

Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de un clúster de microorganismos nativos de una biorrefinería colombiana

Evaluation of lactic acid production from a cluster of native microorganisms from a Colombian biorefinery

Darly Silvana Parrado Saboya*, Sebastián Lancheros**, Juan Carlos Serrato***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v26n2.112366

RESUMEN

En esta investigación un total de dieciséis cepas de bacterias ácido lácticas nativas fueron aisladas de una biorrefinería colombiana, provenientes de mostos de fermentación alcohólica (10) y mieles de caña de azúcar (6). Este clúster fue evaluado para la producción de ácido láctico en el medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (100 mL) en condiciones anaeróbicas, a 150 rpm y sin control de pH. Los efectos de la temperatura (37, 39.5, 42 °C) y del tiempo de fermentación (0, 8 y 24 horas) fueron evaluados sobre la producción del ácido láctico. Las bacterias ácido lácticas (BAL) que lograron una producción del metabolito de interés, similar a la cepa patrón *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649 fueron *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* 1 con concentraciones de 12 gL⁻¹ y parámetros cinéticos, 0.61 Y_{p/s} y 0.51 gL⁻¹h⁻¹ en 24 horas a 42°C. Posteriormente, estas dos cepas fueron escaladas a nivel biorreactor en un medio rico en sacarosa a 42 °C, 150 rpm y NaOH 3N como agente para el control del pH en 6.8. La producción de ácido láctico (AL) y otros metabolitos fueron analizados durante las 44 horas de fermentación. *Pediococcus acidilactici* presentó el mejor desempeño fermentativo con una producción de 30 gL⁻¹ ácido láctico (0.66 Y_{p/s} y 0.68 gL⁻¹h⁻¹). Adicionalmente se produjeron, bajo las condiciones evaluadas, ácido acético y etanol con rendimientos de 0.13 y 0.04 gg⁻¹ respectivamente.

Palabras claves: bacteria ácido láctica nativa, sacarosa de caña de azúcar, fermentación alcohólica, ácido láctico.

ABSTRACT

In this study, a total of sixteen strains of native lactic acid bacteria were isolated from a Colombian biorefinery, originating from alcoholic fermentation musts (10) and sugar cane molasses (6). This cluster was evaluated for lactic acid production in Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium (100 mL) under anaerobic conditions, at 150 rpm, and without pH control. The effects of temperature (37, 39.5, 42 °C) and fermentation time (0, 8, and 24 hours) on lactic acid production were assessed. The lactic acid bacteria (LAB) strains that achieved metabolite production comparable to the reference strain *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649 were *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* 1, producing 12 gL⁻¹ of lactic acid with kinetic parameters of 0.61 Y_{p/s} and 0.51 gL⁻¹h⁻¹ at 42 °C in 24 hours. Subsequently, these two strains were scaled up to a bioreactor level in a sucrose rich medium at 42 °C, 150 rpm, with 3N

* Dr. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, <https://orcid.org/0009-0005-3478-8136>, dparrado@unal.edu.co

** Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, <https://orcid.org/0009-0000-3225-9445>, salacherosc@unal.edu.co

*** Dr. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, <https://orcid.org/0000-0002-9092-0585>, jcserratob@unal.edu.co

NaOH as a pH control agent at 6.8. Lactic acid (LA) production and other metabolites were analyzed during 44 hours of fermentation. *Pediococcus acidilactici* exhibited the best fermentative performance with a production of 30 gL⁻¹ of lactic acid, 0.66 Y_{p/s}, and 0.68 gL⁻¹h⁻¹. Additionally, yields of 0.13 and 0.04 gg⁻¹ of acetic acid and ethanol, respectively, were produced under the evaluated conditions.

Keywords: Native lactic acid bacteria, sugarcane sucrose, alcoholic fermentation, lactic acid.

Recibido: enero 24 de 2024 **Aprobado:** octubre 15 de 2024

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las bacterias ácido lácticas (BAL) son anaerobias facultativas, no móviles y no formadoras de esporas; su temperatura de crecimiento óptima varía entre 20 a 45 °C y el pH óptimo esta entre 5.5 a 6.5 (dependiendo de la especie) (Rawoof, 2021). Son bacterias Gram positivas que usan los carbohidratos como la principal fuente de carbono (George, 2018), son generalmente cocos o bacilos de longitud variable con grosor entre 0.5 – 0.8 μm y presentan una alta tolerancia a pH bajos (Mokoena, 2017). La mayoría son catalasa y oxidasa negativa.

Las BAL son de vital importancia en la industria alimentaria y de piensos, donde el ácido láctico se utiliza como acidificante y conservante, o en nutraceuticos como probióticos. Gracias a su uso histórico a escala industrial en todo el mundo, las BAL pueden ser candidatas prometedoras para su uso en biorrefinerías ya que son consideradas generalmente seguras (GRAS), poseen características metabólicas importantes tales como la habilidad para producir ácidos, aromas, hidrolizar proteínas, producir exopolisacáridos viscosos e inhibir el crecimiento de otras bacterias (Wang Y. W., 2021) (Lübeck, 2019).

Las bacterias productoras de ácido láctico (BAL) son clasificadas en homofermentativas que producen teóricamente un solo producto, ácido láctico y heterofermentativas que producen adicionalmente otros productos tales como etanol, CO₂, acetoina, formato de diacetilo y ácido acético (Mokoena, 2017). Sin embargo, algunas BAL homofermentativas pueden producir ácido fórmico o una mezcla de ácidos en la fermentación cuando son sometidas a condiciones de estrés tales como limitación de la fuente de carbono, incremento en el pH o incremento en la temperatura (Johanson, 2020). Una fuente importante para el aislamiento de microorganismos de interés biotecnológico es la fermentación alcohólica, en la cual se emplean sustratos como mieles, jugo y melaza de caña y cuyos principales contaminantes son bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus sp.* (Dias, 2023)

El ácido láctico (AL) es de importancia biotecnológica, ya que se utiliza ampliamente en la industria cosmética,

alimenticia, farmacéutica, médica y en las industrias químicas (Cubas, 2018). Las proyecciones del mercado del AL indican que se incrementará de 1.1 billones de dólares (USD) en 2020 a 2.1 billones de USD en el 2025 (Market, 2020); hoy en día, casi el 80 - 90 % de la producción mundial es obtenida a través de la ruta fermentativa, donde las BAL fermentan azúcares simples (glucosa, sacarosa y lactosa) para la producción del ácido láctico (Grewal, 2020). Para satisfacer la creciente demanda de AL, el coste de producción total debería ser inferior a 0,8 USD/kg. El costo de la materia prima representa alrededor del 40-70 % de los costos totales de producción; por lo tanto, el uso de materiales de bajo costo que incluyen residuos agrícolas e industriales son uno de los factores más importantes que determinan el éxito del proceso de fermentación con tecnologías competitivas y respetuosas con el medio ambiente (Ajala, 2020).

