

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Producción de ácido láctico a partir de *Bacillus Subtilis* en medios a base de proteína de suero de leche y melaza

Christian Alejandro Iza Santamaría

Ingeniería Química

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
INGENIERO QUÍMICO

Quito, 2 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Producción de ácido láctico a partir de *Bacillus Subtilis* en medios a base de
proteína de suero de leche y melaza**

Christian Alejandro Iza Santamaría

José Álvarez, PhD.

Quito, 2 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Christian Alejandro Iza Santamaria

Código: 00216165

Cédula de identidad: 1726785668

Lugar y fecha: Quito, 2 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

El ácido láctico es uno de los ácidos orgánicos con más usos a nivel industrial. Existen bacterias que pueden producir ácido láctico, como el *Bacillus subtilis* a partir de diferentes materias primas que funcionan como fuentes de carbono y nitrógeno. Sin embargo, los medios de cultivo convencionales son costosos, y el aprovechamiento de residuos o subproductos como la melaza, materia orgánica líquida, y la proteína presente en los desechos del suero de leche (WCP), se vuelve una alternativa más llamativa. El objetivo de este estudio fue producir ácido láctico a partir de *Bacillus subtilis* en medios de cultivo a base de melaza de caña de azúcar y suero de leche. El medio MT de fermentación fue modificado para implementar la melaza como sustituto de glucosa y WCP como sustituto de la peptona y extracto de levadura. Se diseñaron tres modelos de cultivos con diferentes formulaciones: uno reemplazando el 100% de glucosa por melaza, otro sustituyendo el 25% de peptona por WPC, y un tercero reemplazando el 25% de extracto de levadura por WPC. Se midió la producción de ácido láctico, consumo de azúcares, y cambios de pH durante el tiempo de cultivo, así como la concentración de nitrógeno al final del mismo. Los medios propuestos a base de WPC obtuvieron una producción de hasta 4 g/L y el medio de melaza paso por pretratamientos y obtuvo concentraciones más altas de ácido láctico, 12 g/L. El medio base MT de comparación obtuvo 3 g/L y por pretratamiento obtuvo 11 g/L. Para los medios propuestos, el consumo de azúcares fue del 92% finalizado el tiempo de cultivo de 48 horas y presentan un pH de hasta 5,5 en su pico máximo de concentración de ácido láctico. Los medios a base de WPC contiene un mayor porcentaje de fuentes de nitrógeno al final del tiempo de fermentación. *B. subtilis* es una bacteria que puede adaptarse al medio de cultivo a base de WPC y Melaza, son adecuados en la optimización en la producción de ácido láctico.

Palabras clave: bioprocesos, fermentación ácido láctico, residuos, valorización, bacteria.

ABSTRACT

Lactic acid is one of the most widely used organic acids at the industrial level. There are bacteria that can produce lactic acid, such as *Bacillus subtilis* from different raw materials that function as carbon and nitrogen sources. However, conventional culture media are expensive, and the use of residues or by-products such as molasses, organic liquid matter, and the protein present in whey waste (WCP), becomes a more attractive alternative. The objective of this study was to produce lactic acid from *Bacillus subtilis* in culture media based on sugar cane molasses and whey. The fermentation MT medium was modified to implement molasses as a glucose substitute and WCP as a substitute for peptone and yeast extract. Three culture models were designed with different formulations: one replacing 100% glucose with molasses, another replacing 25% peptone with WPC, and a third replacing 25% yeast extract with WPC. Lactic acid production, sugar consumption, and pH changes were measured during the culture time, as well as nitrogen concentration at the end of the culture. The proposed WPC-based media obtained a production of up to 4 g/L and the molasses medium went through pretreatments and obtained higher concentrations of lactic acid, 12 g/L. The comparison MT-based medium obtained 3 g/L and by pretreatment obtained 11 g/L. For the proposed media, the sugar consumption was 92% at the end of the 48-hour culture time and had a pH of up to 5.5 at its maximum peak lactic acid concentration. The WPC-based media contains a higher percentage of nitrogen sources at the end of the fermentation time. *B. subtilis* is a bacterium that can adapt to WPC and molasses-based media, which are suitable for optimizing lactic acid production.

Key words: bioprocesses, lactic acid fermentation, waste, valorization, bacteria.

DEDICATORIA

Para Elías, mi motivación más grande.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por ser mis pilares en mi formación académica y personal. Les debo mi vida y les honrare hasta que Dios me los permita.

Agradezco a mi tutor José Álvarez, por ser un excelente profesor, coordinador y amigo, que estuvo presente a lo largo de este proyecto.

Quiero agradecer a Andrés Lagos y Carolina Andino por su gran ayuda y apoyo durante mis análisis en los resultados de este proyecto.

Agradecer mucho al Departamento de Ingeniería Química que, sin este, no hubiese conocido excelentes personas y grandes amigos a lo largo de mi tiempo universitario.

Agradecer también mis hermanos y amigos que supieron apoyarme moralmente en los peores momentos.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	13
2.	METODOLOGÍA.....	17
2.1.	Producción de ácido láctico a partir de glucosa	17
2.2.	Producción de ácido láctico a partir de proteína de suero de leche	18
2.3.	Producción de ácido láctico a partir de melaza.....	19
2.4.	Análisis del contenido final de proteína en los medios de cultivo	19
2.5.	Determinación de azúcares reductores en MT, WMT1, WMT2, y MMT.	20
2.6.	Análisis de ácido láctico en los medios MT, WMT1, WMT2, y MMT.	21
3.	RESULTADOS	22
3.1.	Caracterización de materias primas (WPC y melaza)	22
3.2.	Reducción de azúcares en los medios WMT1, WMT2	23
3.3.	Reducción de azúcares en el medio MMT	24
3.4.	Acidez en los medios de fermentación.....	25
3.5.	Porcentaje de fuentes de nitrógeno disueltos en el medio MT1, WMT1 y WMT2	26
3.6.	Producción de ácido láctico a partir de glucosa	27
3.7.	Producción de ácido láctico a partir de proteína de suero de leche	27
3.8.	Producción de ácido láctico a partir de melaza.....	28
3.9.	Variación porcentual de ácido láctico en medios WMT1 y WMT2.....	29
4.	DISCUSIONES	31

5.	CONCLUSIONES.....	36
6.	RECOMENDACIONES.....	37
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
8.	ANEXOS.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reformulaciones de WMT1 y WMT2 en g/L	8
Tabla 3. Reformulación de MMT en g/L	9
Tabla 8. Porcentaje de fuentes de nitrógeno (N%) al inicio y final de las fermentaciones.....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de glucosa en (g/L) en función del tiempo de los medios de cultivo MT, WMT1, WMT2	23
Figura 2. Consumo de los azúcares reductores en (g/L) en función del tiempo de los medios de cultivo MT y MMT	24
Figura 3. Cambios en el nivel de acidez (pH) en los medios MT, WMT1, WMT2 y MMT en función del tiempo	25
Figura 4. Cambios en el nivel de acidez (pH) en los medios MT y MMT en función del tiempo durante 48 horas.....	26
Figura 5. Concentración de ácido láctico en función del tiempo en medios con formulaciones MT, WMT1 y WMT2	28
Figura 6. Concentración de ácido láctico en función del tiempo en medios con formulaciones MT y MMT	29
Figura 7. Variación porcentual de láctico en función del tiempo en medios con formulaciones MT, WMT1, WMT2 y MMT	30

1. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico es uno de los ácidos orgánicos más relevantes, con diversas aplicaciones industriales, como en industria alimentaria y de bebidas, donde se utiliza como conservante, regulador del pH y potenciador del sabor (Anh Ngoc Le et al., 2023). Mientras que, en la industria farmacéutica, se emplea principalmente como regulador de pH, neutralizador, solvente y agente de limpieza, (Abedi & Hashemi, 2020). En la industria química, se emplea para producción de propilenglicol, esteres lácteos, ácido acrílico, óxido de propileno, y tiene una función en la creación de polímeros biodegradables para uso comercial como las fibras o cintas como sustituto sintético de plástico derivado de los componentes petroquímicos, como en la producción del ácido poliláctico, desempeñando una alternativa ecológica (Alexandri et al., 2019). En el Ecuador, no existen producción interna de ácido láctico, por defecto (Cámara industrial de Guayaquil, 2012) se importan cerca de 286 toneladas anuales de ácido láctico y sus derivados como sales y esteres. (Mendoza Pico et al., 2020). La solución al alto gasto de importación es levantar y desarrollar una producción interna de ácido láctico dentro del país.

La forma más común de obtener ácido láctico es a través de la **fermentación bacteriana**, utilizando bacterias lácticas. En las fermentaciones, su principal objetivo es transformar los carbohidratos presentes, en ácido, principalmente ácido láctico (Ummadi & Curic-Bawden, 2010). *B. subtilis* es una bacteria formadora de esporas, catalasa positiva del tipo GRAS (generally recognized as Safe) por la FDA, que se considera la bacteria gram positiva más estudiada además de un organismo modelo (Nakano & Zuber, 1998). En condiciones de fermentación anaeróbica, el ácido láctico se produce por reducción del piruvato con *B. subtilis* (Ramos et al., 2000). Aunque existen numerosos informes sobre la producción de ácido láctico por algunas especies de *Bacillus*, la información sobre la producción de ácido láctico por *B. subtilis* es limitada. (Gao et al., 2012).

