos metálicos para observar el comportamiento de la racemización provocada por los mismos determinando la diferencia de las señales entre PLLA y PDLLA, los últimos coinciden con los de la Figura 3.12.

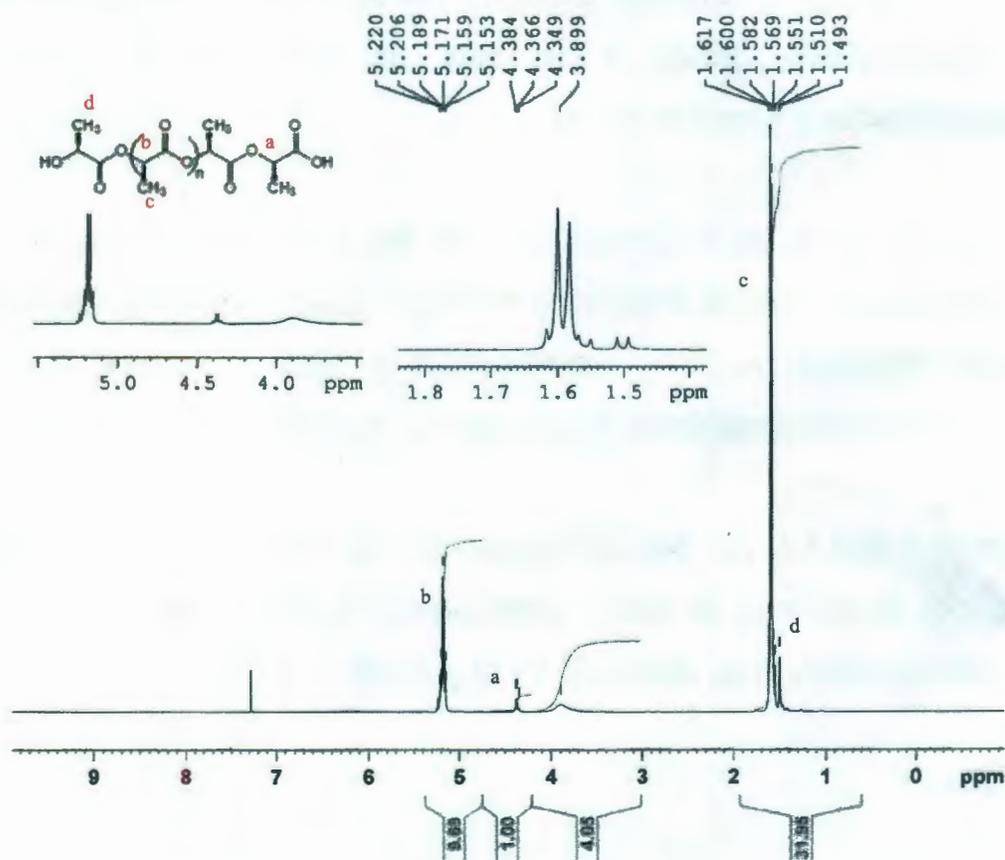


Figura 3.12. Espectro ¹H-NMR de PDLLA

CONCLUSIONES

Se produjo ácido D,L-láctico mediante la fermentación de leche NIDO® utilizando la cepa *L. delbrueckii* obteniendo rendimientos de 0.99 g/g con sistema Batch en 48 h, seleccionada de un total de 5 cepas, de las cuales se obtuvieron rendimientos de la mitad de ácido láctico y tiempos de producción de casi 72 h.

La producción de ácido láctico utilizando como sustrato el suero de leche fue de 0.99 g/g, mismo rendimiento alcanzado con leche NIDO®, su posterior uso fue imposibilitado debido a la falta de pretratamiento, como la desproteinización y filtración previa.

La concentración de ácido láctico alcanzada fue de 80.95 g/L, del cual 38.23 g/L corresponden al ácido D-láctico y 42.72 g/L al ácido L-láctico, después de separarlo mediante micro y nanofiltración y ósmosis inversa, logrando también un producto translúcido de consistencia aceitosa.

Se sintetizó PDLLA con peso molecular M_v de 19,264.07 g/mol mediante reacciones de apertura de anillo, corroborando en la estructura química la presencia del enlace éster utilizando FTIR y NMR ^{13}C y ^1H .