El objetivo de la presente investigación fue el aislamiento, selección y caracterización de un clúster de BAL nativas del proceso sucroalcoholero, para lo cual se estudió el efecto de la temperatura (37, 39.5 y 42 °C) y el tiempo (0, 8 y 24 h) sobre la producción y productividad de AL a escala laboratorio con el fin de seleccionar las cepas más promisorias para ser evaluadas a escala biorreactor bajo condiciones controladas de temperatura y pH mediante fermentación lote.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de referencia

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (ATCC 9649)

Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL fueron aisladas a partir de muestras de mostos de fermentación alcohólica, jugos y mieles de caña de azúcar de un Ingenio Colombiano. Para ello se empleó el método de diluciones seriadas de cada muestra desde 1 × 10⁻³ hasta 1 × 10⁻⁶ en agua destilada estéril, sembrando 0.1 mL en la superficie en agar MRS (Merck, Alemania) que contiene 10 gL⁻¹ de peptona de caseína, 8 gL⁻¹ de extracto de carne, 4 gL⁻¹ extracto de levadura, 20 gL⁻¹ glucosa, 1 mL⁻¹ tween 80, 2 gL⁻¹ K₂HPO₄, 2 gL⁻¹ citrato de amonio, 5 gL⁻¹ acetato de sodio, 0.2 gL⁻¹

MgSO₄·7H₂O y 0.04 gL⁻¹ sulfato de manganeso. Las cajas fueron incubadas a 35°C por 48 h en condiciones anaeróbicas (Anaerogen - Oxoid). Cumplido el tiempo se realizaron los recuentos de las unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Las colonias seleccionadas fueron aisladas y purificadas mediante repiques seriados en agar MRS e incubadas en las condiciones anteriormente descritas. Los criterios considerados en la selección de las colonias de BAL fueron su diferenciación fenotípica: color, consistencia y forma; diferenciación microscópica mediante coloración de Gram; pruebas de oxidasa y catalasa (Merck, Alemania). Adicionalmente a las 16 cepas nativas aisladas se les realizó la identificación bioquímica del consumo de carbohidratos mediante el sistema de galerías estandarizado API 50 CHL (BioMérieux, Inc. Hazelwood Missouri, E.U) siguiendo el protocolo descrito por (Ramírez, 2016).

Conservación de las cepas

Las cepas aisladas de BAL fueron conservadas en caldo MRS, suplementado con glicerol al 50 % y se almacenaron en nitrógeno líquido a -196 °C en viales para criopreservación. Antes de cada experimentación las cepas fueron reactivadas en medio MRS e incubadas a 35°C por 48 h, para su reconstitución.

Obtención del Inóculo

Las BAL fueron crecidas en superficie sobre agar MRS (Merck, Alemania), e incubadas a 37 °C por 48 horas (Binder, Alemania). La pureza de las cepas fue evaluada por coloración de Gram, seguidamente se realizó un lavado a la biomasa usando solución salina 0.85 %, hasta alcanzar la turbidez del tubo número 2 del patrón de McFarland (6 x 10⁸ cel/mL), la concentración celular del inóculo fue validada por siembra en placa sobre agar MRS, manejando las mismas condiciones de temperatura y tiempo descritas anteriormente (datos no mostrados).

Efecto de la temperatura sobre la producción de ácido láctico en medio MRS

Los experimentos de la fermentación lote se realizaron en el caldo MRS el cual contiene 20 gL⁻¹ glucosa como única fuente de carbono (Merck, Alemania), en erlenmeyers de 250 mL, con un volumen efectivo de trabajo de 100 mL (tres repeticiones experimentales para cada cepa). Se garantizó el estricto control de la relación del inóculo del 10% (tubo # 2 de McFarland - 6 x 10⁸ cel/mL), la velocidad de agitación 150 rpm en agitador (Innova 44, USA) y el tiempo de fermentación 24 horas. En lo referente al pH se realizó medición más no control. Todas las evaluaciones fueron realizadas bajo condiciones de esterilidad. En la tabla 1 se muestran las variables estudiadas.

Tabla 1. Condiciones evaluadas en matraz agitado para el clúster de las BAL .

Número de BAL	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
14*	37, 39.5 y 42	0, 8 y 24

*Se seleccionaron 13 BAL nativas y 1 cepa patrón. (Lo anterior debido a que se aislaron 3 cepas de *Lactobacillus pentosus* y 3 de *Lactobacillus fermentum*., para la evaluación solo se seleccionó una de cada especie).

Métodos analíticos

Las muestras fueron tomadas del medio de fermentación a las 0, 8 y 24 horas para realizar el análisis de pureza del cultivo, medición del pH y producción de ácido láctico. La pureza del cultivo se determinó por coloración diferencial de Gram (Mol Labs, Colombia), el pH se midió con un pHmetro seven easy (Mettler Toledo, Suiza) y la concentración de ácido láctico fue analizada por el método reflectométrico siguiendo el protocolo descrito por (Guauque & Gómez, 2019) para el cual se utilizan tiras del ensayo Reflectoquant Test Ácido Láctico MERCK®, sumergiéndolas durante 3 a 5 segundos en una solución de la muestra diluida en 1/10 o 1/100, seguidamente se retiró el exceso de líquido y finalmente se insertaron en el reflectómetro Reflectoquant RQflex® plus 10 MERCK®, registrando el valor obtenido en mgL⁻¹ (Merck Millipore - Alemania).

Diseño experimental del efecto de los factores sobre la producción de ácido láctico en medio MRS

Se utilizó un arreglo factorial en un diseño experimental completamente al azar y medidas repetidas en 3 tiempos, con tres repeticiones para cada experimento. Para el factor microorganismo se usaron 14 niveles, para la temperatura 3 niveles y finalmente para el factor tiempo, 3 niveles. Las medidas repetidas se realizaron en los tiempos 0, 8 y 24 horas de fermentación. La variable respuesta fue la producción de ácido láctico. Para la estimación de parámetros del modelo se usó el procedimiento Glimmix de SAS (System Analysis System), versión 9.4, con el fin de probar las hipótesis de igualdad de los niveles de cada factor y sus interacciones de segundo y tercer orden. Debido a la presencia de medidas repetidas del experimento, se probaron cuatro estructuras de varianza-covarianza: simetría compuesta (CS), autorregresiva de orden1 (AR (1)), autorregresiva de orden1 con heterogeneidad de varianzas (ARH (1)) y no - estructurada (UN)). Con base en el Criterio de Información de Akaike, UN fue seleccionada como estructura para la matriz de covarianzas. Se realizó la comparación de promedios de los niveles usando la corrección de Sidak para controlar el fenómeno de la inflación de la significancia global de las pruebas. Se realizó la prueba

de robustez del modelo basada en el ajuste observado vs predicción; así mismo, se realizó la prueba de potencia a través de un procedimiento Bootstrap, para detectar efectos significativos para la mayoría de los factores y sus interacciones, con potencias superiores al 85% en todos los casos. Finalmente se usó la prueba de Dunnett para contrastar el desempeño global de las BAL nativas frente a la cepa patrón.

Fermentación en biorreactor medio sacarosa

Las cepas seleccionadas de *Pediococcus* fueron evaluadas mediante fermentación lote.