Un estudio realizado por Castells, A. (2018) reportó 6 cepas *Bacillus subtilis* que produjeron ácido láctico exitosamente en medios de fermentación, en condiciones aeróbicas, con concentraciones de ácido láctico de aproximadamente 5g/L, iniciando con una concentración de glucosa de 20g/L. Dichas cepas actualmente se encuentran criogenizadas a -80°C en los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

A diferencia de otras bacterias ácido lácticas, el *B. subtilis*, como bioproducción, logra trabajar en condiciones aeróbicas, gracias a su tolerancia a condiciones extremas, capacidad de utilizar sustratos económicos y su facilidad para ser manipulado genéticamente (Chen et al., 2023). Su metabolismo optimiza la conversión de sustratos con alto rendimiento y mínima generación de subproductos, lo que simplifica la purificación lo posiciona de forma destacada para procesos sostenibles y económicamente viables a nivel industrial (Schumann, 2007). Otra ventaja está en su crecimiento rápido de colonias, esta condición del *B. subtilis* es beneficiosa para acortar el periodo de fermentación y mejorar la producción del producto objetivo (Liu et al., 2020). Muchas bacterias ácido lácticas se usan actualmente para la elaboración de ácido láctico, sin embargo, dependen de proteinasas asociadas a la pared celular o del uso de hidrolizados de proteínas o hidrolizados de suero como fuente de aminoácidos, péptidos y oligopéptidos. Con *B. subtilis* es diferente, ya que esta bacteria produce su propia proteinasa, la cual hidroliza en condiciones específicas la proteína, comprendiendo la innecesaria hidrólisis de proteínas y reduciendo costos (Ferrero, 1995).

El costo de las materias primas para la producción de ácido láctico es una de las grandes dificultades. Varios materiales incluyendo subproductos de la industria agrónoma, industria de alimentos, y residuos naturales o biomásas como el almidón, la lignocelulosa, el suero de leche y han sido exploradas como alternativas llamativas y recursos más sostenibles (Anh Ngoc Le et al.,

2023). Dentro del Ecuador, se producen aproximadamente 900 mil litros de suero diariamente, pero solo el 10% es aprovechado por la industria (UTPL, 2021). Actualmente los ganaderos y varias industrias independientes desechan el suero de leche. El vertimiento directo del lacto suero a fuentes de agua, sin un previo tratamiento, genera un problema de contaminación ambiental; debido a la materia orgánica (Nustes, 2023). Debido a la abundancia del lactosuero y sus permeados se plantea una amenaza significativa para el medio ambiente; por ello, su conversión en nuevos productos es de gran interés (Rook, 2024). Al separar el suero del permeado, a través de una ultrafiltración, se obtiene una gran concentración de proteína de suero de leche, o por sus siglas en inglés WPC. El permeado de lactosuero consiste principalmente en lactosa en solución con cenizas y nitrógeno soluble, y se produce como subproducto del concentrado de proteína de lactosuero (WPC). El uso de este subproducto suscita un interés constante y una alternativa es la producción de ácido láctico por fermentación. (Fitzpatrick & O'keeffe, 2001).

Otro recurso que se obtiene como subproducto de la industria de alimentos es la melaza, proveniente de la refinación del azúcar. En el año 2020, la producción de azúcar de caña aumentó en 19% respecto al 2019 (CFN, 2020 del Inec). De esa cifra, indica un estudio de la Universidad Técnica del Norte, el 4% se destina para la producción de melaza. (Universidad, Del Norte, 2015, pág. 7). El uso de melaza como materia prima en la producción de ácido láctico, al ser un subproducto, disminuirá considerablemente los costos productivos (Dumbrepatil et al 2008). Hay varios tipos de melaza, los cuales varían según la etapa del proceso de producción de la que se obtengan; en este contexto, se clasifican como melazas tipo A, B y C, o también llamadas “blackstrap” (Castañeda-Ayarza & Cortez, 2017). La melaza tipo A es un subproducto intermedio de la producción de azúcar tipo A, donde se extrae el 77% del azúcar disponible. La melaza tipo B, o segundas melazas, proviene de una segunda extracción por centrifugación, recuperando el

12% adicional, lo que eleva la extracción total al 89% del azúcar recuperable. Las melazas tipo C corresponden a la extracción del azúcar contenido en la melaza tipo B mezclado con cristales de azúcar virgen. A pesar de poseer altas concentraciones de azúcares, La melaza tipo C no es procesada ya que la extracción de los mimos no resulta económicamente viable. (Castañeda-Ayarza & Cortez, 2017). Considerando que la melaza tipo C es un desecho sin mucha utilidad industrial, la diversificación de sus compuestos de azúcares lo vuelve ideal para medios de fermentación.

Dada los motivos expuestos, el objetivo de este trabajo es evaluar la producción de ácido láctico por *Bacillus subtilis* utilizando medios de cultivo basados en proteína de suero de leche y melaza. Esto implica confirmar la producción de ácido láctico por estas bacterias en medios MT empleando glucosa y fuentes de nitrógeno, así como determinar las proporciones óptimas de melaza y proteína de suero de leche (WPC) como sustitutos de glucosa y fuentes de nitrógeno, respectivamente. Finalmente, se cuantifica la cantidad de proteína y azúcar remanentes, así como el ácido láctico generado en el medio después del proceso de fermentación.

2. METODOLOGÍA

2.1. Producción de ácido láctico a partir de glucosa

A partir de los trabajos previos realizados (Castells, 2018), se identificó y aisló la cepa de *Bacillus subtilis* en microviales de 1.5ml y fueron conservadas a -80°C dentro de los laboratorios de Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito. Esta cepa fue sembrada en “*LB Broth con agar*”, un medio solido de crecimiento altamente nutritivo conformado por 15 g/l de agar, 10g/l de NaCl, 10 g/l de triptona y 5 g/l de extracto de levadura. Posterior fue incubada durante 24 horas a 37°C .

Se realizó un análisis preliminar en el medio de cultivo MT, basado en el trabajo de Gao et al. en el 2016, con algunas modificaciones propuestas por Castells (2018), compuesto de: 20g/l glucosa, 30 g/L peptona, 20g/l extracto de levadura, 6g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g/L KH_2PO_4 , 1.5g/L K_2HPO_4 , 0.03 g/L MgCl_2 , 0.08 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 2.3 ml/L de una solución de micronutrientes. La solución de micronutrientes contiene: 10.75g/L MgO, 2g/L CaCO_3 , 4.5g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.44g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.12 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L H_3BO_3 y, 51.3 ml HCl concentrado. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 121°C . Las fermentaciones se realizaron por triplicado en biorreactores de 500 ml, cerrados con tapones de gasa y algodón. Para la inoculación en medio MT se tomó una colonia de las cepas previamente cultivadas en agar nutritivo con un asa de estriación, y fueron sembradas a manera de directa a 37°C durante 15 horas. Posterior a la inoculación, se colocaron en una incubadora con agitación a 37°C con 180 rpm durante 48 horas.

Al momento del muestreo, se realizaron tomas de 1 ml y fueron colocadas en micro viales Eppendorf, y luego se extrajeron 5 ml en tubos Falcón de 50ml mediante micropipetas. Las primeras muestras en micro viales son utilizadas para la cuantificación de ácido láctico y las segundas inmediatamente fueron centrifugadas y trasvasado el sobrenadante almacenadas a -24°C hasta el momento de la medición del consumo de glucosa y el cambio de pH de los cultivos. Para la evaluación del porcentaje de proteína del medio, se realizará el cambio de la concentración inicial y de la concentración final de proteína del caldo de cultivo.

2.2. Producción de ácido láctico a partir de proteína de suero de leche

Se determinó el contenido de proteína de una presentación comercial de WPC, la proteína escogida es NAKED WHEY, de la empresa NAKED NUTRION de Estados Unidos (2024), a través del método Kjeldahl. Para esto, se tomó 0.5g de muestra, y se analizó el porcentaje de proteínas a fin de corregir la cantidad real de WPC que se debe añadir a las formulaciones.

Para la formulación de medios, se sustituyó una fuente de nitrógeno, peptona o extracto de levadura, por la WPC. Se realizaron dos diferentes medios de cultivo MT con la variación de proteína, sustituyendo una fracción de extracto de levadura o peptona, de acuerdo con lo mostrado en la Tabla 1. Estos cambios fueron realizados para comparar y evaluar los diferentes efectos que causa el reemplazo de diferentes fuentes de nitrógeno, en función de la producción de ácido láctico. Es así como los dos medios MT modificados (WMT1 y WMT2 para diferenciarlos) fueron puestos en fermentación bajo las mismas condiciones que el medio MT base.

Tabla 1. Reformulaciones para los medios WMT1 y WMT2 en g/L.

COMPONENTES	MEDIO		
	MT	WMT1	WMT2
Glucosa	20	20	20
Extracto de levadura	20	15	20
Peptona	30	30	22.5
WPC	---	5	7.5

Los valores de WPC representan una cuarta parte (25%) del peso de las fuentes de nitrógeno reemplazadas correspondientes. En función de la cantidad de fuentes de nitrógeno de WPC que se obtenga, se aplicará la correlación en la cantidad para las nuevas formulaciones.

2.3. Producción de ácido láctico a partir de melaza.

Melaza de caña fue obtenida de un productor local, ubicado en la Armenia, Ecuador, y se analizó su contenido de azúcares reductores por DNS (Reactivo 3,5-dinitrosalicílico). La tabla muestra la formulación de MMT, el medio MT a partir de melaza con la concentración equivalente en el reemplazo de azúcares reductores de la melaza.

Tabla 2. Reformulación para el medio MMT en g/L.