PERSPECTIVAS

La síntesis del PAL a partir del ácido láctico recuperado del caldo de fermentación se realizó de manera satisfactoria en el presente trabajo, algunas recomendaciones que se pueden realizar para mejorar rendimientos y productividad son:

- Llevar a cabo la fermentación en sistema continuo o semicontinuo para incrementar la productividad de ácido láctico.
- Emplear suero de leche previamente desproteínizado, de esta manera el proceso de concentración del ácido no se verá afectado y así emplear un residuo industrial.
- Mejorar el diseño de la celda de filtración aumentando el área de membrana y aplicando no sólo vacío sino también presión, para separar y concentrar en menor tiempo el ácido láctico.
- Lograr un mejor almacenamiento de vacío en el sistema de polimerización para aumentar el rendimiento y peso molecular del polímero.

BIBLIOGRAFÍA

1. J. M. Onyari;F. Mulaa;J. Muia, Biodegradability of poly(lactic acid), preparation and characterization of PLA/Gum Arabic blends, *J. Polym. Environ*, 16, 205 - 212, 2008.
2. A. K. Mohanty;M. Misra;L. T. Drzal, *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, Florida, 2005; p 875.
3. M. Pelczar;L. Reid;K. Chan, *Microbiology*, United States of America 1977; p 952.
4. Y. Li;A. Shahbazi, Lactic acid recovery from cheese whey fermentation broth using combined ultrafiltration and nanofiltration membranes, *Appl. Biochem. Biotech.* , 6, 129-132, 2006.
5. F. Achmad;K. Yamane;S. Quan;T. Kokugan, Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators, *Chem. Eng. J.*, 151, 342 - 350, 2009.
6. C. Akerberg;K. Hofvendahl;G. Zacchi;B. Hahn-Hagerdal, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 682, 1998.
7. K. Hofvendahl;B. Hahn-Hagerdal, *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 87, 2000.
8. R. Datta;M. Henry, Review. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81, 1119-1129, 2006.
9. T. F. Bozoglu;B. Ray, *Lactic acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and applications*, Springer, New York, 1996; Vol. 98, p 403.
10. C. R. Soccol;V. I. Sotonga;M. Raimbault, Production of L-lactic acid by *Rhizopus* species., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 433-435, 1994.
11. T. Morrison;R. Boyd, *Química orgánica*, 4 ed.; Addison-Wesley Iberoamericana, 1996.
12. J. Vijayakumar;R. Aravindan;T. Viruthagiric, Recent trends in the production, purification and application of lactic acid, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 22, 245-264, 2008.
13. D. L. Nelson;M. M. Cox, *Lehninger Principles of biochemistry*, New York, USA, 2000.
14. B. D. Davis;R. Dulbecco;H. N. Eisen;H. S. Ginsberg;W. B. Wood;M. McCarty, *Tratado de microbiología*, Salvat editores, S. A., Barcelona, España, 1978; p 1559.
15. K. Todar Online Textbook of Bacteriology. (accessed 14 de abril de 2010).
16. M. Cocaigne-Busquet;S. Even;N. D. Lindley;L. P., Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis*: genetic regulation and enzyme control over pathway flux, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 24-32, 2002.
17. J. P. Guyot;M. Calderon;J. Morlon-Guyot, Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, *J. Appl. Microbiol.*, 88, 176-182, 2000.
18. M. S. A. Tango;A. E. Ghaly, A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 712-720, 2002.
19. D. M. Bai;Q. Wei;Z. H. Yan;X. M. Zhao;X. G. Li;S. M. Xu, Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid, *Biotech. Lett.*, 25, 1833-1835, 2003.