Los experimentos fueron realizados en un reactor New Brunswick 14 L (Bioflo 115, New Brunswick Scientific, USA) con un volumen efectivo de trabajo de 4.0 L. El medio de fermentación empleado contiene 45 gL⁻¹ sacarosa, 15 gL⁻¹ extracto de levadura, 0.1 % KH₂PO₄, 0.1 % (NH₄)₂SO₄, 0.05 % MgSO₄, MnSO₄ 5 ppm (Serrato, 2005), y fue esterilizado a 121 °C, 15 psi por 20 min. Se realizaron 6 fermentaciones (3 repeticiones para cada cepa BAL seleccionada) en condiciones anaeróbicas por 44 h, durante el tiempo de fermentación el pH se controló en 6.8 +/- 0.2 con NaOH 3N, la velocidad de agitación fue 150 rpm a 42 °C. El biorreactor fue inoculado con una relación de inóculo medio de cultivo del 10 % v/v. Se realizó una siembra en agar MRS para verificar la concentración celular (UFC/ml) y la pureza del cultivo (datos no mostrados). Durante la fermentación se tomaron asepticamente muestras de 10 mL cada 4 horas para determinar la concentración de ácidos orgánicos, para ello la muestra fue centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos (este proceso se realizó por duplicado). Seguido a esto se realizaron dos filtraciones por membrana tamaño 0.45 µm y 0.2 µm, respectivamente. El contenido de ácidos orgánicos se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, empleando un HPLC con detector UV-VIS a 215 nm, una columna Aminex HPX-87H (estireno-divinilbenceno sulfonada con intercambiador H₃O⁺), como fase móvil una solución de ácido sulfúrico 0.005M a un flujo de 0.5 mL/min (Varela, 2010)

Diseño estadístico fermentación biorreactor medio sacarosa

Se utilizó un modelo lineal correspondiente a un diseño completamente al azar con tres repeticiones para cada experimento. Los factores fueron microorganismo, con dos niveles y tiempo con 12. Las medidas repetidas en el tiempo se realizaron con intervalos de 4 horas desde las 0 hasta las 44 horas. Las variables respuesta fueron la producción de ácido láctico, ácido acético, etanol y productividad. Para la estimación de los parámetros del modelo se usó el procedimiento Glimmix de SAS (System Analysis System) versión 12.1, con el fin de pro-

bar las hipótesis de igualdad de los niveles de cada factor y sus interacciones. Debido a la presencia de medidas repetidas del experimento, se seleccionó la estructura varianza-covarianza ARH (1) de acuerdo con el criterio de información de Akaike. Los promedios de las variables de respuesta para cada uno de los niveles de los factores y su interacción fueron estimados por mínimos cuadrados. Dada la significancia de la interacción microorganismo por tiempo, se compararon hora a hora y de esta forma se concluyó cual microorganismo es mejor, en cuanto a la producción del metabolito de interés (ácido láctico).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

En este estudio un total de 16 cepas BAL nativas fueron aisladas de 14 muestras de mieles y mostos de fermentación alcohólica de caña de azúcar. Todos los aislados fueron Gram positivos, doce cepas presentaron morfología bacilar y cuatro morfologías cocoide, todos ellos catalasa y oxidasa negativos. Los resultados de la identificación bioquímica del consumo de carbohidratos se presentan en la tabla 2.

Los aislamientos fueron clasificados según el tipo de metabolismo en homofermentativos (6 cepas) aisladas de mieles de caña de azúcar y heterofermentativos (10 cepas) aisladas de los mostos de fermentación alcohólica. El perfil bioquímico mostró que todo el clúster de BAL tuvo la capacidad para consumir glucosa, fructosa y sacarosa, carbohidratos disponibles mayoritariamente en los hábitats de origen.

El *Lactobacillus fermentum* 1 y el *Lactobacillus pentosus* fueron las cepas predominantes, representando el 38 % de la población total. 11 cepas del clúster aislado pertenecen al género *Lactobacillus*. Resultados similares fueron reportados por (Bonatelli, 2017) quienes analizaron 105 muestras de ADN de comunidades bacterianas aisladas en dos destilerías brasileras; la secuenciación del ADNr 16S mostró que entre el 92 % y el 99 % de las secuencias pertenecían al género *Lactobacillus* y las restantes a *Weissella*, *Pediococcus*, *Acetobacter* y *Anaerobacter*.

Efecto de la temperatura, el pH y el tiempo de fermentación sobre la producción de ácido láctico

En el medio MRS la única fuente de carbono es la glucosa (20 gL⁻¹), la cual puede ser fermentada por dos tipos de BAL las homofermentativas que convierten una molécula de glucosa en dos moléculas de AL, y las heterofermentativas que convierten la glucosa en azúcares de

Tabla 2. Identificación bioquímica del clúster de bacterias ácido lácticas nativas aisladas de mieles y mostos de fermentación empleando el kit API 50 CHL (Biomérieux, Francia).

Fuente del aislamiento	Identificación de la BAL	Porcentaje de identificación (%ID)	Número de aislados	Tipo de metabolismo	Código
MF	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subs. <i>mesenteroides</i>	99.9	1	Heterofermentativo	Lm spp. m
MF	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.7	1	Heterofermentativo	Lbre
MF	<i>Lactobacillus buchneri</i>	89.7	1	Heterofermentativo	Lb
MF	<i>Lactobacillus collinoides</i>	94	1	Heterofermentativo	Lc
MF	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	80, 80	2	Heterofermentativo	Lf1
MF	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99.7, 91.2, 88.9	3	Heterofermentativo	Lp
MC	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99.9	1	Homofermentativo	Pa
MC	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	99.8	1	Homofermentativo	Pp1
MC	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	98.8	1	Homofermentativo	Pp2
MC	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98.6	1	Homofermentativo	Lp
MC	<i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>Lactis</i>	97.8	1	Homofermentativo	Ll spp l
MC	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	86.9, 91	2	Homofermentativo	La

MF: Mosto de fermentación, MC: Miel de caña de azúcar.

cinco carbonos (pentosas), y luego producen una molécula de AL y una molécula de etanol o ácido acético (Juturu, 2016). Según lo reportado por (Park, 2018) la acumulación del AL durante la fermentación afecta el metabolismo de los microorganismos y la citotoxicidad ocurre alrededor del valor del pKa (3.86). El rendimiento y la productividad del ácido láctico dependen del pH (3,5-9,6), la temperatura (5 - 45 °C), la presencia de nutrientes (aminoácidos, péptidos, nucleótidos y vitaminas) y la cepa de BAL utilizada (Zheng, 2020). En la tabla 3 se presenta la producción de AL del clúster en las tres temperaturas y los dos tiempos de fermentación evaluados.

Los resultados de la tabla 3 muestran que todas las BAL nativas incluida la cepa de referencia produjeron ácido láctico bajo las condiciones evaluadas. A las 8 h de fermentación la cepa de referencia *Lactobacillus delbrueckii* logró la mayor producción de ácido láctico (AL) con 4.8 gL⁻¹ y seguidamente las cepas nativas *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum* con 3.5 gL⁻¹ a 37 °C. A la temperatura de 39.5 °C las cepas destacadas fueron *Lactobacillus acidophilus* y la cepa patrón *Lactobacillus delbrueckii* con producciones de 4.5 y 5.2 gL⁻¹ respectivamente. A 42 °C las cepas destacadas fueron *Lactobaci-*

illus buchneri y *Pediococcus pentosaceus* 1 con producciones de 5.9 y 4.7 gL⁻¹ respectivamente.

El análisis de varianza realizado arrojó el siguiente modelo lineal:

$$AL_{nmik} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\beta)_{ij} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \epsilon_{nmik}$$

Donde AL_{nmik} es la respuesta (AL) observada para el i-ésimo nivel de microorganismo (micro_i), j-ésimo nivel de temperatura (temp_j), k-ésimo nivel de tiempo (tiempo_k), y l-ésima repetición (rep_l); μ es la media general; α_i es el efecto fijo del i-ésimo nivel de microorganismo (micro_i); β_j es el efecto fijo del j-ésimo nivel de temperatura (temp_j); γ_k es el efecto fijo del k-ésimo nivel de tiempo (tiempo_k); $(\alpha\gamma)_{ik}$ es el efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel de microorganismo y el k-ésimo nivel de tiempo (micro*tiempo); $(\alpha\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre el i-ésimo nivel de microorganismo y el j-ésimo nivel de temperatura (micro*temp); $(\beta\gamma)_{jk}$ es el efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel de temperatura y el k-ésimo nivel de tiempo (temp*tiempo); $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de la interacción triple entre microorganis-

Tabla 3. Producción de ácido láctico (g·L⁻¹) en 8 y 24 h de fermentación lote en medio MRS a 37, 39.5 y 42 °C. (Promedio de tres réplicas para todos los análisis).