ESCENARIOS	MT	MMT
Glucosa	20	---
Extracto de levadura	20	15
Peptona	30	30
Melaza	---	20

2.4. Análisis del contenido final de proteína en los medios de cultivo

Para la determinación del consumo total de proteína dentro del medio se comparó la concentración inicial con la concentración final de proteínas en el medio. El método escogido fue la determinación de proteínas Kjeldahl. Este método mide el contenido de nitrógeno de una muestra, presuponiendo una relación entre la proteína y el nitrógeno para el alimento o suplemento analizado. Primero se realiza un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia del catalizador Kjeldahl, el nitrógeno proteico es transformado en sulfato de amonio por acción del ácido caliente dentro de un digestor automático. Durante la destilación, se adiciona agua destilada dentro del tubo de digestión, y se adiciona el hidróxido de sodio en cantidad suficiente para alcalinizar el medio, y desplazar el amoniaco de las sales armoniacas. El amoniaco liberado es arrastrado por el vapor de agua y liberado en una solución de ácido bórico. Finalmente se realiza una

titulación ácido-base para la determinación del porcentaje de proteína que está en relación con la cantidad equivalente de ácido consumido correspondiente a los equivalentes de amoniacos destilados (Aguirre, 2023). Para calcular el porcentaje de proteína basta con multiplicar por un factor de conversión, el porcentaje de nitrógeno calculado. Este factor de conversión es $K = 6,38$ para Leche y sus derivados. Para el determinar el porcentaje de proteína o de fuentes de nitrógeno, se realizan los cálculos necesarios utilizando las ecuaciones (1) y (2) que se encuentran anexadas al final del documento en ANEXO A.

2.5.Determinación de azúcares reductores en MT, WMT1, WMT2, y MMT.

Como se mencionó anteriormente, para el análisis de la reducción de los azúcares se escogió el método por DNS (3,5-dinitrosalicílico). El DNS es un método que prueba la presencia del grupo carbonilo libre ($C=O$), esto implica la oxidación del grupo funcional aldehído presente en, por ejemplo, la glucosa y el grupo funcional cetona en la fructosa. Simultáneamente, el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se reduce a ácido 3-amino,5-nitrosalicílico en condiciones alcalinas. Debido a que el oxígeno disuelto puede interferir con la oxidación de la glucosa, se añade sulfito al reactivo para absorber el oxígeno disuelto, aunque este no es necesario para la reacción de color. Diferentes azúcares reductores generalmente producen intensidades de color diferentes; por lo tanto, es necesario calibrar para cada azúcar. Además de la oxidación de los grupos carbonilo en el azúcar, otras reacciones secundarias, como la descomposición del azúcar, también compiten por la disponibilidad del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Aunque este es un método conveniente y relativamente económico, debido a su baja especificidad relativa, se deben realizar blancos de manera diligente si se desean interpretar los resultados colorimétricos de manera correcta y precisa (Wang, 2024)

Para analizar la reducción del nivel de glucosa (azúcar) en los cuatro diferentes medios, se recolectaron las alícuotas de 12, 24, 36 y 48 horas, se centrifugaron, filtraron y se diluyó en un factor de 1:20 para que entre dentro del rango de absorbancia en la lectura del espectrofotómetro UV-Visible. Para encontrar la concentración de la glucosa o “azúcares reducidos” se debe realizar una estandarización y una curva de calibración de la glucosa en el mismo equipo.

2.6. Análisis de ácido láctico en los medios MT, WMT1, WMT2, y MMT.

El equipo utilizado para la cuantificación de ácido láctico en los medios fue cromatografía en alta resolución (HPLC) ubicado en los laboratorios del departamento de Ingeniería Química en la Universidad San Francisco de Quito. La temperatura del horno de la columna se mantuvo a 25 °C y la separación cromatográfica fue obtenida usando la columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm). La elución isocrática se realizó con un buffer de fosfato (10 mM, pH 3,0) y acetonitrilo en proporción 95:5 %v/v como fase móvil. El caudal se mantuvo a 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 50 µl. El efluente se monitorizó a una longitud de onda de 210 µl para AL. Basándose en la densidad del LA, se pipetearon 8,2 ml (equivalentes a 10,0 mg en peso) y se añadieron al agua tipo II y la solución se completó hasta 10 ml para obtener una concentración de 1,0 mg/ml de LA. La fase móvil se preparó disolviendo 1,36 g de dihidrogenofosfato de potasio en 980 ml de agua tipo II, a la que se añadieron aproximadamente 130 ml de ácido ortofosfórico concentrado para ajustar el pH a 3,0. El volumen restante se completó hasta 1000 ml de agua. El volumen restante se completó hasta 1000 ml con agua tipo II para preparar una solución tampón de fosfato 10 mM. La solución tampón resultante se filtró a través de una membrana filtrante de 0,22 µm.

Los estándares de calibración para obtener la concentración de ácido láctico se prepararon por el método de dilución en serie para obtener concentraciones de 10, 50, 100, 150, 200 y 250 ppm de LA utilizando la fase móvil. Se realizó una regresión lineal obteniendo un R^2 de 0,9996. Para las preparaciones de las muestras, se realizó una dilución en proporción 1:20 en agua tipo II. Se ultra filtro a través de un filtro de jeringa Millex 1 ml de la muestra (medio) y 50µl del mismo y se los añadió a los viales para HPLC y se completó hasta 1 ml con agua tipo II. Esta dilución fue realizada para todos los medios de fermentación.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de materias primas (WPC y melaza)

A partir del resultado obtenido en la titulación, se realizó la ecuación (1) y (2) que calcula la cantidad de proteína presente en la muestra. Debido a que se está usando proteína de suero de leche, se usa el factor de conversión para la leche y sus derivados. El resultado sobre el porcentaje de proteína promedio es de $72,3\% \pm 1,74$. Existe una ligera variación entre las repeticiones, pero todas están dentro del rango aceptado por el margen de error.

Al conocer que la composición de proteína de suero de leche fue del 72,3%, se realizó la conversión en la sustitución de los medios. El medio WMT1 inicialmente fue de 5 g/L, esta debe representar al nuevo porcentaje de proteína, el valor asignado en la formulación representa 6,92 g/L. Con esta cantidad, se suprime por completo el valor de la composición. Igualmente, para el medio WMT2 pasa de ser 7,5 g/L a ser 10,37 g/L para corresponder la concentración de proteína en el medio.

La melaza es una materia orgánica llena de muchos componentes y compuestos que pueden afectar el análisis de esta. Por esta razón, el método de cuantificación de azúcares reductores por DNS en espectrofotometría UV-Visible es la opción óptima evitando pretratamientos. Mediante la ecuación de la curva de calibración realizada a través de los estándares, se obtuvo la concentración de azúcares presentes en la melaza, este análisis fue hecho por triplicado y los resultados promedio obtenido fue de $986,43 \pm 74,81$ gramos de azúcares reductores por litro de melaza. Las diferencias entre las muestras reflejan cierta variación en la composición ya que el margen de error indica una dispersión moderada, probablemente debida a diferencias en la melaza o técnicas de análisis. La melaza, además, no posee una densidad igual al agua, por lo que, si lo dividimos por su misma densidad (1,4 kg/L) está nos da 704,4 gramos de azúcares presentes por cada kilogramo de melaza.

Esto quiere decir que la melaza está compuesta en un 70,4% de azúcares reductores. Con este valor se puede realizar los cambios en la formulación del medio de MT para la glucosa.

3.2.Reducción de azúcares en los medios WMT1, WMT2

Como corresponde a los análisis post fermentación, la reducción de azúcares se da a través de la fermentación de la glucosa en el medio por parte del *B. subtilis* (Castells, 2018). La figura 1, presenta las curvas de consumo de azúcares reductores en las fermentaciones en los medios MT, WMT1, WMT2.

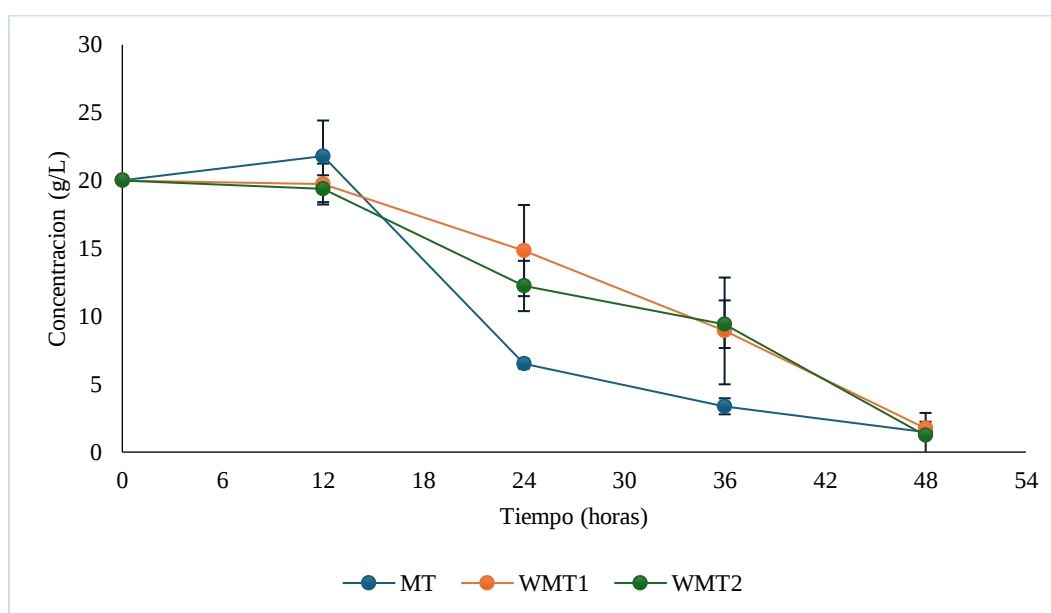


Figura 1. Consumo de glucosa en (g/L) en función del tiempo en cultivos en los medios MT, WMT1 y WMT2.

