

Biosíntesis de ácido láctico L (+) a partir de naranja "criolla" *Citrus sinensis* en un proceso fermentativo con *Lactobacillus delbrueckii*

Henry Mauricio Benítez^{a*}, Liliana Moncayo Martínez^{b**}

^aFacultad De Ciencias Exactas Y Naturales, Maestría En Química, Universidad De Caldas.

^bFacultad De Ciencias Exactas Y Naturales, Departamento De Química, Universidad De Caldas
Manizales Colombia

Recibido: 26/09/16 Aprobado: 08/11/16

RESUMEN

En esta investigación se evaluó la viabilidad de producir ácido láctico L (+) con jugo de naranja "criolla" *Citrus sinensis* en un proceso fermentativo con *Lactobacillus delbrueckii*.

Se hizo el análisis fisicoquímico al jugo de naranja, azúcares reductores por espectrofotometría y se obtuvo un porcentaje máximo de 5,2 % p/v, también se analizaron los sólidos solubles totales por refractometría a una temperatura de 22 ° C y la concentración máxima fue de 10,9 ° Brix. Así mismo, se analizó la acidez por volumetría con NaOH 0,1 M y el máximo resultado fue de 0,27%. Para finalizar se midió el pH por potenciometría a 22° C y se obtuvo un valor mínimo de 5,6 y máximo de 5,98.

A continuación se utilizó el jugo de naranja *Citrus sinensis* puro, como sustrato en una fermentación discontinua anaeróbica láctica, se inoculó al 5 % con la cepa referenciada ATCC 7830 de *Lactobacillus delbrueckii*; El análisis de ácido láctico en el fermentado se hizo por HPLC. De los resultados se concluyó que el jugo de naranja criolla *Citrus sinensis* es viable para la producción de ácido láctico L (+) por biosíntesis con *Lactobacillus delbrueckii*.

Palabras clave: Ácido láctico, naranja "criolla", azúcares reductores, *Lactobacillus delbrueckii*

Biosynthesis of lactic acid L (+) through the use of 'Criolla' orange juice, *Citrus sinensis*, within a fermentation process with *Lactobacillus delbrueckii*.

ABSTRACT

This research aims to assess the feasibility of the production of lactic acid L (+) through the use of 'Criolla' orange juice, *Citrus sinensis*, in a fermentation process with *Lactobacillus delbrueckii*.

A physical-chemical analysis was done to orange juice, an analysis of reducing sugars was conducted by spectrophotometry, with a maximum result of 5,2 % p/v; as well as an analysis of total soluble solids by refractometry at a temperature of 22 °C and the maximum concentration was 10,9 °Bx; and an analysis of acidity by volumetry with 0,1 M NaOH, with a maximum result of 0,27 %; finally, pH was measured by potentiometry at 22 °C, a minimum value of 5.6 and a maximum of 5.98 was obtained.

Subsequently, pure *Citrus sinensis* orange juice was used as a substrate in a discontinuous anaerobic lactic fermentation, and it was inoculated at 5 % with the reference strain *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830; The analysis of lactic acid in the fermented juice was carried out by HPLC.

Based on the results, it was concluded that *Citrus sinensis* orange juice is feasible for the production of lactic acid L (+) by biosynthesis with *Lactobacillus delbrueckii*.

Key words: Lactic acid, "criolla" orange, reducing sugars, *Lactobacillus delbrueckii*.

1. Introducción

La producción de polímeros a partir de precursores producidos por el procesamiento de derivados petroquímicos, causa grandes daños al medio ambiente

e implica grandes costos para la industria. Esta situación conlleva a los investigadores a la búsqueda de procesos de producción amigables con la naturaleza y a la exploración de métodos más eficientes y económicos que brinden garantías de sostenimiento a la industria química. La biotecnología es una alternativa sustancial para resolver esta contrariedad ya que esta hace uso

* Autor de correspondencia.
E-mail: hemahego1@hotmail.com.

Cómo citar este artículo:

Benítez H. M. y Moncayo Martínez L. (2016). Biosíntesis de ácido láctico l (+) a partir de naranja "criolla" *Citrus sinensis* en un proceso fermentativo con *Lactobacillus delbrueckii*. Revista Vector, 11: 39-50.

de microorganismos eficientes capaces de transformar diferentes sustratos en metabolitos que sirven como materia prima en diversos procesos de producción industrial a bajo costo, con mayores rendimientos y sin causar daño al ambiente (Serna & Rodríguez, 2005).

La biosíntesis a través de la fermentación de residuos orgánicos ricos en carbohidratos, con microorganismos que tienen rutas metabólicas específicas, constituyen la base de nuevos procedimientos para la producción del ácido láctico L (+); este compuesto tiene gran relevancia en la actualidad puesto que constituye el monómero precursor fundamental para producir ácido poliláctico (PLA) (Rivas, *et al.*, 2004).

El PLA presenta propiedades especiales en el campo ambiental y en el campo de la medicina como material biodegradable, bioabsorbible y biocompatible en procedimientos médicos como implantes, estructuras para fijación en fracturas e hilos para suturas, entre otras funciones (Fernández, 2016).

El PLA tiene un alto costo comercial debido a que la producción de su precursor el ácido láctico L(+), se ha efectuado por síntesis química a partir de acetaldehído con ácido cianhídrico; este proceso tiene altos costos de producción, en contraste con el poco rendimiento y la baja pureza del producto; debido a este factor la producción y utilización de PLA se ha visto muy limitada en la actualidad. (Goha, *et al.*, 2016).

La importancia del ácido láctico L (+) para la producción de PLA llevó esta investigación a la búsqueda de un microorganismo con una ruta metabólica específica que garantizara la producción de este y no de su isómero el ácido láctico D (-) o la mezcla racémica de ellos, por consiguiente se llegó al reconocimiento de las bacterias ácido lácticas en especial al *Lactobacillus delbrueckii* (Özcelika, *et al.*, 2016).