Bacterias ácido-lácticas	37 °C		39.5 °C		42 °C	
	8 h	24 h	8 h	24 h	8 h	24 h
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subs. <i>Mesenteroides</i>	0.33	8.51	0.34	9.13	2.15	9.85
<i>Lactobacillus brevis</i>	2.60	5.38	0.41	6.19	0.45	4.35
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1.90	9.93	1.73	9.83	5.94	8.20
<i>Lactobacillus collinoides</i>	0.30	3.17	0.34	0.31	0.27	4.00
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	0.40	9.19	0.58	7.89	3.59	7.17
<i>Lactobacillus pentosus</i>	3.50	8.83	1.84	8.87	2.08	6.28
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.00	9.14	0.32	7.90	4.03	12.30
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	2.10	8.33	2.65	8.61	4.65	12.10
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 2	0.50	5.69	2.63	6.95	1.83	7.50
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.50	11.25	0.38	8.32	0.27	6.93
<i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>Lactis</i>	2.40	4.33	0.24	1.62	0.02	2.50
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.40	4.13	4.50	3.76	0.17	0.78
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649	4.80	9.57	5.21	11.96	2.56	8.30

* La mayor desviación estándar de 3.43 se obtuvo a las 24 horas a 42 °C.

mo, temperatura y tiempo (micro*temp*tiempo), y finalmente, ϵ_{nmk} es el término de error residual con $\epsilon_{nmk} \sim N(0, \sigma^2)$, incluyendo el efecto de las medidas repetidas en el tiempo.

Los resultados del análisis de varianza de tipo III revelan que todos los efectos principales (microorganismos (F=131.57, p= <0.0001), temperatura (F=7.63, p= 0.0008) y tiempo (F=6619.87, p= <0.0001) y sus interacciones (dobles y triples) son altamente significativos en la producción de AL. Esto sugiere que la producción de AL es influenciada por una combinación de estos factores y sus interacciones. Así mismo, el análisis de agrupamiento Sidak para el tiempo muestra que la producción de AL aumenta significativamente con el tiempo. La mayor producción se observa después de 24 horas, mientras que las producciones a 8 y 0 horas son significativamente menores.

En la figura 1 se muestra el efecto de las temperaturas evaluadas sobre la producción de AL para todo el clúster BAL evaluado. El análisis de agrupamiento Sidak para la interacción microorganismo*temperatura mostró que la producción de AL es máxima para el *Lactobacillus delbrueckii* - cepa de referencia a 39.5°C. así mismo se puede evidenciar un efecto directamente proporcional entre la temperatura y la producción de AL.

Trabajos relacionados han sido realizados con cepas nativas similares a las halladas en esta investigación, (Khatri, 2017) aislaron 7 bacterias lácticas de residuos agrícolas y lácteos de Anand. La producción de ácido láctico *in vitro* fue evaluada en el caldo MRS a 37°C. Entre los siete aislados, la cepa AAU L2 mostró la mayor producción de ácido láctico 16.2 g·L⁻¹ frente a *L. plantarum* MTCC 4461 (12.8 g·L⁻¹) en 48 horas. Así mismo, (Othman, 2017) reportaron una producción de 8.71 g·L⁻¹ de ácido láctico al usar *Pediococcus acidilactici* DSM 20238 en el medio MRS a 37°C y 24 h. (Abdel, 2019) reportaron una producción de 13.9 g·L⁻¹ de ácido láctico al usar la cepa nativa BoM1-2 correspondiente al *Enterococcus hirae* en un medio que usó glucosa como fuente de carbono. En la tabla 2 se presenta el efecto de las temperaturas y el tiempo de fermentación sobre el pH para todo el clúster BAL evaluado.

El pH en todo el clúster de BAL presentó la misma tendencia a disminuir a medida que transcurría el tiempo de fermentación a las tres temperaturas evaluadas. El pH del medio MRS inició entre 5.4 - 5.7; la mayor disminución del pH fue observada para las cepas: *Lactobacillus plantarum* 1 (37 °C), *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* (39.5 °C) y *Pediococcus acidilactici* (42 °C), obteniendo una reducción de 1.9, 1.69 y 1.6 unidades de pH respectivamente. Según lo reportado por (Escobar,

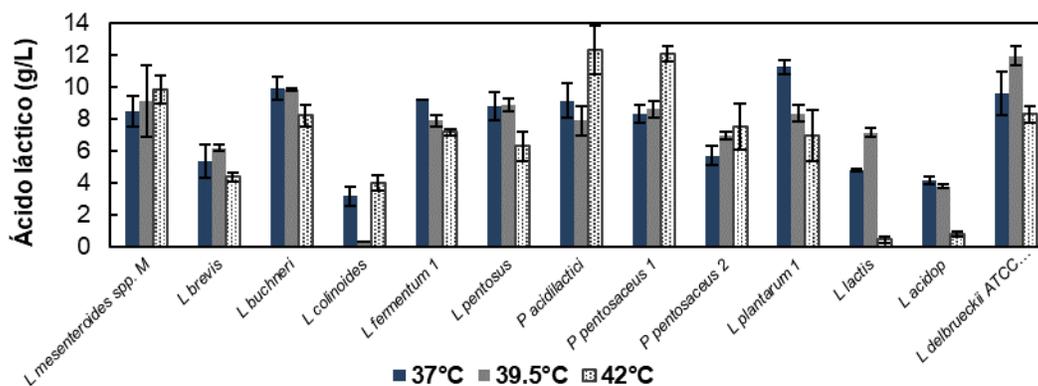


Figura 1. Efecto de la temperatura sobre la producción de ácido láctico en medio MRS a 37, 39.5, 42 °C - 24 h.

Tabla 4. Parámetros de la fermentación ácido láctica en 24 horas

Cepa	Producción AL (gL ⁻¹)	Rendimiento (gg ⁻¹)	Productividad (gL ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Pediococcus acidilactici</i> (42°C) - nativa	12.30	0.61	0.51
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1(42°C) - nativa	12.10	0.60	0.50
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp <i>bulgaricus</i> (39.5°C) * - referencia	11.96	0.59	0.49

*A 39.5°C la cepa de referencia alcanzó la mayor producción de AL.