20. X. Shen;L. Xia, Lactic acid production from cellulosic waste by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 1109-1114, 2006.
21. K. Lee, Enhanced production of lactic acid by an adapted strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1317-1320, 2007.
22. A. Nancib;S. Nancib;J. Boudrant, Production of lactic acid from date juice extract with free cells of single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 1423-1429, 2009.
23. M. Ghasemi;G. Najafpour;M. Rahimnejad;P. A. Beigi;M. Sedighi;B. Hashemiyeh, Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*, *Afr. J. Biotechnol.*, **8** (1), 81-84, 2009.
24. G. B. Brinques;M. C. Peralba;M. A. Záchia, Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 205-212, 2010.
25. S. A. Ataei;E. Vashegani-Farahani, In situ separation of lactic acid from fermentation broth using ion exchange resins, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1229-1233, 2008.
26. K. W. Böddeker, *Membrane filtration*, Springer, Berlin, 2008; p 63-80.
27. J. Li;H. A. Chase, Applications of membrane techniques for purification of natural products, *Biotechnol. Lett.*, **32**, 601-608, 2010.
28. Y. S. Negi;T. Maharana;B. Mohanty, Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability, *Progress in Polymer Science*, **34**, 99-124, 2009.
29. J. Lunt, Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers, *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 145- 152, 1998.
30. G. Odian, *Principles of polymerization*, 4 ed.; Editorial Wiley-Interscience, Estados Unidos, 2004.
31. L. Lim;R. Auras;M. Rubino., Processing technologies for poly(lactic acid), *Progress in Polymer Science*, **33** (8), 820-852, 2008.
32. J. Dorgan;H. Lehermeier;M. Mang, Thermal and rheological properties of comercial-grade poly(lactic acid)s, *J. Pol. Env.*, **8** (1-9), 2000.
33. V. P. Martino;R. A. Ruseckaite;A. Jiménez, Thermal and mechanical characterization of plasticized poly (L-lactide-co-D,L-lactide) films for food packaging, *J. Therm. Anal. C.*, **86**, 702-712, 2006.
34. J. R. Sarasua;A. López-Arraiza;P. Balerdi;I. Maiza, Crystallization and thermal behaviour of optically pure polylactides and their blends, *J. of Mat. Sci.*, **40**, 1855-1862, 2005.
35. C. Bastioli, *Handbook of Biodegradable Polymers*, Rapra Technology Limited, Reino Unido, 2005; p 291-293.
36. F. Albán;L. Serna;A. Rodriguez, Ácido poliláctico (PLA): propiedades y aplicaciones, *Ingeniería y competitividad*, **5**, 16-26, 2003.
37. M. Flieger;M. Kantorová;A. Prell;T. Rezanka;J. Votruba, Biodegradable plastics from renewable sources. Review, *Folia Microbiol.*, **48**, 27-44, 2003.
38. S. Hyon;K. Jamshidi;Y. Ikada., Synthesis of polylactides with different molecular weights, *Biomaterials*, **18**, 1503-1508, 1997.

39. S. I. Moon;Y. Kimura, Melt polycondensation of L-lactic acid to poly(L-lactic acid) with Sn(II) catalysts combined with various metal alkoxides, *Polym. Int.*, *52*, 299-306, 2003.
40. G. X. Chen;H. S. Kim;E. S. Kim;J. S. Yoon, Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactic acid) through the direct condensation polymerization of L-lactic acid in bulk state, *Eur. Polym J.*, *42*, 468-476, 2006.
41. D. Garlotta, A literature review of poly(lactic acid), *J. Pol. Env.*, *9*, 63-84, 2001.
42. W. Carothers;G. Dorough;J. V. Natta., Studies of polymerization and ring formation: The reversible polymerization of six-membered cyclic esters, *J. Am. Chem. Soc.*, *761-762*, 1932.
43. D. Yoo;D. Kim;D.Sung, Synthesis of lactide from oligomeric PLA: Effects of temperature, pressure, and catalyst, *Macromolecular Research*, *14*, 510-516, 2006.
44. O. Dechy-Cabaret;B. Martin-Vaca;D. Bourissou, Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide, *Chem. Rev.*, *104* (12), 6147-6176, 2004.
45. C. W. Lee, Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice, *Fibers and Polymers*, *8* (6), 571-578, 2007.
46. S. R. Kadam;S. S. Patil;K. B. Bastawde;J. M. Khire;D. V. Gokhale, Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production, *Process Biochem.*, *41*, 120-126, 2006.
47. H. Oh;Y. J. Wee;J. S. Yun;H. W. Ryu, Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor, *Appl. Biochem. Biotech.*, *105*, 603-613, 2003.
48. K. Okano;Q. Zhang;S. Yoshida;T. Tanaka;C. Ogino;H. Fukuda;A. Kondo, D-lactic acid production from cellooligosaccharides and β -glucan using L-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *85*, 643-650, 2010.
49. B. P. Calabria;Y. Tokiwa, Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*, *Biotechnol. Lett.*, *29*, 1329-1332, 2007.
50. A. D. Welman;I. S. Maddox, Fermentation performance of an exopolysaccharide-producing strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, *30*, 661-668, 2003.
51. D. Roy;J. Goulet;A. LeDuy, Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *24*, 206-213, 1996.
52. G. L. Miller, Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, *31*, 426-428, 1959.
53. D. S. Joshi;M. S. Singhvi;J. M. Khire;D. V. Gokhale, Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production, *Biotechnol. Lett.*, *32*, 517-520, 2010.
54. N. D. Roble;J. C. Ogbonna;H. Tanaka, L-Lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*), *Biotech. Letters*, *25*, 1093-1098, 2003.
55. B. Durhan;A. Walton, Membrane pretreatment of reverse osmosis: long-term experience on difficult waters, *Desalination*, *122*, 157-170, 1999.