El ácido láctico además tiene múltiples aplicaciones en la industria de los alimentos, los textiles, medicamentos, cosméticos entre otras actividades (Fernández, 2016).

En el presente estudio se puso en práctica la fermentación batch como técnica biotecnológica para la producción de ácido láctico L (+) y se analizó la viabilidad fisicoquímicas del jugo de naranja *Citrus sinensis* como sustrato para la biosíntesis de ácido láctico L (+) con *Lactobacillus delbrueckii*, además se analizó el producto por HPLC.

2. Metodología

Se analizaron parámetros fisicoquímicos del jugo de naranja “criolla” *Citrus sinensis*, tales como pH, °brix, azúcares reductores y acidez titulable, empleando las técnicas de: potenciometría, refractometría, espectrofotometría y titulación

ácido-base respectivamente. Para garantizar la reproducibilidad del método, todos los análisis se realizaron por triplicado con un permanente control de variables, analizando parámetros estadísticos como la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (C.V).

Al producto obtenido de la biosíntesis del ácido láctico se le determinó el contenido de ácido láctico L (+), por cromatografía líquida (HPLC). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianzas (ANOVA) a una sola vía.

2.1 Primera Fase

En esta etapa se determinó la variedad de naranja indicada para el presente estudio, se optó como base de la selección, tener en cuenta las variedades más comunes para la producción y consumo de la región cafetera, como son la naranja valencia, naranja navel u ombligona y la naranja “criolla” (Ministerio, 2005)

Para la selección de la variedad de naranja, se realizó un análisis discriminativo organoléptico con una prueba sensorial según protocolo de Rodríguez y colaboradores (2010) Para la toma de muestras, se tuvo en cuenta la naranja en los diferentes estados de maduración que van de 1 a 6, según la carta de color NTC 408 de la norma técnica colombiana. (ICONTEC, 1997) Se tuvo en cuenta como parámetros a evaluar el mayor grado de dulzura y menor grado de acidez en el jugo de las naranjas seleccionadas y además se controlaron factores de apariencia para evitar resultados subjetivos, a su vez la población seleccionada debía tener condiciones óptimas de salud y sensibilidad para la prueba y no ser menor de 25 individuos.

Los frutos se recolectaron en la finca Santa Teresa de la vereda Murrupal del municipio de Filadelfia Caldas, el cual se encuentra a una altura de 1550 msnm; con una temperatura promedio de 23 °C y una humedad relativa de 78 %. Para la recolección se tuvo en cuenta que los frutos hubiesen alcanzado la madurez de consumo (Minguez & Hornero, 2002) estos se recolectaron manualmente, el horario de recolección fue en horas de la mañana, evitando temperaturas extremas; el corte del pedúnculo se hizo respetando un centímetro después de la unión al fruto para no dar cabida a contaminaciones del tallo, el embalaje se hizo separando cada fruto en envolturas de papel, los cuales se almacenaron en una cubierta de cartón que permitiera la circulación de aire; para mantenerlos a baja temperatura (Zhao, *et al.*, 2011).

2.1.1. Análisis fisicoquímico del sustrato

Este análisis se le aplicó a la naranja “criolla” en cada uno de los seis estados de maduración

para los parámetros determinantes en un proceso de fermentación. Los azúcares reductores del jugo de naranja criolla *Citrus sinensis* se analizaron por espectrofotometría con DNS siguiendo protocolo de Ávila y colaboradores en (2012)

Para esto se realizó por triplicado una curva de calibración utilizando como estándar glucosa grado analítico a partir de una solución stock de 1 mg/ml. Inicialmente se preparó una solución stock a partir de 1g de glucosa el cual se disolvió en 500 ml de agua; se aforó a un volumen final de 1000 ml, a partir de esta se prepararon las disoluciones a las concentraciones requeridas para el análisis. Posteriormente se prepararon 200 ml de reactivo DNS a partir de una primera solución, para la cual se pesaron 2g de NaOH y se disolvieron en 50 ml de agua en agitación continua; posteriormente se agregaron 2g de ácido 3,5 Dinitrosalicílico y se dejó disolver completamente por calentamiento. A continuación se preparó una segunda solución; en 100 ml de agua, se disolvieron 40g de tartrato de sodio y potasio en agitación continua. Finalmente se mezclaron ambas soluciones y se aforó

a 200 ml con agua destilada. Una vez preparado el reactivo se almacenó en un recipiente color ámbar y se mantuvo a temperatura ambiente por un término máximo de un mes que permanece sin descomponerse (Ávila, 2012).

Para obtener los datos de la curva de calibración se agregaron 500 µl de cada disolución stock y 500 µl de DNS y se llevó a ebullición en un baño de maría durante exactamente 5 minutos. Posteriormente se agregaron 5 ml de agua destilada fría para obtener un volumen final de 6 ml. Se tomó 1 ml en las celdas de análisis y se leyó la absorbancia a 540 nm. Para el análisis se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis chemstation.

El porcentaje de acidez en el jugo de naranja “criolla” se determinó mediante una titulación ácido—base. En el procedimiento se utilizó una micropipeta de 5 ml, utilizando fenolftaleína como indicador e hidróxido de sodio (NaOH 0.1 M) como agente titulante, se utilizó un volumen de 5 ml de jugo. Para hallar el porcentaje de ácido cítrico se realizó el tratamiento matemático según la ecuación 1.

(Ecuación 1)

$$\text{Porcentaje de ácido cítrico} = \frac{(\text{ml NaOH})(\text{MOH})(\text{meq.ac. cítrico})100}{V \text{ muestra}}$$

El margen de error se minimizó haciendo el control del pH con potenciómetro marca HASH HQ 40 D en el valor limitante inferior de detección de la fenolftaleína, 8.2.