2020) la disminución del pH indica el estado metabólico activo y vigoroso de las BAL evaluadas. Resultados superiores fueron reportados por (Vera, 2020) quienes evaluaron el efecto del pH sobre el crecimiento en medio MRS de tres BAL nativas, *Leuconostoc mesenteroides* (32 °C), *Streptococcus infantarius* (37 °C) y *Lactobacillus plantarum* (32 °C), obteniendo una reducción de 3.2, 1.0 y 3.0 unidades de pH respectivamente. Las BAL nativas de este estudio destacadas por su alta producción de ácido láctico alcanzaron valores de pH inferiores a 4.0, corroborando lo descrito por (Ojo, 2023) quienes afirman que las BAL son altamente ácido tolerantes y esto le confiere una gran relevancia a nivel comercial. Según lo expuesto por (Beitel, 2020) la temperatura y el pH juegan un rol fundamental en la optimización de la función celular. El pH no solo afecta la actividad enzimática y el transporte de nutrientes en la célula, sino que también afecta la síntesis de proteínas. Según lo reportado por (Yang, 2022) el valor del pH desempeña un papel crucial en la hidrólisis, la acidogénesis y la selección de comunidades microbianas específicas. el pH más adecuado para la fermentación láctica suele estar entre 5.0 y 6.0. Sin embargo, la producción y acumulación de ácido láctico puede producirse en un entorno ácido (pH < 4,0). Es importante señalar que la producción de ácido láctico puede variar en función del pH inicial, así como del tipo y la concentración del sustrato (Pau, 2022).

Los resultados del análisis de agrupamiento de sidak de la interacción microorganismo por tiempo y por tempe-

ratura mostraron que no hay una diferencia estadísticamente significativa en lo referente a la producción de AL por el *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* 11.96 gL⁻¹ a 39.5 °C, *Pediococcus pentosaceus* 12.10 gL⁻¹ y *Pediococcus acidilactici* 12.30 gL⁻¹ a 42 °C en 24 horas de fermentación.

La tabla 4 muestra que *Pediococcus acidilactici* y *Pentococcus pentosaceus* fueron las BAL nativas más efectivas para la producción de ácido láctico a 42 °C, presentando el mayor rendimiento (0.61 y 0.60 gg⁻¹) y la mayor productividad (0.51 y 0.50 gL⁻¹h⁻¹) respectivamente al ser comparadas con el *Lactobacillus delbrueckii* (cepa patrón). Resultados inferiores fueron reportados por (Sriphochanart, 2022) al evaluar el *Lactiplantibacillus plantarum* TBRC 9667 en medio MRS a 25 y 30 °C alcanzaron rendimientos de 0.49 y 0.046 gg⁻¹, respectivamente. Con base en los resultados estadísticos *Pediococcus acidilactici* y *Pentococcus pentosaceus* fueron seleccionadas para ser evaluadas a escala biorreactor.

Evaluación de la producción de ácido láctico a escala biorreactor bajo condiciones controladas de temperatura y pH

Según lo reportado por (López, 2019) y (Wang Y. C., 2019) las cepas termófilas son siempre las preferidas en los bioprocesos, ya que el riesgo de contaminación es bajo y la operación puede realizarse en condiciones no estériles, lo que reduciría significativamente los costos operativos. Por su parte (Zhang Q. Z., 2021) reportaron

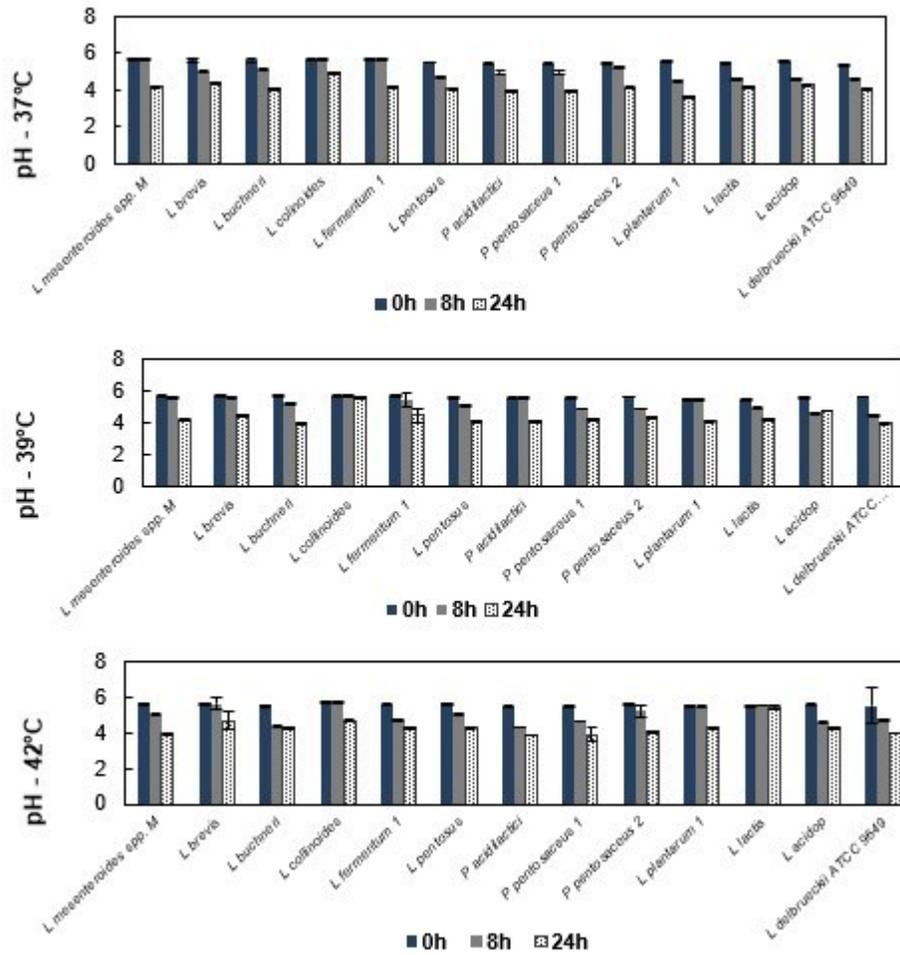


Figura 2. Comportamiento del pH en las fermentaciones a 37, 39.5, 42 °C a las 0, 8, 24 h en medio MRS.

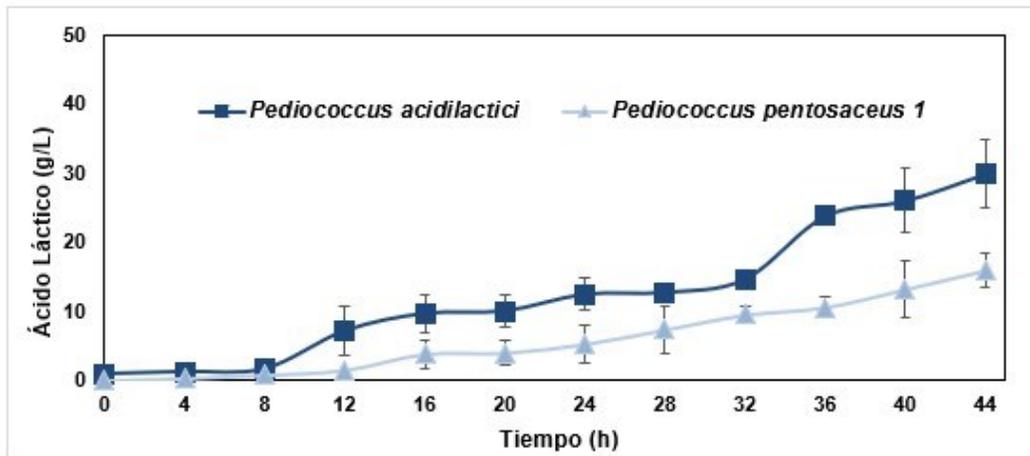


Figura 3. Cinética de producción de ácido láctico a 42 °C por *Pediococcus pentosaceus* 1 y *Pediococcus acidilactici* a escala biorreactor.