En la figura 1 se observa una disminución significativa de azúcares en el tiempo con diferencias significativas entre los medios de fermentación con WPC (WMT1 y WMT2) y MT. En este último, se obtuvo una caída más pronunciada entre las 12h y 24h donde pasa de $(21,80 \pm 2,62)$ g/L a $(6,5 \pm 0,35)$ g/L. A diferencia del medio MT, los medios a base de WPC, presentaron una disminución constante durante las 48 horas; encontrando una concentración de $(14,84 \pm 3,35)$ g/L y $(12,23 \pm$

1,85) g/L a partir de las 24 horas de fermentación para los medios WMT1 y WMT2 respectivamente. El medio MT no tiene reducción significativa entre las 24 a 48 horas, debido a que su concentración final tiene un valor de $(1,47 \pm 0,42)$ g/L que se traduce en una reducción de aproximadamente 92%, con respecto a la concentración inicial. Por otro lado, los medios WPC las concentraciones al final del cultivo fueron de $(1,75 \pm 0,48)$ g/L y $(1,22 \pm 1,66)$ g/L, que representan consumo del 91% y 94% para los medios WMT1 y WMT2, respectivamente.

3.3.Reducción de azúcares en el medio MMT

La figura 2 resume el consumo de azúcares reductores en las fermentaciones MT y MMT en el tiempo.

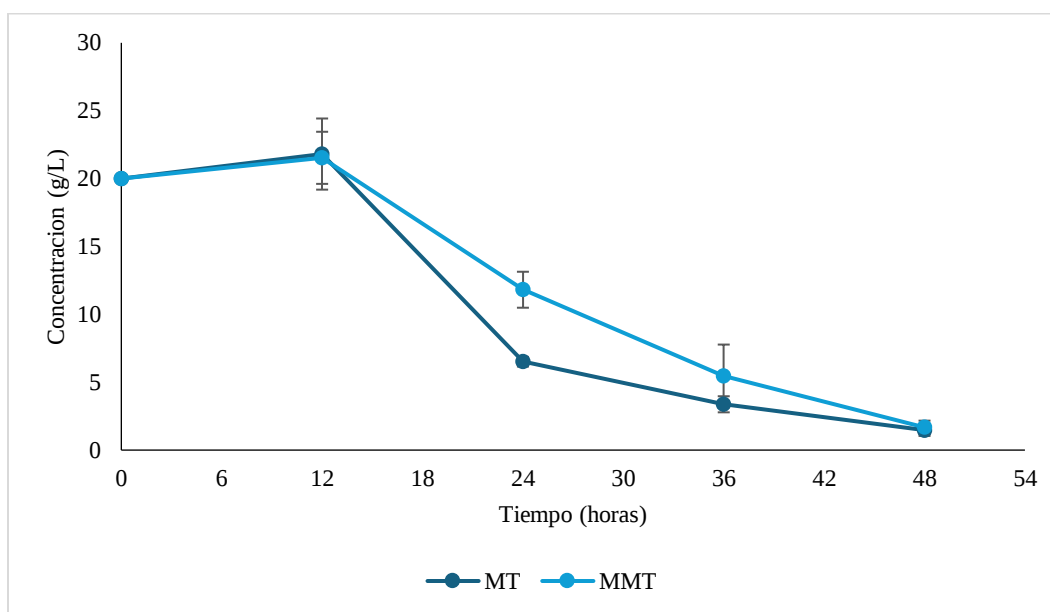


Figura 2. Consumo de los azúcares reductores en función del tiempo presentes en los medios MMT (melaza) y MT

El medio MMT comienza a disminuir su concentración de azúcares a partir de las 12 horas, reduciéndose de $(21,71 \pm 1,91)$ g/L de azúcares reductores a $(11,81 \pm 1,32)$ g/L tras 24 horas de fermentación. A partir de las 12 horas, ambos medios presentan una reducción significativa en la

concentración, siendo más pronunciada para MT. A las 24 horas, MT alcanza valores considerablemente menores en comparación con MMT, aunque ambas tienden a converger a concentraciones bajas donde MMT presenta concentraciones de $(1,67 \pm 0,49)$ g/L, que representan consumo del 92% para el medio.

3.4. Acidez en los medios de fermentación

Las figuras 3 y 4 muestran los cambios de los medios MT, WMT1, WMT2 y MMT durante el tiempo de cultivo.

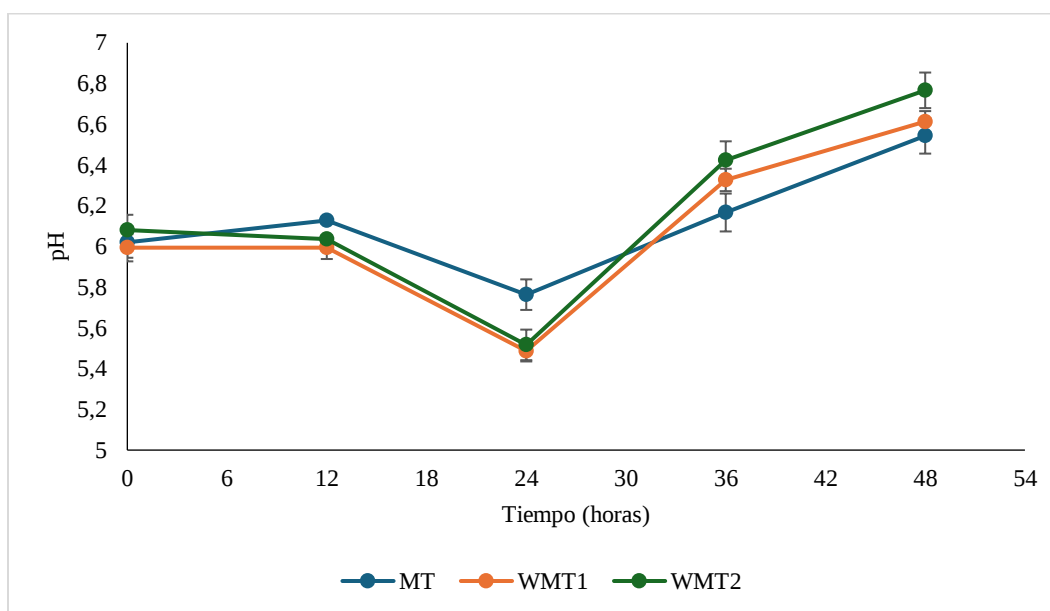


Figura 3. Cambios en el pH de los cultivos en los medios MT, WMT1 y WMT2 en función del tiempo durante 48 horas

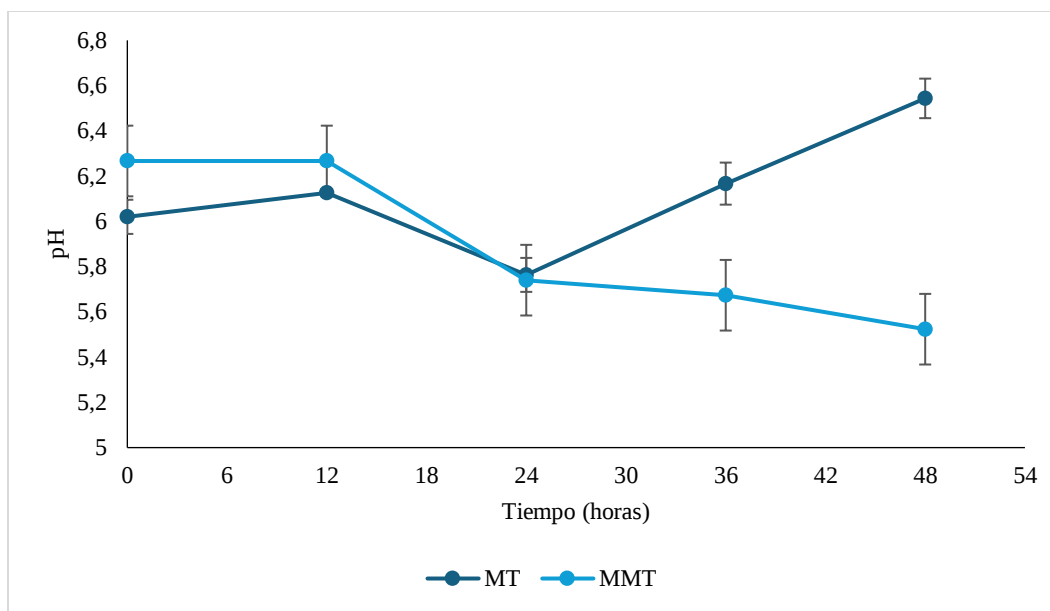


Figura 4. Cambios en el pH de los cultivos en los medios MT y MMT en función del tiempo durante 48 horas

Todas las formulaciones detallan un pH inicial levemente ácido, entre 6-6,2. Hasta las 12 horas el pH permanece constante; sin embargo, después de este periodo, el pH disminuye. El medio MT y MMT tienden a tener un pH igual alrededor de 5,75. Por otro lado, el pH para los medios WMT1 y WMT2 son similares entre si siendo un valor promedio de 5,50, menor al de MT. El pH vuelve a subir a partir de las 24 horas, a excepción del medio MMT. Al final de las 48 horas los medios WMT1 y WMT2 tienen un pH de 6,76 y 6,61, respectivamente; el medio MT continua la tendencia con un pH final de 6,54 mientras que el medio MMT, durante las 48 horas, conserva su acidez en el medio con un valor pH final de 5,52.

3.5. Porcentaje de fuentes de nitrógeno disueltos en el medio MT1, WMT1 y WMT2

La tabla 3 resume el porcentaje de fuentes de nitrógenos que se encontraban en los medios MT y aquellos con WPC tanto al inicio como al final.

Tabla 3. Porcentaje de fuentes de nitrógeno (N%) al inicio y final de las fermentaciones

Medio	N% inicial (%)	N% final (%)
MT	0,899	0,731
WMT1	0,675	1,50
WMT2	0,618	0,8031

El medio MT tuvo una disminución en la concentración de nitrógeno, con una disminución del 18% de su concentración inicial mientras que los medios WMT1 y WMT2 tuvieron un incremento en sus fuentes de nitrógeno del 120% y 30% respectivamente.