Los sólidos solubles totales (°Brix) se analizaron por refractometría, se utilizó un refractómetro Mettler Toledo, se tomaron muestras de jugo de naranja “criolla” en los seis estados de maduración y se filtraron en un tamiz de poro 106 µm para retirar materiales en suspensión, las mediciones se hicieron a una temperatura de 20 °C; el pH se determinó por potenciometría utilizando un potenciómetro HASH HQ 40 D a una temperatura de 22 °C.

2.2 Segunda Fase

Para el proceso de fermentación del jugo de naranja “criolla”, como sustrato, se utilizó la cepa referenciada ATCC 7830 pase 4 de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie lactis (Balows, 2003). Se adquirió un Kwik—stik de la casa comercial Microbiologics, con registro y certificación internacional de pureza con pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes, este se encontraba en estado de

liofilización y se mantuvo en cadena de frío entre 2—8 °C hasta su uso. Por recomendación del proveedor de la cepa, el medio de cultivo utilizado en los diferentes procedimientos fue el caldo y agar MRS.

Para la activación de la cepa se realizó procedimiento según protocolo de Balows y colaboradores (2003) se hidrató el liofilizado con 10 ml de agua peptonada, para preparar la cepa de reserva se prepararon 100 ml de agar MRS distribuidos en 6 cajas de petri y 1 caja con 15 ml de agar nutritivo, todas estas se inocularon por estría directamente con el hisopo, también se prepararon 5 tubos de ensayo con 10 ml de caldo MRS cuya inoculación se hizo por suspensión; después se llevan las cajas con agar a incubación a 37° C durante 48 horas, por su parte los tubos con caldo MRS se ponen en una incubadora orbital a 120 rpm y la misma temperatura para garantizar la homogenización de la mezcla.

De este procedimiento se obtuvo un único subcultivo de la cepa de referencia conocido como cepas de reserva, el cual se almacenó en viales debidamente etiquetados y se llevaron a enfriamiento entre – 10 °C y 0 °C, utilizando glicerol como agente

crio protector; seguidamente se llevó a cabo la siembra de la cepa, durante esta etapa se prepararon 250 ml de caldo MRS, etiquetados como cepa de trabajo; fueron inoculados al 5 % con la cepa de reserva, se utilizó este medio para el cultivo de la cepa, en vista que durante la etapa de activación se obtuvieron los mejores resultados de crecimiento.

Adicionalmente a partir de la cepa de trabajo se prepararon 750 ml de cultivo, distribuidos en tres Erlenmeyers de 250 ml; este material se mantuvo almacenado entre 2 y 8 °C, como material de trabajo durante las siguientes etapas de la investigación.

Para garantizar la pureza de cada cultivo se verificó la morfología del *Lactobacillus delbrueckii* en forma de bastoncillo, para ello se efectuó una tinción de Gram de acuerdo con protocolo de Aquiahuatl y colaboradores (2012) posteriormente se analizaron en el microscopio con una resolución 1000 X.

2.2.1. Preparación del sustrato y adaptación de la cepa.

Para poder iniciar el cultivo de la cepa en el jugo de naranja se hizo un proceso de adaptación gradual, este se aplicó en los estados de maduración 5 y 6 del jugo de la naranja “criolla” debido a que en los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico realizado en la fase 1, se determinó que en dichos estados de maduración, la naranja “criolla” tiene las condiciones más favorables para el proceso de fermentación con *Lactobacillus delbrueckii*. Posteriormente se realizó una extracción mecánica del jugo con una exprimidora eléctrica luego se filtró en muselina para extraer el material sólido, seguidamente se centrifugó a 7000 rpm durante cinco minutos y se pasó por el tamiz de acero inoxidable de 106 µm de poro, para eliminar partículas en suspensión.

Después de retirar las impurezas en el jugo, este se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 atmosferas de presión por 15 minutos, a continuación se realizó una disolución con caldo MRS al 80 % v/v, luego se inoculó con la cepa de trabajo al 5 % v/v, finalmente se llevó a incubación a 37°C durante 48 horas. De manera semejante este proceso se repitió progresivamente, aumentando la disolución cada vez en un 20 %, hasta alcanzar una inoculación al 100 % v/v de sustrato puro con *Lactobacillus delbrueckii*.

Para la fermentación del jugo de naranja “criolla” *Citrus sinensis* se aplicó un proceso discontinuo (Batch) como biorreactor se utilizaron 3 Erlenmeyers de 1 litro y un control o testigo que contenía caldo MRS para garantizar la inocuidad en el medio. Estos constituían un sistema anaeróbico cerrado, cada uno con 0,5 litros de jugo de naranja “criolla” puro, como sustrato; el cual fue esterilizado previamente a 121 °C y 15 atmosferas de presión durante 15 minutos, se inoculó al 5 % v/v

con *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830, el tiempo de fermentación fue de 60 horas a 37 °C y 120 rpm en una incubadora orbital.

El análisis de ácido láctico en el fermentado se realizó por HPLC, se tomaron muestras en intervalos de 4 horas utilizando como trampa un equipo de venocllisis conectado a una jeringa para evitar la contaminación. Se preparó la curva de calibración con 5 puntos en un rango de 100 y 20.000 ppm a partir de una solución stock 20 g/l (20000 ppm) preparada previamente con agua tipo 1, como estándar se utilizó la mezcla racémica de ácido láctico grado analítico, que contiene el isómero L (+) 95 % y D (-) 5 %, con certificación de PANREAC APPLY CHEM. Se tomaron 1.5 ml de cada disolución dispuesta en viales roscados para HPLC. Las muestras se leyeron en un cromatógrafo Shimadzu SPD—M20A con bomba LC 20AT con detector ultravioleta visible con arreglo de diodos a una longitud de onda (λ) de 210 nm, se utilizó como fase estacionaria, una columna C 18 en fase reversa de 25 cm de longitud y un diámetro de 4,6 mm; como fase móvil se mezcló una relación del 40% de metanol en la línea A y 60% en la línea B de agua acidulada con ácido fórmico al 0,05 % v/v en modo isocrático. Se inyectaron 10 µl en un flujo de 0,6 µl por minuto en un tiempo de corrida de 12 minutos a una temperatura 30 °C y una presión de 1400 psi.