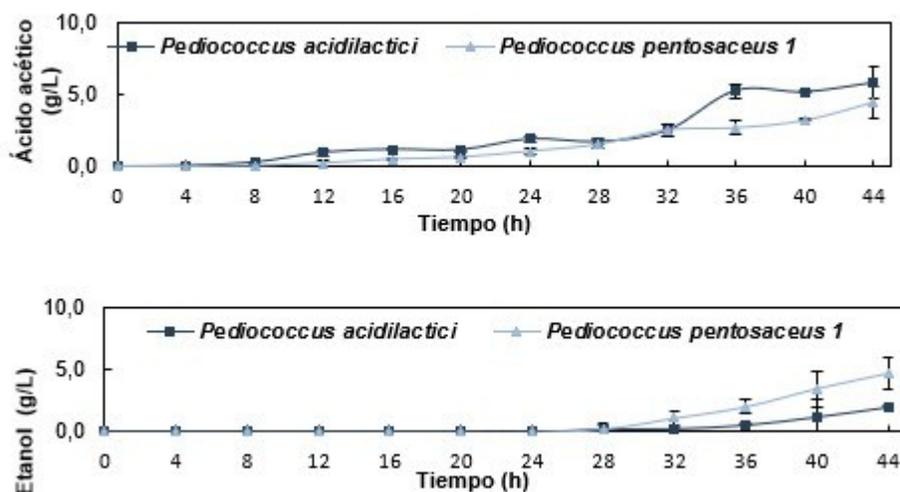


Figura 4. Producción a escala biorreactor de ácido acético y etanol por *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus 1* a 42 °C.

el hallazgo de una cepa nativa de *Pediococcus acidilactici* AAF15 con características industriales deseadas tales como la termo tolerancia al estrés ácido y térmico.

En la figura 3, se evidencia que las cepas presentaron una fase de adaptación a la nueva fuente de carbono (sacarosa) de 8 horas. Las cepas de *Pediococcus* son reportadas como sacarosa negativa (Mazzoli *et al.*, 2014); sin embargo, en las condiciones de fermentación empleadas en esta investigación, alcanzaron producciones superiores a 16 gL⁻¹. La producción de AL inició a las 12 horas alcanzando valores de 33.7 y 16 gL⁻¹ con consumos de base (NaOH 3N) de 550 y 400 ml por *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, respectivamente. Estos resultados sugieren que el control del pH fue más eficiente con *P. acidilactici*, lo que se traduce en un menor consumo de base y un ahorro económico. Los resultados estadísticos muestran que hubo una diferencia estadísticamente significativa en lo referente a la producción de AL para las variables microorganismo (F=8.2, p=0.0089), tiempo (F=86.78, p= <0.0001) y su interacción (F=6.17, p=0.0030).

Al comparar el desempeño fermentativo que presentó *P. acidilactici* a 42°C en el medio con glucosa vs. Sacarosa, un carbohidrato de mayor complejidad para su asimilación, se alcanzó una producción de AL de 12.3 y 33.7 gL⁻¹ y un rendimiento 0.61 y 0.66 gg⁻¹, sin y con control de pH, respectivamente. Estos resultados sugieren que la cepa no presentó una afectación por el cambio de sustrato y que el incremento significativo en la producción del ácido láctico se derivó principalmente por el control del pH. Por su parte (Saavedra, 2021) reportaron un incremento de 3.5 veces en el ácido láctico producido

por *Lactobacillus plantarum* cepa Hui1 en el medio MRS suplementado con miel de caña de azúcar hidrolizada al realizar el control del pH con carbonato de calcio. (Paulova, 2020) reportaron una producción de ácido láctico de 19.5 gL⁻¹ por la cepa *Lactobacillus casei* CCDM 198 en el medio MRS (glucosa) a 37 °C, al realizar el control del pH 6.5 con NaOH 20 %.

En la tabla 5 se muestra para cada bacteria nativa evaluada los resultados obtenidos.

Pediococcus acidilactici presentó el más alto rendimiento, la más alta productividad y por ende la mayor producción de ácido láctico (30 gL⁻¹). No existen muchos reportes en la literatura de investigaciones donde se cuantifique el potencial de producción de ácido láctico de las bacterias aisladas de los ingenios azucareros, aun cuando sean ellas las más afines al consumo de sacarosa. Vidra *et al.*, reportaron rendimientos 0.77 y 0.57 gg⁻¹ para los *Lactobacillus sp* y *casei*, respectivamente, al evaluar su desempeño fermentativo a 37 °C, 150 h, con control de pH, en un medio diseñado con sacarosa de caña hidrolizada enzimáticamente (Vidra, 2017). Así mismo, (Othman, 2017) reportaron productividades de 0.52 gL⁻¹h⁻¹ para *Pediococcus acidilactici* en medio MRS bajo condiciones controladas de pH empleando NaOH. Wang *et al.*, evaluaron microorganismos nativos de melaza de caña, obteniendo rendimientos de 0.77 gg⁻¹ y productividades de 0.069 a 0.145 gL⁻¹h⁻¹ en la producción de ácido láctico a partir de sacarosa de caña (Wang Y. T., 2015).

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que el *Pediococcus acidilactici* nativo estudiado en esta investi-

Tabla 5. Producción (g L⁻¹), rendimiento (gg⁻¹) y productividad (g L⁻¹h⁻¹) de ácido láctico en 44 horas de fermentación obtenidas por las cepas de *Pediococcus*.

Cepa	Producción AL (g L ⁻¹)	Rendimiento (g g ⁻¹)	Productividad (g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	30	0.66	0.68
<i>Pediococcus pentosaceus 1</i>	16	0.35	0.36

Tabla 6. Producción de ácido acético y etanol por cepas de *Pediococcus* durante 44 horas de fermentación por lote a 42 °C.

Cepa	Ácido acético			Etanol		
	Producción (g L ⁻¹)	Rendimiento (gg ⁻¹)	Productividad (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Producción (g L ⁻¹)	Rendimiento (gg ⁻¹)	Productividad (g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	5.79	0.13	0.13	2.01	0.04	0.05
<i>Pediococcus pentosaceus 1</i>	4.50	0.10	0.11	4.75	0.10	0.11

gación presentó un adecuado desempeño fermentativo al ser comparado con los estudios mencionados ya que los reportes fueron realizados en sustratos más simples, inicialmente o por un proceso de hidrólisis. Además de la producción de ácido láctico, se generaron otros metabolitos en la fermentación, tales como el etanol y el ácido acético. La generación de estos metabolitos por cepas homofermentativas, está asociado al estrés al que se ven sometidas las células como consecuencia del agotamiento de la fuente de carbono, incremento en el pH o disminución de la temperatura y sus interacciones (Bintsis, 2018).

Como se puede observar en la figura 4, la producción de ácido acético (AA) inició a las 8 horas de fermentación, alcanzando concentraciones de 4.5 y 5.8 g L⁻¹ para el *Pediococcus acidilactici* y *pentosaceus 1*, respectivamente en 44 horas de fermentación; de modo que se trata de un metabolito que se genera por alguna condición de la fermentación (pH, temperatura o potencial redox). El análisis estadístico no evidenció una diferencia significativa en la producción de este metabolito. Por otro lado, la producción de etanol para las cepas de *Pediococcus pentosaceus 1* y *Pediococcus acidilactici* inició a las 24 horas de fermentación, de tal modo que se puede decir que este se genera como respuesta a un mecanismo de estrés celular como la acumulación de subproductos (Mazzoli *et al.*, 2014). Con respecto a la producción de etanol hubo una diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05) a favor de *Pediococcus pentosaceus 1* (4.49 g L⁻¹). Según lo reportado por (Gíl, 2019) las BAL son tolerantes a niveles de etanol cercanos al 14% v/v, sin embargo, la tolerancia al etanol esta influenciada por la temperatura y el pH.