3.6. Producción de ácido láctico a partir de glucosa

A partir de la hora 0, existe un crecimiento de la concentración de AL en el medio de cultivo y desde las 12 horas, el medio presenta más crecimiento desde ($1,43 \pm 0,01$ g/L) hasta las 24 horas, ($3,01 \pm 0,17$) g/L. A partir de las 24 horas, el AL se mantiene en el medio en un rango de $2,77 \pm 0,10$ g/L durante las 36 horas, no obstante, al término de 48 horas, la disminución del AL dentro del medio disminuye a $1,25 \pm 0,35$ g/L. 3 4

3.7. Producción de ácido láctico a partir de proteína de suero de leche

En la figura 5, se observan la producción de ácido láctico de los dos medios propuestos (WMT1 y WMT2).

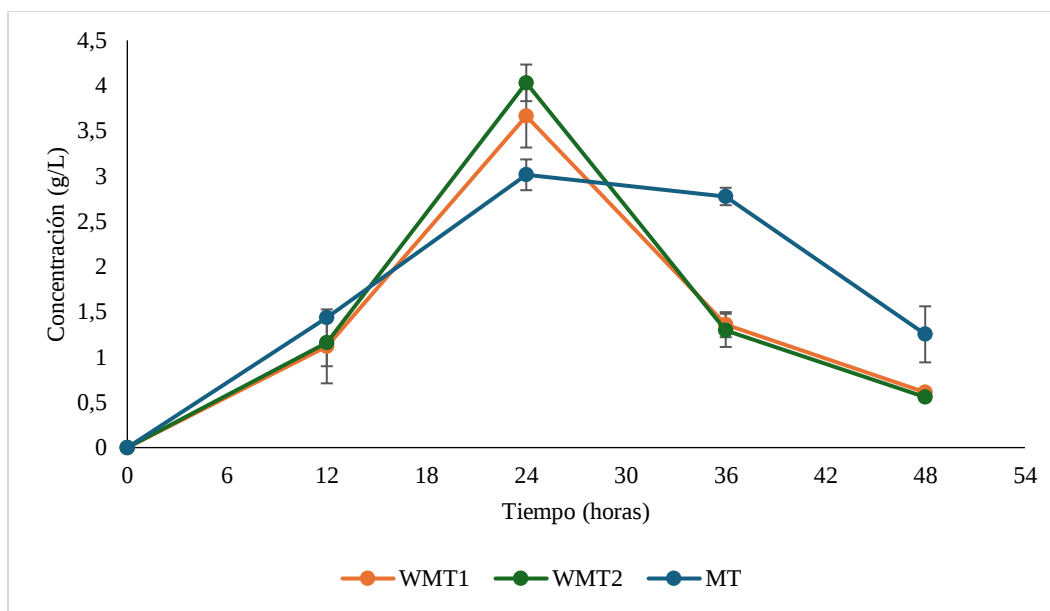


Figura 5. Concentración de ácido láctico en función del tiempo en medios MT, WMT1 y WMT2 durante 48 horas.

Ambas formulaciones con WPC tienen concentraciones muy similares a las 12, 36 y 48 horas. El medio WMT2 concentra una mayor cantidad de AL en el medio en las 24 horas con $(4,03 \pm 0,20)$ g/L mientras que el medio WMT1 encuentra una concentración de $(3,66 \pm 0,34)$ g/L a las 24 horas. Es decir, el medio WMT2 que sustituye porcentaje del peso de Peptona con WPC, produjo ligeramente más AL que el medio WMT1, medio basado en una sustitución de Extracto de Levadura con WPC. Posteriormente, los dos medios a base de WPC, encuentran una disminución en su concentración de ácido láctico, ya que llegan a tener valores de $(1,35 \pm 0,14)$ g/L para WMT1 y $(1,29 \pm 0,18)$ g/L. Finalmente, a las 48 horas, el ácido láctico disminuye aún más a concentraciones máximas de 0,60 g/L para ambos medios.

3.8. Producción de ácido láctico a partir de melaza

La producción de ácido láctico en el medio con melaza se presenta en la figura 6.

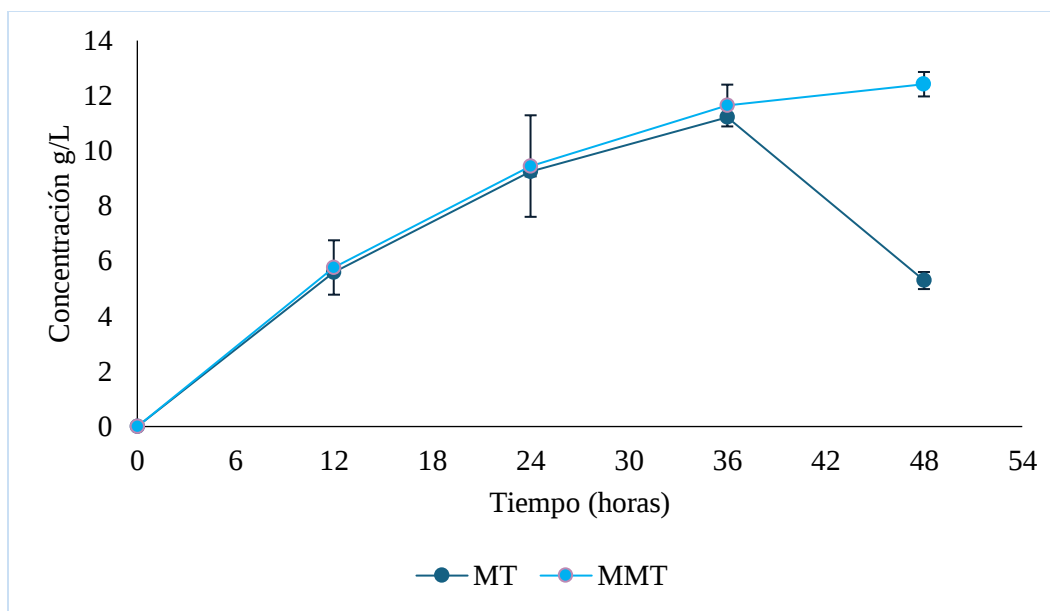


Figura 6. Concentración de ácido láctico en función del tiempo en medios MT y MMT durante 48 horas.

El medio MT alcanza un máximo de $(11,64 \pm 0,85)$ g/L entre las 36 horas. Después de este punto, las tendencias divergen: en el medio MT, la concentración disminuye abruptamente a $5,3 \pm 0,01$ g/L a las 48 horas, mientras que en el medio MMT, la concentración presenta un leve incremento hasta $12,41 \pm 0,50$ g/L.

3.9.Variación porcentual de ácido láctico en medios WMT1 y WMT2

Los medios WMT1 y WMT2 alcanzan un pico cercano al 256% a las 24 horas, seguido de un descenso abrupto hasta valores negativos alrededor del -65% entre las 36 y 48 horas. MT muestra un aumento más gradual, con un pico menor (110%) y un descenso menos pronunciado, estabilizándose cerca del 0% hacia el final. Disminuyen abruptamente hasta valores cercanos al 65% a las 24 horas. En la gráfica, la variación de MMT continúa en aumento significativamente; La variación del medio MMT supera al del medio MT a las 36 horas, más adelante termina alcanzando un pico cercano al 111% a las 48 horas.

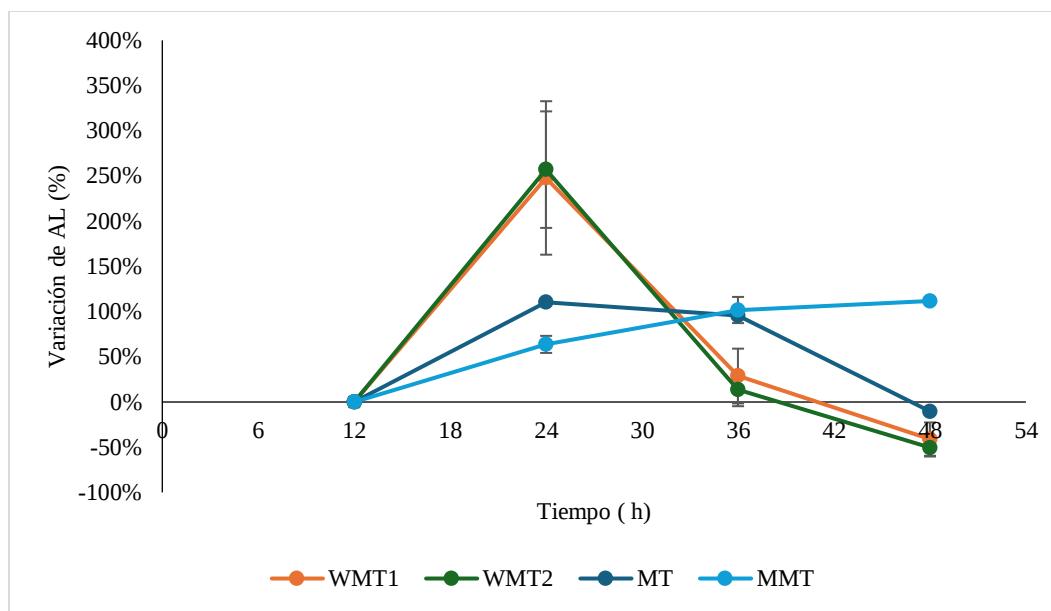


Figura 7. Variación porcentual de ácido láctico en medios con formulaciones MT, WMT1, WMT2 y MMT

4. DISCUSIONES

Desde las 48 horas, la presencia de los azúcares es mínima, por lo que se da a entender que el consumo de azúcar fue casi en totalidad. El consumo de azúcar hasta las 48 horas es más del 90% de la concentración inicial de glucosa o melaza (para el medio MMT). El consumo de azúcar se da en una función inversamente proporcional a la producción de ácido láctico en el medio (Castells, 2017). Durante las primeras 12 horas la bacteria se encuentra en una fase de latencia (o fase *lag*), en donde el *B. Subtilis* se encuentra en un estado de adaptación a las condiciones en las que se le impuso. Durante esta fase, *B. subtilis* no solo se adapta, sino también, secreta otros compuestos necesarios para metabolizar los azúcares e incluso pueden estar sintetizando enzimas (Chen et al., 2023).