Para la preparación de las muestras se tomaron 5 ml de jugo fermentado de cada una de las réplicas a través de un jeringa ubicada en el extremo del venocllisis, cada muestra se centrifugó en tubos Falcon de 15 ml a 7800 rpm durante 5 minutos en una centrifuga Eppendorf referencia 5430, posteriormente las muestras se filtraron en un tamiz de acero inoxidable de 106 µm para retirar las partículas en suspensión y luego se filtraron de nuevo en filtros para jeringa de 22,5 µm para retirar material celular de *Lactobacillus delbrueckii*; luego se diluyó cada muestra en agua tipo 1 y finalmente se tomaron 2 ml en viales roscados para HPLC y se llevan al equipo para su análisis. Para constatar el comportamiento de los azúcares reductores durante la fermentación, se hizo un análisis de la concentración de estos paralelamente al análisis del ácido láctico utilizando las mismas condiciones del análisis de azúcares en el jugo de naranja “criolla”.

3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos durante la prueba sensorial de las variedades de naranja valencia, navel y “criolla” determinaron que esta última fue la más aceptada por su alto grado de dulzura y baja acidez, en una relación matemática de 24/30 individuos, mientras que para las variedades de navel y valencia fue de 3/30 individuos (Figura 1).

Considerando que existe una relación directa entre los parámetros de acidez y dulzura con parámetros fisicoquímicos como azúcares reductores y el pH

(Varcha & Nampoothiri, 2016), se optó por seleccionar esta variedad para el proceso fermentativo.

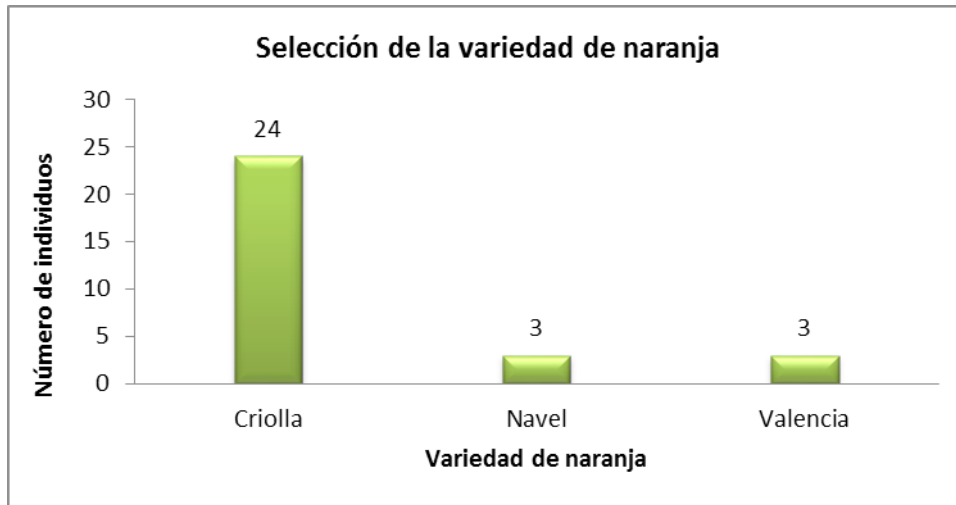


Figura 1. Análisis sensorial del jugo de variedades de naranja.

De la curva de calibración realizada para el análisis de los azúcares reductores se obtuvo la ecuación para cuantificar los azúcares reductores (figura 2).

Ecuación 2

$$Y = 0,3915 X + 0,3705 \text{ Para un } R^2 \text{ de } 0,989$$

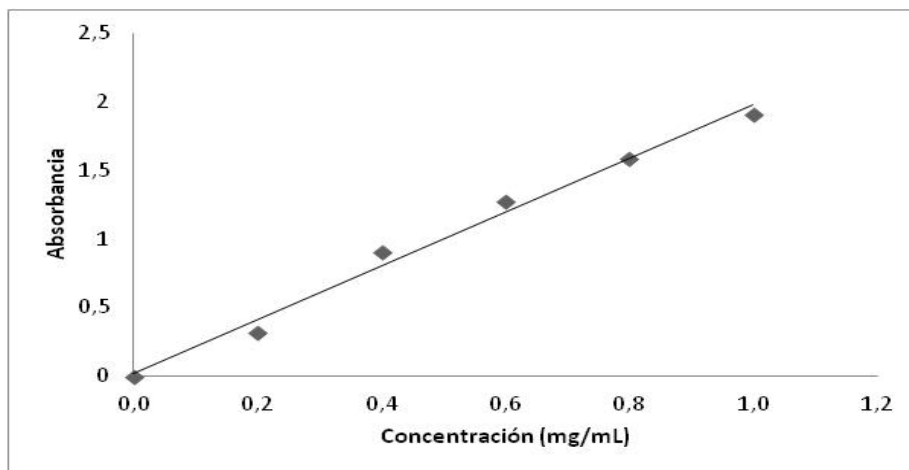


Figura 2. Curva de calibración para azúcares reductores.

De acuerdo con los resultados obtenidos para este análisis, la concentración de los azúcares reductores se incrementa a medida que el fruto va madurando, lo que indica que los frutos con mayores contenidos se encuentran en el mayor estado de maduración (Tabla 1)

La naranja “criolla” puede presentar maduración precoz (Duran & Saavedra, 2010) y por lo tanto este factor puede influir en el contenido de azúcares en un mismo estado de maduración, lo cual puede explicar la dispersión obtenida en este estudio

Tabla 1. Análisis de azúcares reductores en el sustrato sin fermentar.