Las cepas evaluadas en esta investigación presentaron una desviación de entre 16 - 25 % del sustrato para la producción de metabolitos diferentes al ácido láctico. Resultados similares fueron reportados por (Sun Y. X., 2019) quienes al evaluar la producción de ácido láctico a partir de mieles de caña de azúcar empleando un consorcio microbiano CEE-DL15 alcanzaron producciones de ácido acético y etanol de 3.75 y 1.75 g L⁻¹, respectivamente. Así mismo (Smetanková, 2012) reportaron producciones de ácido acético 0.84 - 1.16 y etanol 2.51 - 4.03 g L⁻¹ al evaluar tres cepas nativas de *Lactobacillus plantarum*.

Resultados superiores fueron obtenidos por (Nuryana *et al.*, 2019) al evaluar la producción de ácido láctico por un clúster de cuatro BAL nativas en el caldo MRS a 37 ° C, los autores reportaron que todas las BAL produjeron diversos ácidos orgánicos, pero la BAL 100 se destacó por presentar la mayor producción de ácido acético (44.8 g L⁻¹) seguido del ácido láctico (17.11 g L⁻¹). Según lo reportado por Rahman la cepa homofermentativa *Enterococcus mundtii* produce ácido acético como metabolito primario de la fermentación láctica, dependiendo de la relación entre la glucosa y otros azúcares (Rahman M. X., 2015).

Factores tales como el cambio de la fuente de carbono y las condiciones medio ambientales de la fermentación (T°, pH, agitación, entre otros) pueden ser la causa para la producción de metabolitos diferentes al ácido láctico por parte de BAL homofermentativas como *Pediococcus*. Por esta razón un aspecto de suma relevancia durante el proceso fermentativo es la estandarización y el control de los parámetros operativos.

Las productividades y producciones del ácido láctico obtenidas en esta investigación con *Pediococcus acidilactici* podrían ser mejoradas al optimizar las condiciones de fermentación tales como la estrategia fermentativa (lote alimentado continuo o por pulsos), el medio de cultivo (concentración de azúcares fermentables, fuentes de nitrógeno de fácil asimilación, cofactores, entre otros), el tiempo de fermentación, la temperatura y el agente de control del pH.

CONCLUSIONES

La presente investigación realizó el aislamiento y la caracterización bioquímica hasta género y especie del 100 % del clúster de bacterias ácido lácticas nativas de la biorrefinería de caña, evidenciando que el género predominante fue el *Lactobacillus* con un 56 %. Así mismo, al realizar la evaluación fermentativa de todo el clúster en un sustrato rico en glucosa a diferentes temperaturas y sin control de pH se evidenció que el AL producido por *Pediococcus pentosaceus* 12.10 gL⁻¹ y *Pediococcus acidilactici* 12.30 gL⁻¹ a 42 °C no presentó diferencia significativa frente a la cepa de referencia *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* 11.96 gL⁻¹ a 39.5 °C, en 24 horas de fermentación. De igual manera, estas cepas de *Pediococcus* fueron evaluadas en un sustrato rico en sacarosa a escala biorreactor bajo condiciones controladas de pH 6.8 y temperatura 42 °C. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los microorganismos, el tiempo y la producción de ácido láctico a favor de *Pediococcus acidilactici* quien se destacó por alcanzar el mejor desempeño fermentativo, 33.7 gL⁻¹ AL, rendimiento de 0.66 gg⁻¹ y productividad de 0.68 gL⁻¹h⁻¹, adicionalmente fue la cepa que presentó los rendimientos más bajos de ácido acético y etanol 0.13 y 0.04 gg⁻¹ respectivamente en 44 h, resultados que se correlacionan con la efectividad del control del pH. Los resultados sugieren que la cepa nativa *Pediococcus acidilactici* presenta potencial de evaluación a una mayor escala debido a que su comportamiento fue similar al obtenido por la cepa de referencia *Lactobacillus delbrueckii* (ATCC 9649) usada a nivel industrial. Así mismo la principal contribución de esta investigación fue mostrar un camino que permite realizar el aprovechamiento de la biodiversidad colombiana para la obtención de bioproductos que pueden ser utilizados en distintos segmentos industriales, como el alimenticio, cosmético, médico y biotecnológico, entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen principalmente a Ingenio Providencia S.A. por la financiación de esta investigación, al

Ing. Alejandro Villegas, José Fernando Giraldo - analítica Cenicaña y a la Universidad Nacional, sede Bogotá. Esta investigación fue realizada bajo el amparo del contrato de acceso al recurso genético # 147.

REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, M. A., Hassan, S. E. D., Azab, M. S., Mahin, A. A., & Gaber, M. A. (2019). High improvement in lactic acid productivity by new alkaliphilic bacterium using repeated batch fermentation integrated with increased substrate concentration. *BioMed research international*, 2019(1), 7212870.
- Abedi, E., & Hashemi, S. (2020). Lactic acid production-producing microorganisms and substrates source-state of art. *Heliyon*, 1 - 32.
- Ajala, E. O., Olonade, Y. O., Ajala, M. A., & Akinpelu, G. S. (2020). Lactic acid production from lignocellulose—A review of major challenges and selected solutions. *ChemBioEng Reviews*, 7(2), 38-49.
- Barbara Sionek, A. S.-K. (2023). Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of food. *Fermentation*, <https://doi.org/10.3390/fermentation9121019>, 7-10.
- Beitel, S. M., Coelho, L. F., & Contiero, J. (2020). Efficient conversion of agroindustrial waste into D (-) lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* using fed-batch fermentation. *BioMed Research International*, 2020(1), 4194052.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update on their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 665–684.
- Birgitte, K., Traveso, J., Murali, N., & Srinivas, K. (2016). Continuous fermentation of clarified corns stover hydrolysate for the production of lactic acid at high yield and productivity. *Biochemical engineering journal*, 162 - 169.
- Bonatelli, M. L., Quecine, M. C., Silva, M. S., & Labate, C. A. (2017). Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. *FEMS microbiology letters*, 364(17), fnx159.
- Camasca, L., Mattos, J., Vila, E., Cebreiros, F., & Lareo, C. (2021). Lactic acid production by *Carnobacterium* sp. isolate from a maritime Antarctic lake using eukalyptus enzymatic hydrolysate . *Biotechnology reports*, 1 - 10.
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., & Tomás-Pejó, E. (2018). Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, 12(2), 290-303.
- Dias, A., Oliveira, C. A. F. D., & Kamimura, E. S. (2023). Microbial contamination in the ethanol and cachaça fermentation process: impacts and applications. *Food Science and Technology*, 43, 1-8.