A las 24 horas, se encuentra el mayor pico de producción de ácido láctico para las tres fermentaciones, donde el mayor pico lo alcanza el medio WMT2, en el que la proteína de suero reemplazó parcialmente a la peptona. Esto es 33% más de producción de ácido láctico a comparación del medio MT. Curiosamente el pico cae en las 36 horas. A primera vista, el ácido láctico en lugar de mantenerse en el medio se reduce o “desaparece”, Según lo señalado por Ohtman (2017), el ácido láctico no disociado tiene la capacidad de atravesar la membrana bacteriana mediante difusión simple debido a su solubilidad en la membrana citoplasmática, mientras que el lactato disociado, al ser insoluble, no puede hacerlo. Este proceso puede alterar el gradiente de pH transmembrana, afectando su mantenimiento y provocando la interrupción de las funciones celulares. Asimismo, la energía disponible para el crecimiento celular disminuye, ya que se emplea en mantener dicho gradiente de pH. Básicamente, la acumulación de ácido láctico inhibe el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas debido a la alteración del pH en condiciones ácidas. Como consecuencia, la concentración de lactato y el pH en el medio aumentan. Por lo tanto, el

ácido láctico no desaparece, es posible que la bacteria se haya adaptado y por culpa de la gradiente de concentración, este es disuelto dentro de la bacteria. Por lo tanto, para paliar el efecto inhibitor del ácido láctico durante la fermentación, debe eliminarse selectivamente in situ del caldo de fermentación (Wee et al., 2006). Es así como el ácido láctico dentro del medio no solo deja de producirse, sino, además, se empieza a consumir por la misma bacteria. Para las 48 horas, los medios WMT1 y WMT2 tienen concentraciones bajas debido a este efecto. La acidez en el medio (a través de su pH) no solo confirma los resultados obtenidos sobre la producción de ácido láctico, sino también la tendencia. A las 24 horas, el medio MT posee un pH mayor al medio WMT2, corroborando su proporcionalidad con la cantidad de ácido láctico que se encuentra en el medio.

En la otra mano, lo que sugiere la variación porcentual de ácido láctico es que existe una mayor producción de este para los medios a base de WPC a las 24 horas. El medio MMT tiene una variación más estable pero la diferencia en las curvas puede indicar que ciertos medios de cultivo favorecen más la producción de ácido láctico en comparación con otros y que algunos ingredientes mejoran el rendimiento fermentativo en ciertas condiciones temporales. Es decir, si el medio de cultivo contiene WPC (sustituyente de nitrógeno) en su formulación, este medio aumenta la producción, logrando un excelente rendimiento, pero reduciendo su tiempo de cultivo. Un medio a base de melaza (sustituyente de fuente de carbono) puede lograr un buen rendimiento, pero a largo plazo.

En los medios WMT1 y WMT2, la proteína de suero de leche es una proteína no hidrolizada y después de la esterilización, el calor indujo en su desnaturalización. Aunque la desnaturalización no siempre implica la ruptura de enlaces peptídicos (estructura primaria), las proteínas en este estado suelen precipitar o perder actividad funcional (Khalesi et al., 2023). WMT1 WMT2 no poseen la misma cantidad de proteína hidrolizada disuelta en el medio, es decir, poseen menos

peptona y extracto de levadura, mientras que su otra fuente de nitrógeno (la proteína de suero de leche), fue centrifugada y filtrada del medio de cultivo. Después de las fermentaciones, la concentración de fuentes de nitrógeno en el medio MT disminuye coherentemente por acción del consumo de las bacterias. Las fuentes de nitrógeno disueltos en los medios WMT1 y WMT2 son más a comparación con las que empezó el medio. Es decir, dentro de los medios WMT1 y WMT2 aumentaron espontáneamente sus fuentes de nitrógeno. El medio WMT1 incluso aumento más del doble de su concentración inicial de fuentes de nitrógeno, 120%. El *B. subtilis* es capaz de secretar proteasas, que son enzimas capaces de descomponer proteínas. Las proteasas principales secretadas por *B. subtilis* incluyen: la subtilisina, una serina proteasa que es bien conocida por su estabilidad y eficiencia en condiciones diversas; y la neutralasa, una proteasa neutra que actúa en un rango de pH más limitado. Estas proteasas extracelulares son importantes para el metabolismo de la bacteria, ya que permiten degradar proteínas en el medio ambiente para obtener aminoácidos necesarios para su crecimiento (Ferrero, 1995). Esto no solo demostraría el aumento de fuentes de nitrógeno en el medio, sino también la adaptabilidad de *B. subtilis* para poder sobrevivir. Si bien se da un aumento mayor en un medio de cultivo que en otro, el *B. subtilis* trabajado no es una bacteria GMO (organismo genéticamente modificado) por lo que su producción tanto de ácido láctico, como de secreción de enzimas, pueden variar por muchísimos factores. (Ferrero. 1995)

Las muestras del medio MMT para medición de ácido láctico estaban significativamente gasificadas (consecuencia de la fermentación láctica), lo que representa una limitación para su procesamiento en HPLC. Es por esto que las muestras fueron pretratadas con ultrasonido durante 15 minutos para eliminar cualquier tipo de gas dentro del medio. Esto explicaría el aumento en los valores concentrados de ácido láctico. Como se dijo previamente, el ácido láctico puede encontrarse dentro de la membrana de los *B. subtilis*, y el ultrasonido puede causar lisis celular

(ruptura de las células bacterianas) y liberar este contenido al medio líquido. Este fenómeno es común cuando las bacterias no secretan eficientemente el producto metabólico (García et al., 2013). Tampoco se descarta la idea de una posible mejora en la homogeneidad de la mezcla del medio de fermentación, rompiendo aglomerados celulares o grumos de partículas. Esto puede hacer que el ácido láctico previamente atrapado en estructuras más densas quede disponible para la medición (García et al., 2013). Un método de comprobación fue llevar a cabo el mismo pretratamiento en un medio MT de comparación. El resultado llevó a tener los mismo valores y picos del MMT.

Considerando que la melaza está compuesta de 3 azúcares principalmente sacarosa, fructosa y glucosa, y que *B. subtilis* presenta una clara preferencia por la glucosa, es considerable que la producción de ácido láctico que se observa hasta las primeras 24 horas de cultivo corresponda al consumo de glucosa y su consiguiente transformación hacia ácido láctico. Posterior a las 24 horas de cultivo se mantiene la acidez en el medio, probablemente por un cambio de fuente de carbono a fructosa, mostrándose tanto disminución de los azúcares totales como estabilidad en la concentración de ácido láctico (Castells, 2018). La grafica de la acidez del medio, a través de su pH, también explica las tendencias en la cantidad de ácido láctico. Paradójicamente, este pH es el mismo que el medio WMT2 obtiene durante las primeras 24 horas de fermentación (su punto más alto de incremento porcentual)

Al ser los valores teóricos de producción de ácido láctico, las eficiencias respectivas se pueden dar solamente en comparación con el consumo de glucosa, en proporción 1:1. Donde para el medio base MT, la eficiencia es del 15,05% en su mejor tiempo de producción, mientras que para los medios WMT1 y WMT2, la eficiencia resulta del 18,3% y 20,15%. Para la melaza, considerando el pretratamiento dado, se lo comparara con el medio base MT pretratado, donde este último

obtuvo eficiencias de 55,58% en su mejor tiempo (36 horas), mientras que el medio MMT obtuvo 62,05%. Si se hace una conversión o suposición de la eficiencia obtenida en el medio MT pretratado, como las mismas sin pretratamiento, entonces se obtiene que la eficiencia MMT sin pretratamiento es del 16,80%. Tanto la fermentación con glucosa como con melaza producen concentraciones de ácido láctico que, aunque son esperadas, resultan complejas para su consideración en un escalamiento industrial. Las especies de *Lactobacillus*, pese a sus exigentes requerimientos metabólicos, alcanzan niveles de producción entre 10 y 20 veces superiores a los obtenidos por las cepas estudiadas (Castells, 2018). No obstante, Se podrían realizar procesos de mejoramiento genético en la bacteria para alcanzar rendimientos similares a los de las especies de *Lactobacillus*. Cepas modificadas como *Bacillus subtilis* MUR1, han obtenido concentraciones altas de ácido láctico, 159g/L (Gao et al 2012). El análisis presente en este estudio para mejorar la producción de ácido láctico utilizando proteína de suero de leche y melaza resulta importante en el aspecto de costo beneficio, ya que reemplazan elementos como lo son la peptona, el extracto de levadura, y la glucosa, que son conocidos por potenciar el proceso fermentativo. La optimización de estos nuevos ingredientes en la elaboración de un medio de cultivo comprobaría el aumento en la eficiencia del proceso además de reducir los costos de producción, lo que ayudaría a determinar la viabilidad económica de usar esta especie bacteriana en la producción de ácido láctico a escala industrial.

5. CONCLUSIONES

Se confirmó la producción de ácido láctico a partir de *Bacillus Subtilis* en medios de cultivo a base de proteína del suero de leche y melaza. Las formulaciones de diferentes medios a base de proteína, sustituyendo un 25% de las fuentes de nitrógeno establecidas, como lo son la peptona y el extracto de levadura; y sustituyendo un 100% la glucosa por melaza residual, son adecuados para la producción de ácido láctico.