Estados de maduración	Concentración (g/L)			M _{ed} [g/L]	S	C.V (%)
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3			
1	24,87	56,25	35,73	35,73	15,89	40,8
2	36,37	54,25	30,62	36,37	12,32	30,5
3	29,98	55,50	48,86	48,45	13,11	29,5
4	49,78	42,75	51,05	42,75	4,47	9,3
5	42,75	52,97	54,88	52,97	6,52	13,0
6	36,37	38,92	82,98	38,92	26,21	49,7

M_{ed}: mediana, s: desviación estándar, C.V: coeficiente de variación

Los resultados del análisis de la acidez del jugo de naranja “criolla” *Citrus sinensis* demostraron que la concentración de estos disminuye en los mayores estados de maduración; razón por la cual la recolección de frutos en época de producción para extraer el jugo para la fermentación, se debe de hacer bajo este

criterio para favorecer el crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii*. Con valores inferiores al 5 % en el coeficiente de variación y de 0,05 para la desviación estándar, se concluyó que la dispersión de los datos de esta prueba fue baja (Figura 3).

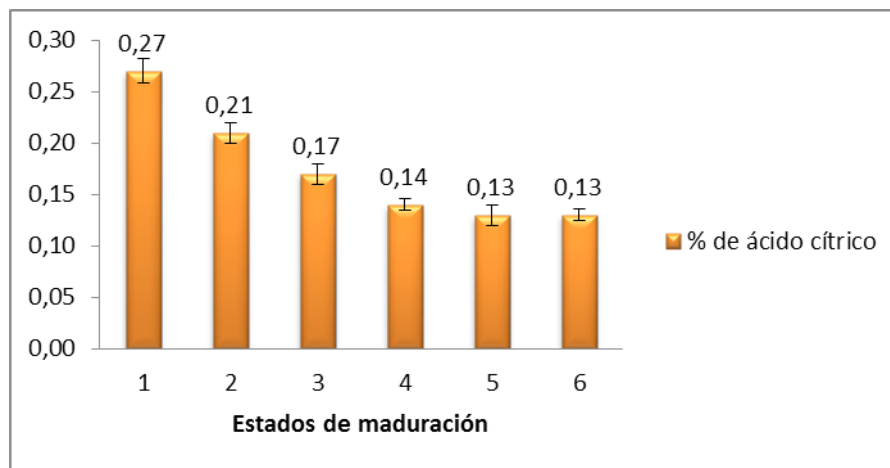


Figura 3. Concentración de ácidos en la naranja "criolla" *Citrus sinensis*

Los valores obtenidos para los °Brix, varían en un rango de 7,30 para el menor estado de maduración a 10,90 para el mayor estado. Los coeficientes de variación

(C.V) fueron inferiores al 4 %, lo que demuestra una buena reproducibilidad del método aplicado. (Tabla 2)

Tabla 2. Sólidos solubles totales naranja "criolla"

Estados de maduración	° Brix				S	C.V (%)
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	_ ° Brix		
1	7,50	7,00	7,40	7,30	0,26	3,6
2	7,39	7,49	7,69	7,52	0,15	2,0
3	7,51	7,85	7,88	7,75	0,21	2,7
4	9,34	9,56	9,40	9,43	0,11	1,2
5	10,4	9,80	10,3	10,2	0,32	3,1
6	10,8	11,0	11,0	10,9	0,12	1,1

_ : Promedio, s: desviación estándar, C.V: coeficiente de variación.

El pH del jugo de naranja "criolla" esta distribuidos en un rango de 5,6 y 6,0 esto no es lo habitual para la familia de los cítricos, pero constituye un factor ideal para el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* en un proceso de fermentación (Visintina, 2016). (Tabla 3)

Tabla 3. pH del jugo de naranja "criolla" *Citrus sinensis*

Estados de maduración	pH				S	% C.V
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	_ pH		
1	5,42	5,65	5,73	5,60	0,16	2,9
2	5,79	5,66	5,84	5,76	0,09	1,6
3	5,82	5,88	5,68	5,79	0,10	1,8
4	5,76	5,82	5,91	5,83	0,08	1,3
5	5,87	5,90	5,80	5,86	0,05	0,9
6	6,03	6,00	5,92	5,98	0,06	0,9

_ : Promedio, s: desviación estándar, %C.V: porcentaje del coeficiente de variación.

De acuerdo con los resultados observados también podemos agregar, que el pH de la naranja "criolla" es alto con relación a otras variedades conocidas. Según el análisis fisicoquímico de Avalo y colaboradores (2009) para la naranja *Citrus sinensis*, encontró un pH de 3,63; mientras que para la variedad de naranja "criolla" se obtuvo un valor mínimo de 5,6 y máximo de 5,98; siendo este ideal para el crecimiento del *Lactobacillus* (Samaniego & Sosa, 2000.)®

Para la cuantificación del ácido láctico en el proceso de fermentación se obtuvo la curva de calibración con su respectiva ecuación. Los valores de las áreas resultantes mostraron una baja variabilidad según C.V y S, lo que permite asegurar la precisión de los resultados obtenidos por este método. (Figura 4)

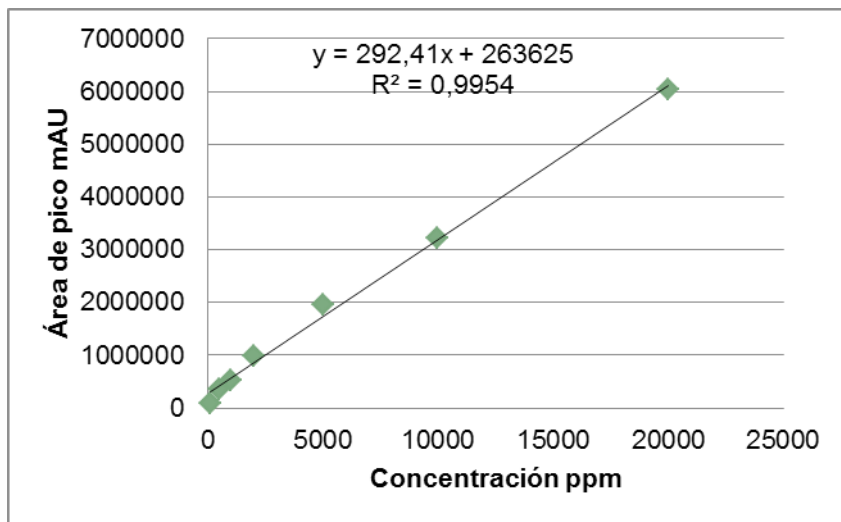


Figura 4. Curva de calibración para ácido láctico.