- Dias, A., Fernandes, C., & Setsuko, E. (2023). Microbial contamination in the ethanol and cachaca fermentation process: impact and applications. *Food Science and Technology*.
- Elahe Abed, S. M. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates. *Heliyon*, 1-2.
- Enrique Cubas, C. G.-F. (2018). Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofpr*, DOI: 10.1002/bbb.1852; *Biofuels*, *Bioprod. Bioref.* (2018).
- Escobar-Ramírez, M. C., Jaimez-Ordaz, J., Escorza-Iglesias, V. A., Rodríguez-Serrano, G. M., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., ... & González-Olivares, L. G. (2020). *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage. *Revista Argentina de microbiología*, 52(4), 305-314.
- Gaspar, P., Carvalho, A., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 764 - 788.
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. J., ... & Foligné, B. (2018). Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. *Frontiers in microbiology*, 9, 2899.
- Gil-Sánchez, I., Suáldea, B. B., & Moreno-Arribas, M. V. (2019). Malolactic fermentation. In *Red wine technology* (pp. 85-98). Academic Press.
- Grewal, J., Sadaf, A., Yadav, N., & Khare, S. K. (2020). Agroindustrial waste based biorefineries for sustainable production of lactic acid. In *Waste biorefinery* (pp. 125-153). Elsevier.
- Guaque, M., & Gómez, S. (2019). *Ácido láctico: Una revisión sobre los métodos de determinación y purificación*. *Biociencias*, 149-175.
- Hu, J., Zhang, Z., Lin, Y., Zhao, S., Mei, Y., Liang, Y., & Peng, N. (2015). High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non-sterile condition. *Bioresources technology*, 251 - 257.
- Johanson, A., Goel, A., Olsson, L., & Franzén, C. J. (2020). Respiratory physiology of *Lactococcus lactis* in chemostat cultures and its effect on cellular robustness in frozen and freeze-dried starter cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6), e02785-19.
- Juturu, V., & Chuan, J. (2016). Microbial production of lactic acid: The latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*.
- Khatri, K., Dhole, A., Patel, A., & Shelat, H. (2017). Production of Lactic Acid By Native *Lactobacillus* Sp. From Agricultural and Dairy Wastes. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 6, 78-83.
- Liu, Y., Ashok, S., Seol, E., Bao, J., & Park, S. (2013). Comparison of three *Pediococcus* strain for lactic acid production from glucose in the presence of inhibitors generated by acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1192 - 1200.
- López-Gómez, J. P., Alexandri, M., Schneider, R., & Venus, J. (2019). A review on the current developments in continuous lactic acid fermentations and case studies utilising inexpensive raw materials. *Process biochemistry*, 79, 1-10.
- Lübeck, M., & Stephensen, P. (2019). Application of lactic acid bacteria in green biorefineries. *Journals Investing in Sciences*, 1-8.
- María Guaque Torres, S. L. (2019). *Ácido láctico: una revisión sobre los métodos de determinación y purificación*. *BIOCIENCIAS*, 17-19.
- Market, M. (2020). Lactic acid market by application (biodegradable polymers, food & Beverages, pharmaceutical products), form and region, polylactic acid market, by application, form and region - Global Forecast to 2025. Fonte: <http://www.marketsandmarkets.com>.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., & Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1216-1236.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis, and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 12-55.
- Nuryana, I., Andriani, A., Lisdiyanti, P., & Yopi. (2019, April). Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 251, p. 012054). IOP Publishing.
- Ojo, A. O., & de Smidt, O. (2023). Lactic acid: A comprehensive review of production to purification. *Processes*, 3-37.
- Othman, M., Ariff, A. B., Wasoh, H., Kapri, M. R., & Halim, M. (2017). Strategies for improving production performance of probiotic *Pediococcus acidilactici* viable cell by overcoming lactic acid inhibition. *AMB Express*, 7, 1-14.
- Park, H. J., Bae, J. H., Ko, H. J., Lee, S. H., & Sohn, J. M. (2018). Low-pH production of D-lactic acid using newly isolate acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7. *Biotechnol. Bioeng*, 2232 - 2242.
- Pau, S., Tan, L. C., & Lens, P. N. (2022). Effect of pH on lactic acid fermentation of food waste using different mixed culture inocula. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(4), 950-961.
- Paulova, L., Chmelik, J., Barbora, B., Drahokoupil, M., & Melzoch, K. (2020). Comparison of lactic acid production by *L. casei* in batch, Fed-batch and Continuous cultivation, testing the use of feather hydrolysate as a

- complex nitrogen source. *Brazilian archives of biology and Technology*, 1 - 12.
- Rahman Abdel, M. A., Xiao, Y., Tashiro, Y., Wang, Y., Zendo, T., Sakai, K., & Sonomoto, K. (2015). Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(2), 153-158.
- Ramírez, C., & Vélez, J. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autótonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información tecnológica*.
- Rawoof, S. A. A., Kumar, P. S., Vo, D. V. N., Devaraj, K., Mani, Y., Devaraj, T., & Subramanian, S. (2021). Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 539-556.
- Saavedra, S., Alejandro-Paredes, L., Flores-Santos, J. C., Flores-Fernández, C. N., Arellano-García, H., & Zavaleta, A. I. (2021). Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* strain Hui1 in a medium containing sugar cane molasses. *Agronomía Colombiana*, 39(1), 98-107.
- Salagata, K. L. (2018). Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de residuos agroindustriales y su uso potencial como probiótico. *universidad estatal amazónica, ecuador*, 8-10.
- Sharma, A. A. (2017). Identification of new *Leuconostoc* Species Responsible for Post-harvest sucrose losses in sugarcane. *Springer*, 1-4.
- Sharma, V., & Hari, M. (2014). Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetables juices. *Food science and technology*, 1123 - 1128.
- Smetanková, J., Hladíková, Z., Valach, F., Zimanová, M., Kohajdová, Z., Greif, G., & Greifová, M. (2012). Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. *Acta Chimica Slovaca*, 5(2), 204-210.
- Sriphochanart, W., & Skolpap, W. (2022). Temperature shift and feeding strategies for improving L-lactic acid production by *Lactiplantibacillus plantarum* in batch and fed-batch cultures. *Process Biochemistry*, 11-21.
- Sun, Y., Xu, Z., Zheng, Y., Zhou, J., & Xiu, Z. (2019). Efficient production of lactic acid from sugarcane molasses by a newly microbial consortium CEE-DL15. *Process Biochemistry*, 81, 132-138.
- Varela, J. L. (2010). Desarrollo de un método cromatográfico (HPLC) para la determinación de ácidos orgánicos en cerveza. Ciudad de México.
- Vera, M. Y., & Rodríguez-Rodríguez, W. L. (2020). Effect of pH on the growth of three lactic acid bacteria strains isolate from sour cream. *Universitas Scientiarum*, 341-358.
- Vidra, A., Tóth, A. J., & Németh, Á. (2017). Lactic acid production from cane molasses. *Waste Treatment and Recovery*, 2(1), 13-16.
- Wang, Y., Cao, W., Luo, J., Qi, B., & Wan, Y. (2019). One step open fermentation for lactic acid production from inedible starchy biomass by thermophilic *Bacillus coagulans* IPE22. *Bioresource technology*, 272, 398-406.
- Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(1), 10-18.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., ... & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 612285.
- Wu, Y., Ma, H., Zheng, M., & Wang, K. (2015). Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Bioresource technology*, 53 - 58.
- Yang, L., Chen, L., Li, H., Deng, Z., & Liu, J. (2022). Lactic acid production from mesophilic and thermophilic fermentation of food waste at different pH. *Journal of Environmental Management*, 304, 114312.
- Yoganand Sobrun, A. B.-L. (2012). Isolation of lactic acid bacteria from sugar cane juice and production of lactic acid from selected improved strains. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 398-407.
- Zhang, Q., Zhao, C., Wang, X., Li, X., Zheng, Y., Song, J., ... & Wang, M. (2021). Bioaugmentation by *Pediococcus acidilactici* AAF1-5 improves the bacterial activity and diversity of cereal vinegar under solid-state fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 603721.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.