B. subtilis es una bacteria que puede adaptarse a los medios de cultivo a base de WPC. La reducción de glucosa por su consumo, producción de ácido láctico y variación de fuentes de nitrógeno presentes dentro del medio, es evidencia para especular acerca de la secreción de enzimas por parte de la bacteria. La acidez repentina en los medios de cultivo a base de WPC plantea la modificación del metabolismo del *B. subtilis* y su rendimiento se ve maximizado a costa de su tiempo de cultivo, lo que lleva a una disminución en la variación de ácido láctico en el medio. El medio propuesto a base de melaza propone una mejor conservación del ácido láctico a largo plazo en el tiempo de cultivo. El aprovechamiento de estos nuevos componentes en los medios de cultivo incrementa la eficiencia y reducen los costos de producción.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar diferentes formulaciones para el medio MT que implique más porcentaje de proteína de suero de leche, como sustituyente en las fuentes de nitrógeno del medio.
- Realizar un análisis enzimático para determinar cuantitativamente la producción de enzimas del *B. subtilis* en función del tiempo.
- Realizar un análisis cuantitativo de lactato que se encuentre disuelto en el medio en función del tiempo, como parte de la deducción en la retención de ácido láctico por parte de la bacteria.
- Realizar diferentes tipos de pretratamientos para aislar la cantidad de ácido láctico medible en cromatografía de alta resolución, con un posible escalamiento.
- Evaluar el uso de genética modificada o diferentes cepas de *B. subtilis*, para la optimización en la producción de ácido láctico.
- Considerar el uso de diferentes tipos de proteínas, como fuentes de nitrógeno, para la producción de ácido láctico en *B. subtilis*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. In *Heliyon* (Vol. 6, Issue 10). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Aguirre, J. (2023). The Kjeldahl Method. In *The Kjeldahl Method: 140 Years* (pp. 53–78). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-31458-2_4
- Alexandri, M., Schneider, R., Mehlmann, K., & Venus, J. (2019). Recent Advances in D-Lactic Acid Production from Renewable Resources: Case Studies on Agro-Industrial Waste Streams. *Food Technology and Biotechnology*, 57. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6023>
- Anh Ngoc Le, T., Jie Lin Lee, J., & Ning Chen, W. (2023). Stimulation of lactic acid production and *Lactobacillus plantarum* growth in the coculture with *Bacillus subtilis* using jackfruit seed starch. *Journal of Functional Foods*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105535>
- Castañeda-Ayarza, J. A., & Cortez, L. A. B. (2017). Final and B molasses for fuel ethanol production and some market implications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 70, 1059–1065. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.010](https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.010)
- Castells, A. R. (2018). Evaluación del potencial de producción de ácido láctico mediante cepas de *Bacillus subtilis* (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito.
- Chen, T., Brul, S., & Hugenholtz, J. (2023). Exploring the potential of *Bacillus subtilis* as cell factory for food ingredients and special chemicals. *Microbial Cell Factories*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02208-w>

- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J., Gokhale, D. „Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation”. *Applied and Environmental Microbiology* 74(1), 2008.
- Ferrero, Marcela Alejandra. (1995). Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2745_Ferrero.pdf
- Fitzpatrick, J. J., & O’keeffe, U. (2001). Influence of whey protein hydrolysate in addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. In *Process Biochemistry* (Vol. 37).
www.elsevier.com/locate/procbio
- Gao, T., Wong, Y., Ng, C., & Ho, K. (2012). L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, 121, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.108>
- García Martín, J. F., Guillemet, L., Feng, C., & Sun, D.-W. (2013). Cell viability and proteins release during ultrasound-assisted yeast lysis of light lees in model wine. *Food Chemistry*, 141(2), 934–939. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.081>
- Khalesi, M., Cermeño, M., & FitzGerald, R. J. (2023). Contribution of whey protein denaturation to the in vitro digestibility, biological activity, and peptide profile of milk protein concentrate. *Journal of Functional Foods*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105543>
- Liu, Y., Su, A., Tian, R., Li, J., Liu, L., & Du, G. (2020). Developing rapid growing *Bacillus subtilis* for improved biochemical and recombinant protein production. *Metabolic Engineering Communications*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00141>
- MAGAP. (2015) Boletín situacional caña de azúcar. Ministerio de agricultura y ganadería.

- Mendoza Pico, V. A., Rosero-Delgado, E. A., & Pineda Insuasti, J. A. (2020). Obtención de ácido láctico a partir de la fermentación del suero de leche con *Lactobacillus bulgaricus* (Obtaining lactic acid from the fermentation of whey with *Lactobacillus bulgaricus*). *Revista Biorrefinería*, 3(3). <https://www.cebaecuador.org/wp-content/uploads/2021/06/Biorrefineri%CC%81a-3-60-67.pdf>
- Nakano, M.M., Zuber, P., 1998. Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 165–190.
- Nustes, R. (2023). EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL GENERADO POR EL VERTIMIENTO DE LACTOSUERO DE LA MICROEMPRESA LÁCTEOS BELÉN. [Tesis De Licenciatura].
- Othman, M., Ariff, A. B., Rios-Solis, L., & Halim, M. (2017). Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 8(8). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02285>
- Ramos, H.C., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* 182, 3072– 3080.
- Rook, M. (2024). State of the dairy industry: Study indicates continued growth presents challenges and opportunities. *Dairy Herd*. <https://www.dairyherd.com/news/business/state-dairy-industry-study-indicates-continued-growth-presents-challenges-and>
- Schumann, W. (2007). *Production of Recombinant Proteins in Bacillus subtilis* (Vol. 62, pp. 137–189). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)62006-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)62006-1)

- Ummadi, M., & Curic-Bawden, M. (2010). Use of protein hydrolysates in industrial starter culture fermentations. In *Protein Hydrolysates in Biotechnology* (pp. 91–114). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_6
- Unden, G., & Kim, O. bin. (2021). Bioenergetics Theory and Components | Energy Conservation and Growth by Anaerobic Bacteria☆. In J. Jez (Ed.), *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)* (Third Edition, pp. 15–22). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21392-7>
- Universidad, Del Norte. (2015). *Universidad Técnica del Norte*. Ibarra: Investigación y Desarrollo.
- UTPL. (2021). Suero de leche, un aliado para la innovación alimenticia | Blog. Noticias.utpl.edu.ec. <https://noticias.utpl.edu.ec/suero-de-leche-un-aliado-para-la-innovacion-alimenticia>
- Wang, S. N. (2024) EXPERIMENT NO. 4A. GLUCOSE ASSAY BY DINITROSALICYLIC COLORIMETRIC METHOD. Department of Chemical & Biomolecular Engineering. University of Maryland. United States. <https://user.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4a.htm>
- Wee, Y. J., Kim, J. N., and Ryu, H. W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 163–172.

8. ANEXOS

ANEXO A: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS Y CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se observa en la figura 1, donde los estándares realizados se encuentran en 10, 50, 100, 150, 200 y 250 ppm, con un R^2 de 0,9996

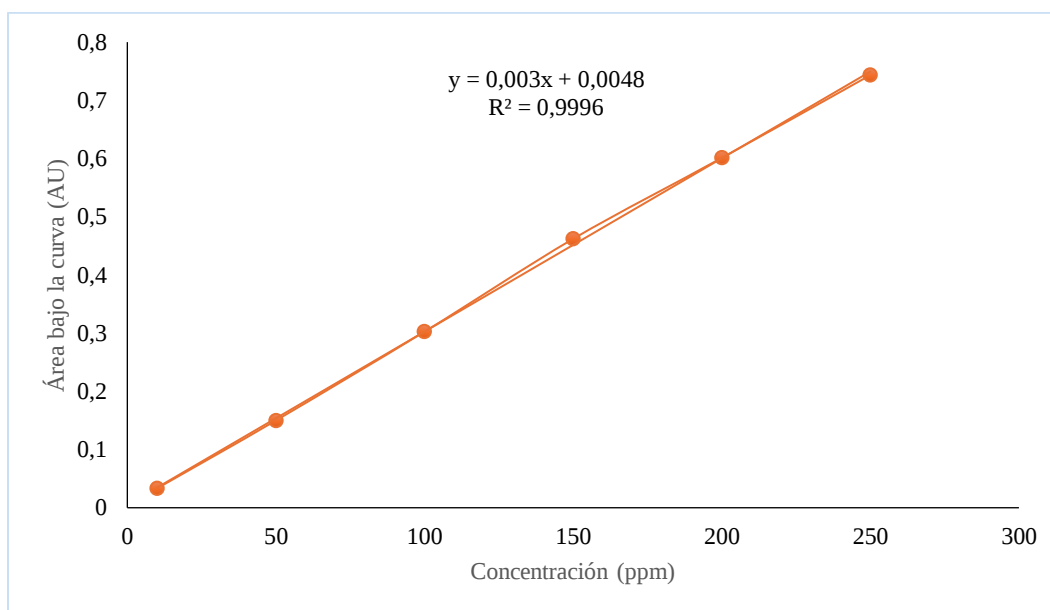


Figura 1. Curva de calibración de ácido láctico en (g/L) vs Absorbancia. Medido en cromatografía en alta resolución (HPLC).

La curva de calibración se observa en la figura 2, donde los estándares realizados están en 1, 2, 3, 4, y 5 g/L con un R^2 de 0,9914.