56. D. Fuentes;M. Díazgranados;J. Perilla, Método para la obtención de lacturo de alta pureza a partir de la depolimerización de poli(ácido láctico), *Revista Colombiana de Química*, 35, 115-123, 2006.
57. J. P. Correa;J. Betancourt., Síntesis y caracterización de ácido poli(L-láctico) y su aplicación en dispositivos de fijación ósea, Universidad del Valle, Cali, 2010.
58. ASTM, D 2857, Standard Practice for dilute solution Viscosity of Polymers, 2001.
59. T. D. Brock, *Biology of microorganisms*, 3 ed.; United States of America, 1979; p 479.
60. T. F. Bozoglu;B. Ray, *Lactic acid bacteria: current advances in metabolism, genetics and applications.*, New York, 1996; Vol. 98, p 403.
61. K. Tanaka;A. Komiyama;K. Sonomoto;A. Ishizaki;S. J. Hall;P. F. Stanbury, Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 160-167, 2002.
62. E. B. Gueguim-Kana;J. K. Oloke;a. Lateef;M. G. Zebaze-Kana, Novel optimal temperature profile for acidification process of *Lactobacillus bulgaricus* and *streptococcus thermophilus* in yoghurt fermentation using artificial neural network and genetic algorithm, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 491-496, 2007.
63. K. Okano;T. Tanaka;C. Ogino;H. Fukuda;A. Kondo, Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 413-423, 2010.
64. S. Milcent;H. Carrere, Clarification of lactic acid fermentation broths, *Sep. Purif. technol.*, 22, 393-401, 2001.
65. Y. Li;A. Shahbazi;K. Williams;C. Wan, Separate and concentrate lactic acid using combination of nanofiltration and reverse osmosis membranes, *Appl. Biochem. Biotech.*, 147, 1-9, 2007.
66. R. Jeantet;J. L. Malubois;P. Boyaval, Semi continuous production of lactic acid in a bioreactor coupled with nanofiltration membranes, *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 614-619, 1996.
67. M. Stolt;M. Viljanmaa;A. Södergard;P. Törmälä, Blends of Poly(ϵ -caprolactone-b-lactic acid) and Poly(lactic acid) for hot-melt applications, *J. of Appl. Polym. Science*, 91, 196-204, 2003.
68. A. R. Brás;M. T. Viciosa;M. Dionísio;J. F. Mano, Water effect in the thermal and molecular dynamics behavior of poly(L-lactic acid), *J. Therm. Anal. C.*, 88, 425-429, 2007.
69. T. Kimura;N. Ihara;Y. Ishida;Y. Saito;N. Shimizu, Hydrolysis characteristics of biodegradable plastic (poly-lactic acid), *J. Japan. Soc. Food Sci. Technol.*, 49, 598-604, 2002.
70. Y. Zhao;Z. Wang;J. Wang;H. Mai;B. Yan;F. Yang, Direct Synthesis of poly(D,L-lactic acid) by melt polycondensation and its application in drug delivery, *J. Appl. Polymer Science.*, 91, 2143-2150, 2004.
71. K. W. Kim;S. I. Woo, Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactic acid) by direct polycondensation, *Macromol. Chem. Phys.*, 203, 2245-2250, 2002.

72. Z. Q. Lei;S. F. Wang;Y. B. Bai, Synthesis of high-molecular-weight poly(lactic acid) from aqueous lactic acid cocatalyzed by ϵ -caprolactam and tin(II) chloride dihydrate, *J. Appl. Polymer Science.*, 105, 3597–3601, 2007.

73. S. Konishi;T. Yokoi;B. Ochiai;T. Endo, Effect of metal triflates on direct polycondensation of lactic acid, *Polym. Bull.*, 64, 435–443, 2010.

ANEXO A

ESCALA DE Mc FARLAND

La utilidad de la escala es poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, generalmente se suele usar el 0,5 Mc Farland, que corresponde a aproximadamente 1.5×10^9 bacterias.