Por otra parte, del análisis del cromatograma del estándar del ácido láctico, se identificaron tres picos (figura 5)

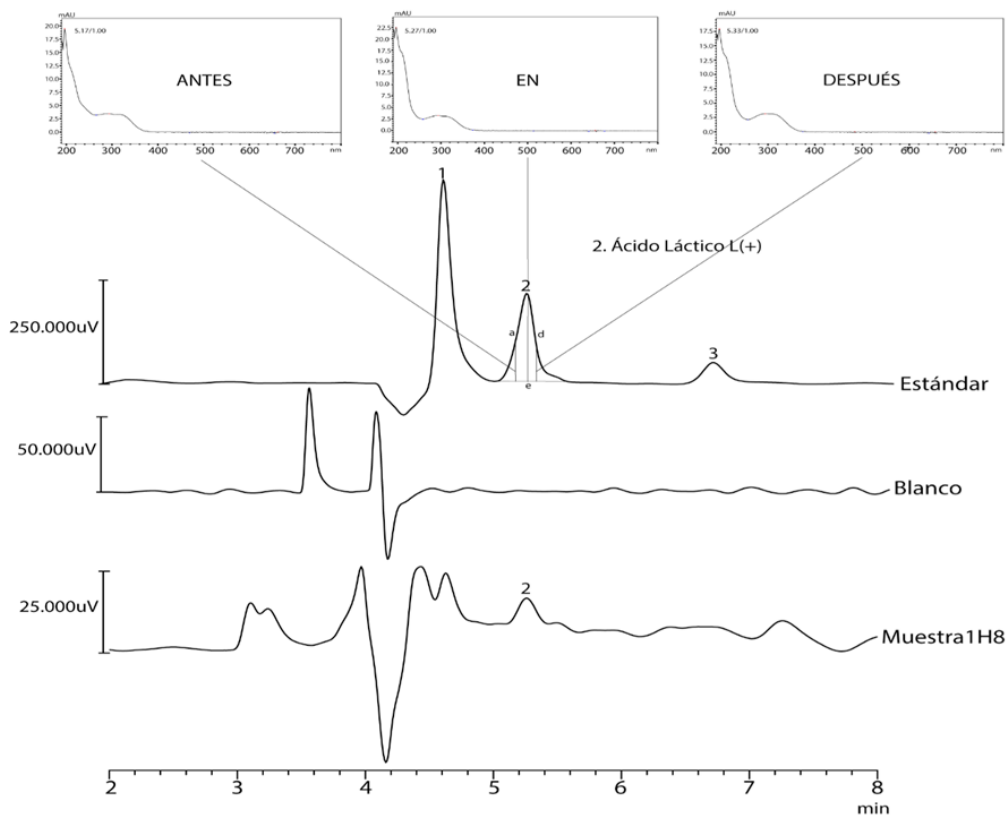


Figura 5. Cromatogramas ácido láctico

Después de realizar un análisis en simultáneo de los Cromatogramas de muestra, blanco y estándar, estableciendo la pureza de pico, se determinó que el primer y tercer pico correspondían a una mezcla desconocida debido a que sus índices de pureza (< 20%) y espectros visualizados antes, en y después de la cima de los picos eran diferentes para ambos casos. El segundo pico coincidía con el isómero L (+) que estaba contenido en una proporción del 95 % en el estándar y el cual, en el estudio de pureza de pico obtuvo un valor superior a 95 % y sus espectros visualizados en cualquier zona del pico si coincidían entre sí. El tercer pico incluso puede corresponder a las impurezas contenidas en el estándar.

Igualmente se logró la identificación del analito de interés, primero y como se indicó anteriormente, al analizar la pureza de pico (>95%) y su espectro corresponde con el del analito ácido láctico L (+), adicionalmente su calibración arrojó un coeficiente de correlación (R²) superior a 0,99. Además, se conoce que el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* es selectivo para este compuesto y por lo tanto las muestras sometidas al proceso de fermentación ratificaron

su presencia en un tiempo de retención (tR) de 5,11 minutos, de un tiempo total de corrida de 12 minutos, este tR permitió identificar los picos correspondientes al ácido láctico L (+) en el análisis de las muestras del fermentado de jugo de naranja criolla *Citrus sinensis* con *Lactobacillus delbrueckii*. Los resultados experimentales obtenidos en las tres réplicas del análisis del ácido láctico, muestran altos valores en los coeficientes de variación (C.V) en la mayoría de los casos, debido probablemente a variaciones en las condiciones de fermentación en cada uno de los biorreactores. Existen estudios en los que se ha observado que los Erlenmeyer utilizados como biorreactores, debido a su forma, puede presentar zonas muertas que impiden un proceso de fermentación homogéneo en su interior (Saddoud, *et al.*, 2010).