La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Se crean 10 estándares (en la Tabla B.1 aparece la composición de estos) y por espectrofotometría, se hace una curva patrón, de forma que se puede detectar la concentración de las diluciones bacterianas. La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico.

Tabla B.1. Escala de McFarland empleada en el laboratorio.

Tubo	BaCl2	H2SO4	Absorbancia	No. Aprox de bacterias
1	0.1	9.9	0.244	3.00E+08
2	0.2	9.8	0.436	6.00E+08
3	0.3	9.7	0.544	9.00E+08
4	0.4	9.6	0.826	1.20E+09
5	0.5	9.5	1.001	1.50E+09
6	0.6	9.4	1.165	1.80E+09
7	0.7	9.3	1.338	2.10E+09
8	0.8	9.2	1.428	2.40E+09
9	0.9	9.1	1.507	2.70E+09
10	1.0	9.0	1.627	3.00E+09

ANEXO B

MÉTODO UV PARA DETERMINAR ÁCIDO D- Y L- LÁCTICO

BOEHRINGER MANNHEIM/R-BIOPHARM

Contenido

Botella 1. Solución buffer de glicina (pH~10) 30 ml y ácido L- glutámico 440 mg.

Botella 2. NAD liofilizado 210 mg

Botella 3. Glutamato-piruvato transaminasa (GPT) 0.7 ml aprox 1100 U

Botella 4. Solución D-lactato deshidrogenasa (D-LDH) 0.7 ml aprox 3800 U

Botella 5. Solución L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) 0.7 ml aprox 3800 U

Botella 6. Control de D-lactato. Usarlo sin dilución.

Botella 7. Control de L-lactato. Usarlo sin dilución

Procedimiento

Longitud de onda: 340 nm, Hg 365 nm ó Hg 334 nm

Celda: 1 cm de longitud

Temperatura: 20-25 °C

Volumen final: 2.240 ml (ác. D-láctico)

2.260 ml (ác. L-láctico)

Solución muestra: 0.3-35 µg D- y L-láctico/ensayo (en 0.1-1 ml del volumen de la muestra)

En celda	Blanco	Muestra
Solución 1	1.000 ml	1.000 ml
Solución 2	0.200 ml	0.200 ml
Suspensión 3	0.020 ml	0.020 ml
Solución muestra*	-	0.100 ml
Agua bidestilada	1.000 ml	0.900 ml
Mezclar** y leer absorbancia (A_1) en aprox 5 minutos después de terminada la adición. Empezar la reacción con la adición de:		
Solución 4	0.020 ml	0.020 ml
Mezclar**, después de la completa reacción (aprox 30 min) leer absorbancia (A_2) inmediatamente, blanco y muestra. Añadir:		
Solución 5	0.020 ml	0.020 ml
Mezclar**, después de la completa reacción (aprox 30 min) leer absorbancia (A_3) inmediatamente, blanco y muestra.		

Determinar la diferencia de absorbancias ($A_2 - A_1$) para ambos, blanco y muestra. Obtener la diferencia de absorbancia del blanco y de la diferencia de absorbancia de la muestra, obteniendo $\Delta A_{D-láctico}$.

Determinar la diferencia de absorbancias ($A_3 - A_2$) para ambos, blanco y muestra. Obtener la diferencia de absorbancia del blanco de la diferencia de absorbancia de la muestra, obteniendo $\Delta A_{L-láctico}$.

Cálculo

De acuerdo a la ecuación general para calcular la concentración:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/L]}$$

V = volumen final (ml)

v = volumen de la muestra (ml)

MW = peso molecular de la sustancia a medir (g/mol)

d = longitud de la celda

ϵ = coeficiente de extinción del NADH a

$$340 \text{ nm} = 6.3 \text{ [l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3.4 \text{ [l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6.18 \text{ [l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{]}$$

Para el ácido D-láctico es:

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.240 \times 90.1}{\epsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A \\ &= \frac{2.018}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [gD - láctico / soln muestra]} \end{aligned}$$

Para el ácido L-láctico es:

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.260 \times 90.1}{\epsilon \times 1.00 \times 0.100 \times 1000} \times \Delta A \\ &= \frac{2.036}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [gL - láctico / soln muestra]} \end{aligned}$$

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado debe de multiplicarse por el factor de dilución F.

ANEXO C
CELDA DE FLUJO CRUZADO PARA FILTRACIONES