Por otro lado, se pudo establecer que el proceso de fermentación de jugo de naranja "criolla" *Citrus sinensis* con *Lactobacillus delbrueckii* tuvo un rendimiento entre 1,22 y 18,88 g/L de ácido láctico entre las 4 y las 60 horas del muestreo, con un rendimiento máximo de 24,88 g/L en la hora 44. (Figura 6)

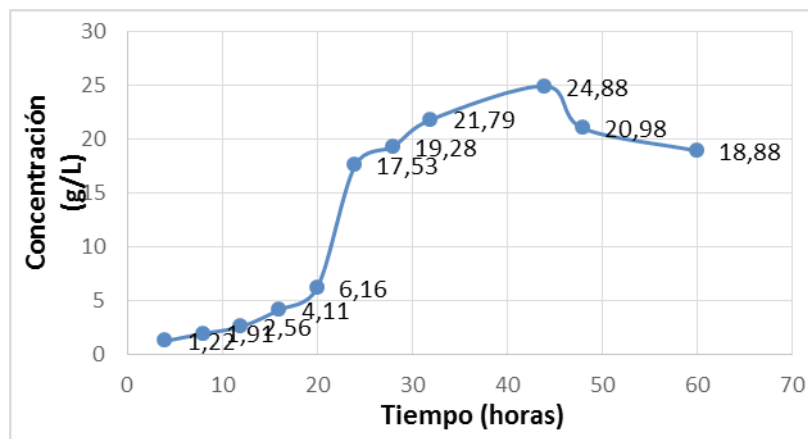


Figura 6. Biosíntesis del ácido láctico

Los datos sobre la curva de la crecimiento del ácido láctico en el fermentado del jugo de naranja "criolla" nos permiten ver un incremento en la biosíntesis del mismo durante el proceso de fermentación con *Lactobacillus delbrueckii* a través del tiempo.

También se pudo observar que durante las primeras 20 horas la biosíntesis del ácido fue lenta, debido a que en este periodo de tiempo el microorganismo se encontraba en estado de latencia, generando concentraciones entre 1,22 y 6,16 g/L de ácido láctico; entre las 20 y las 24 horas siguientes la biosíntesis de ácido se elevó sustancialmente, debido a que

este periodo de tiempo corresponde con la fase de crecimiento logarítmica del microorganismo, en la cual consume proporcionalmente el sustrato y así mismo elabora el producto de la fermentación (Orozco & Solarte, 2003) finalmente entre la 24 a la hora 44 de la fermentación, se alcanzó el máximo de formación del producto (24,88 g/L), este periodo corresponde con la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo donde el aumento de biomasa ha alcanzado su máximo punto de crecimiento; a partir de la hora 48 hasta la hora 60, se inició su fase de muerte y en consecuencia la disminución de biosíntesis de ácido láctico.

Del análisis de varianza realizado a los datos del proceso de fermentación se determinó que al menos en una de las réplicas el promedio de las áreas de un nivel de tiempo a otro es diferente en un 95 % de confiabilidad. Para determinar qué medias fueron significativamente diferentes se realizó la prueba de

Tukey, la cual dio como resultados 4 momentos de variabilidad en las medias, formando 4 grupos de datos homogéneos. Estos resultados confirmaron las cuatro fases del modelo de fermentación batch. 1) Fase de latencia, 2) fase exponencial, 3) fase estacionaria y 4) fase de muerte. (Tabla 4)

Tabla 4. Prueba de Tukey

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Tiempo	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos	
4	3	635454,0	X	
8	3	787231,0	X	
12	3	1,29357E6	X	X
16	3	1,46436E6	X	X
20	3	2,06533E6	X	
60	3	5,65774E6	X	
24	3	5,75297E6	X	X
28	3	6,05971E6	X	X
48	3	6,39934E6	X	X
32	3	6,44882E6	X	X
44	3	6,78353E6	X	

Por otra parte durante el análisis del consumo de azúcares reductores en la fermentación, se pudo concluir que los parámetros estadísticos indican una alta variabilidad en el método durante el análisis de aproximadamente el 50% de las réplicas para azúcares reductores. Estos resultados concuerdan con la variabilidad del método durante el análisis del ácido láctico; lo cual ratifica que el proceso de fermentación fue heterogéneo en cada uno de los tres biorreactores, como sucedió en la biosíntesis del ácido láctico L (+) y por lo tanto, la formación del producto y el consumo de azúcares no fue igual en todos los puntos de cada biorreactor.

Según Orozco y Solarte (2003) el modelo de fermentación batch, sigue una ruta metabólica por glucólisis clásica de Embden-Meyerhof, la cual indica que los azúcares reductores disminuyen a medida que se forma el ácido láctico; en contraste con esta teoría, durante la fermentación del jugo de naranja "criolla" *Citrus sinensis*, la curva mostró una tendencia diferente, hubo un aumento de azúcares reductores durante las primeras 25 horas de fermentación, luego hubo una disminución hasta la hora 30, posteriormente la tendencia fue a mantenerse constante entre la hora 30 y la 48 y finalmente disminuyen sobre la hora 60 (Figura 7).

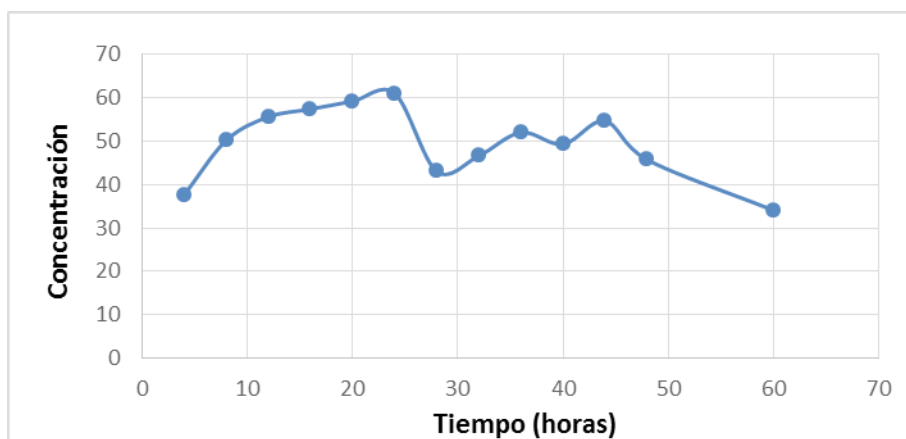


Figura 7. Consumo de azúcares reductores en la fermentación

Este fenómeno se puede explicar, porque paralelo al proceso de fermentación se presenta un proceso de hidrólisis ácida de azúcares no reductores (sacarosa) contenidos en el jugo de naranja "criolla" *Citrus sinensis*, que los convierte en azúcares reductores (glucosa y

fructosa). Para corroborar esta hipótesis se hizo el análisis de la concentración de azúcares reductores antes y después del proceso de esterilización y se comprobó un aumento del 76,6% de ellos (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la esterilización en la concentración de azúcares reductores en el jugo de naranja "criolla"

Sustrato no esterilizado					Sustrato esterilizado				
Réplicas	Conc. (g/L)	-	s	C.V (%)	Réplicas	Conc. (g/L)	-	s	C.V (%)
Réplica 1	18,64				Réplica1	32,40			
Réplica 2	18,80	18,68	0,01	5,6	Réplica 2	32,80	33,00	0,72	2,2
Réplica 3	18,60				Réplica 3	33,80			

_: Concentración promedio (g/L), s: Desviación estándar, C.V: coeficiente de variación.

Cabe anotar que el proceso de hidrólisis no está limitado por un mínimo de temperatura, solo se requiere un aumento de la misma y un medio ácido (Adjednovic & Jovanovic, 2012) por lo tanto este resultado se puede homologar para el proceso de fermentación.

En definitiva, se concluyó que se presentó un balance dinámico entre los azúcares reductores consumidos por el microorganismo en sus diferentes etapas de crecimiento y los azúcares que se forman por la hidrólisis de la sacarosa.

4. Conclusiones

El jugo de naranja "criolla" *Citrus sinensis* es viable como sustrato para la producción de ácido láctico L (+) por vía fermentativa con *Lactobacillus delbrueckii* ya que los parámetros fisicoquímicos varían durante su proceso de maduración, favoreciendo las condiciones de crecimiento de este microorganismo, alcanzando un rendimiento máximo de 24,88 g/L en la hora 44; además el proceso de fermentación del jugo de naranja "criolla" *Citrus sinensis* se ajustó al modelo matemático de la fermentación batch con relación a la biosíntesis del ácido láctico; caso opuesto sucedió con el consumo de los azúcares reductores, puesto que no mantiene la tendencia del modelo; este fenómeno se puede explicar por la formación continua de azúcares reductores debido a la hidrólisis ácida de azúcares no reductores presentes en el sustrato como la sacarosa, esto permite mantener un balance dinámico frente al consumo.

5. Bibliografía

- Adjednovic, B. & Jovanovic, J., 2012. A comparative kinetics study on the isothermal heterogeneous acid-catalyzed hydrolysis of sucrose under conventional and microwave heating. [En línea] Pages 70–77 Volume 356]. Available at: doi:10.1016/j.molcata.2011.12.027
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R. & Marluay, C., 2012. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en agave cocuy trelease. [En línea] Available at: <http://www.redalyc.org/articulo.oa>
- Balows, A. Murray, E. Jorgenson, J. Pfaller, R. Tenover, H., 2003. Manual of clinical microbiology 8th edition: P. R.. [En línea] Available at: doi:10.1016/S0732-8893(03)00160-3
- Duran, L. & Saavedra, E., 2010. Productora y comercializadora de naranja y sus variedades.. [En línea] Available at: <http://hdl.handle.net/123456789/5224>
- Fernández, K. Aburto, J. Plessing, C. Rockela, M. Aspea, E., 2016. Factorial design optimization and characterization of poly-lactic acid (PLA) nanoparticle formation for the delivery of grape extracts. [En línea] Available at: doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.083
- Goha, Y.-f., Akrama, M. & Alshemarya, A., 2016. Antibacterial poly(lactic acid)/chitosan nanofibers decorated with bioactive glass. [En línea] Available at: doi:10.1016/j.apsusc.2016.06.054
- ICONTEC, 1997. NTC 4086. Frutas frescas. naranja valenciana. especificaciones.. [En línea] Available at: <http://libreria.universia.net.co/ntc-4086-frutas-frescas-naranja-valenciana-especificaciones>.
- Minguez, F. & Hornero, A., 2002. Analysing changes in fruit pigments. [En línea] Available at: doi:10.1533/9781855736672.2.248
- Orozco, M. & Solarte, J., 2003. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención de ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa.. [En línea] Available at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/982/>
- Özcelik, S., Kuleyb, E. & Özogul, F., 2016. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. [En línea] Available at: doi:10.1016/j.lwt.2016.06.066
- Rivas, B., Moldes, A., Domínguez, J. & Parajó, J., 2004. Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation. [En línea] Available at: doi:10.1016/j.enzmictec.2004.01.011

- Rodríguez, M., López, C., Barbagelata, R. & Bardad, N. 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025
- Ministerio de agricultura y desarrollo. 2005. La cadena de cítricos en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. [En línea] Available at: <http://hdl.handle.net/11348/6323>
- Saddoud, A. Sari, T.; Rapaport, A.; Lortie, R.; Harmand, J.; Dubreucq, E. 2010. A mathematical study of an enzymatic reaction in non homogeneous reactors with substrate and product inhibition: application to cellobiose hydrolysis in a bioreactor with a dead-zone. [En línea] Available at: doi:10.3182/20100707-3-BE-2012.0043
- Samaniego, L. & Sosa, M., 2000.. *Lactobacillus* spp: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora.. [En línea] Available at: <http://biblos.uamerica.edu.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=565643>
- Serna, C. & Rodríguez, S., 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico=Estado del arte [En línea]. 5Num 1 pp. 54-65 Ciencia tecnología y Sociedad alimentaria. <http://www.redalib.org/7articulo.oa?id=>
- Varcha, K. & Nampoothiri, K., 2016. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. [En línea] Available at: doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.032
- Visintina, S. Alessandria, V. Valenteb, A. Dolcia, P. Cocolina, L. 2016. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. [En línea] Available at: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.004
- Zhao, Y., Gong, L., Huang, Y. & Liu, C., 2011. Review on fruit harvesting method for potential use of automatic fruit harvesting systems. [En línea] Available at: doi:10.1016/j.proeng.2011.11.2514