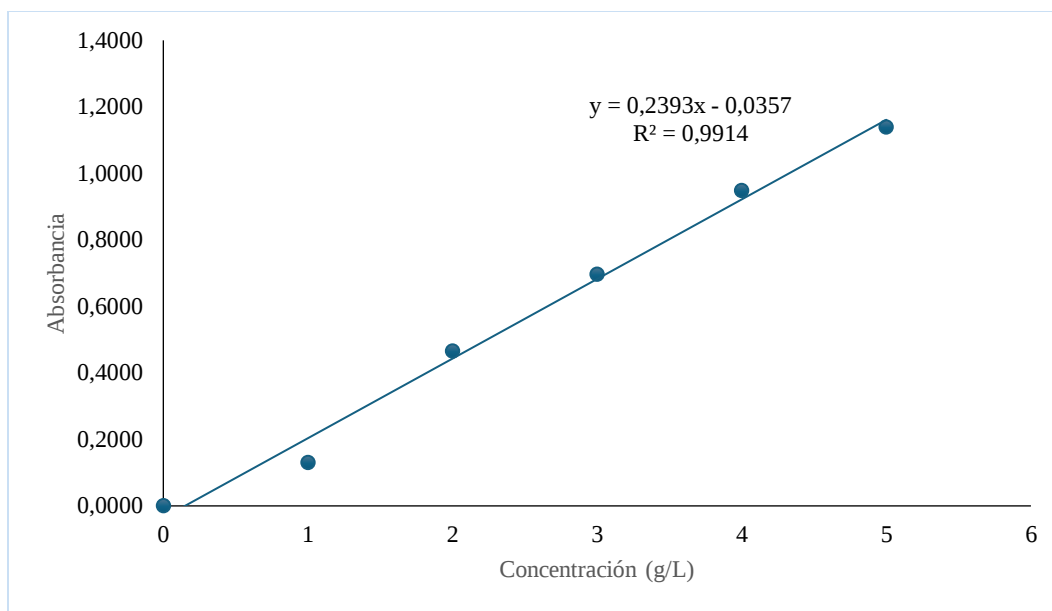


Figura 2. Curva de calibración de glucosa en (g/L) Vs Absorbancia a 575 nm. Método DNS en espectrofotometría UV-visible.

ANEXO B: ECUACIONES PARA CALCULOS DE RESULTADOS

$$\%N = \frac{V_{HCl} * N_{HCl} * PE_{N2}}{P_{muestra}} * 100\% \quad (1)$$

$$\%P = \%N * 6,38 \quad (2)$$

**ANEXO C: DATOS DE ESTANDARIZACION PARA LA CURVA DE CALIBRACION
DEL ÁCIDO LACTICO EN HPLC**

Inj.	Injection Name	Area	Height
No.	Selected Peak:	mAU*min	mAU
		UV_VIS_1	UV_VIS_1
	ppm	Ácido Láctico	Ácido Láctico
1	10	0,0332	0,57
2	50	0,15	2,66
3	100	0,3026	5,3
4	150	0,462	8,08
5	200	0,6011	10,54
6	250	0,7434	13,02

**ANEXO D: DATOS DE ESTANDARIZACION PARA LA CURVA DE CALIBRACION
DE LA GLUCOSA EN DNS**

g/L	Absorbancia Promedio	A1	A2
0	0,0000	0	0
1	0,1292	0,1304	0,128
2	0,46465	0,4558	0,4735
3	0,69665	0,7081	0,6852
4	0,9471	0,9467	0,9475
5	1,1383	1,1426	1,134

ANEXO E: DATOS DE LA REDUCCION DE AZUCARES DE LOS MEDIOS

MT 1	HORAS	C1	C2	C3
	12	0,3662	0,3696	0,368
	24	0,1984	0,198	0,2007
	36	0,1613	0,1627	0,1628
	48	0,1397	0,1394	0,1397
	12	1,38	1,39	1,39
	24	0,68	0,68	0,69
	36	0,52	0,53	0,53
	48	0,43	0,43	0,43

MT 2	HORAS	C1	C2
	12	0,3425	0,3425
	24	0,1932	0,1914
	36	0,1552	0,1421
	48	0,1317	0,1325
	12	1,2815372	1,281537
	24	0,6578947	0,650376
	36	0,4991646	0,444444
	48	0,4010025	0,404344

MT 3	HORAS	C1	C2	C3
	12	0,391	0,42	0,393
	24	0,155	0,1539	0,15
	36	0,0788	0,1037	0,0867
	48	0,1191	0,1233	0,1428
	12	1,484127	1,605263	1,492481
	24	0,498329	0,493734	0,477444
	36	0,180033	0,284043	0,213033
	48	0,348371	0,365915	0,447368

WMT1 1	HORAS	C1	C2	C3
	12	0,3631	0,3723	0,3754
	24	0,1437	0,1388	0,1411
	36	0,2733	0,266	0,271

	48	0,3202	0,3178	0,3206
	12	1,3675856	1,406015	1,418964
	24	0,4511278	0,43066	0,440267
	36	0,9924812	0,961988	0,982874
	48	1,1883876	1,178363	1,190058

	HORAS	C1	C2	C3
WMT1 2	12	0,3593	0,3569	0,3432
	24	0,136	0,142	0,1413
	36	0,2251	0,2224	0,2219
	48	0,3143	0,3149	0,3144
	12	1,3517126	1,341688	1,284461
	24	0,4189641	0,444027	0,441103
	36	0,7911445	0,779866	0,777778
	48	1,1637427	1,166249	1,16416

	HORAS	C1	C2	C3
WMT1 3	12	0,3344	0,334	0,3342
	24	0,1264	0,135	0,13
	36	0,1765	0,1761	0,1752
	48	0,2481	0,2476	0,2471
	12	1,2477026	1,246032	1,246867
	24	0,3788638	0,414787	0,393901
	36	0,588137	0,586466	0,582707
	48	0,887218	0,885129	0,883041

	HORAS	C1	C2	C3
WMT2 2	12	0,3537	0,3551	0,3562
	24	0,1465	0,1668	0,1559
	36	0,2006	0,2148	0,2111
	48	0,2569	0,2557	0,2555
	12	1,328321	1,334169	1,338764
	24	0,462824	0,547619	0,502089
	36	0,688805	0,74812	0,732665
	48	0,923977	0,918964	0,918129

	HORAS	C1	C2	C3
WMT2 3	12	0,3566	0,3564	0,3538
	24	0,1149	0,1152	0,1289
	36	0,2292	0,2261	0,2268
	48	0,2475	0,2478	0,2456
	12	1,340434	1,339599	1,328739
	24	0,330827	0,33208	0,389307
	36	0,808271	0,795322	0,798246
	48	0,884712	0,885965	0,876775

}

	HORAS	C1	C2	C3	C4
MMT 1	12	0,4044	0,378	0,3992	0,379
	24	0,2539	0,236	0,2583	0,2374
	36	0,2075	0,1986	0,2033	0,1953
	48	0,0929	0,0792	0,1039	0,1059
	12	1,5401003	1,429825	1,518379	1,434002
	24	0,9114453	0,836675	0,929825	0,842523
	36	0,7176274	0,680451	0,700084	0,666667
	48	0,2389307	0,181704	0,284879	0,293233

	HORAS	C1	C2	C3	C4
MMT 2	12	0,3472	0,3676	0,3666	0,3493
	24	0,2884	0,2774	0,2606	0,2489
	36	0,1613	0,1745	0,1506	0,17833
	48	0,1186	0,0896	0,0929	0,1192
	12	1,3011696	1,386383	1,382206	1,309942
	24	1,0555556	1,009607	0,939432	0,89056
	36	0,5246449	0,579783	0,47995	0,595781
	48	0,3462824	0,225146	0,238931	0,348789

	MT	DESVEST	INTER CONF
0	20	0	
12	21,804511	2,62007	3,8964539
24	6,509793	0,35774	0,5320147
36	3,3727838	0,59184	0,8801601
48	1,4710387	0,42896	0,6379271

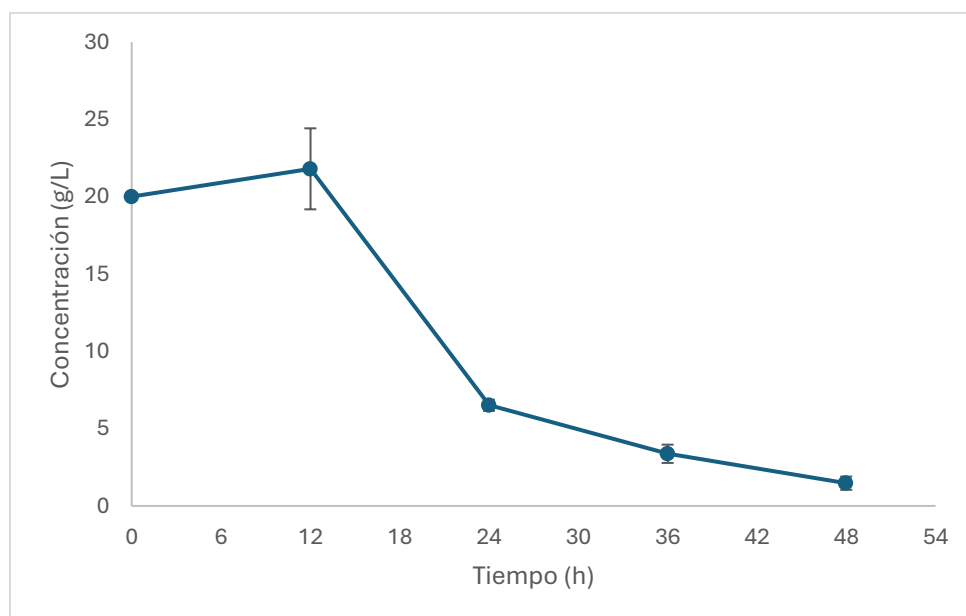
	WMT1	DESVEST	INTER CONF
0	20	0	
12	19,74241158	1,507169	2,241395652
24	14,84312633	3,355491	4,990138394
36	8,925554627	3,933449	5,849650891
48	1,748352362	0,486831	0,72399289

	WMT2	DESVEST	INTER CONF
0	20	0	
12	19,4017451	0,990703	1,473330388
24	12,2356818	1,852859	2,755490478
36	9,420310034	1,754086	2,608599217
48	1,222964819	1,661165	2,470411177

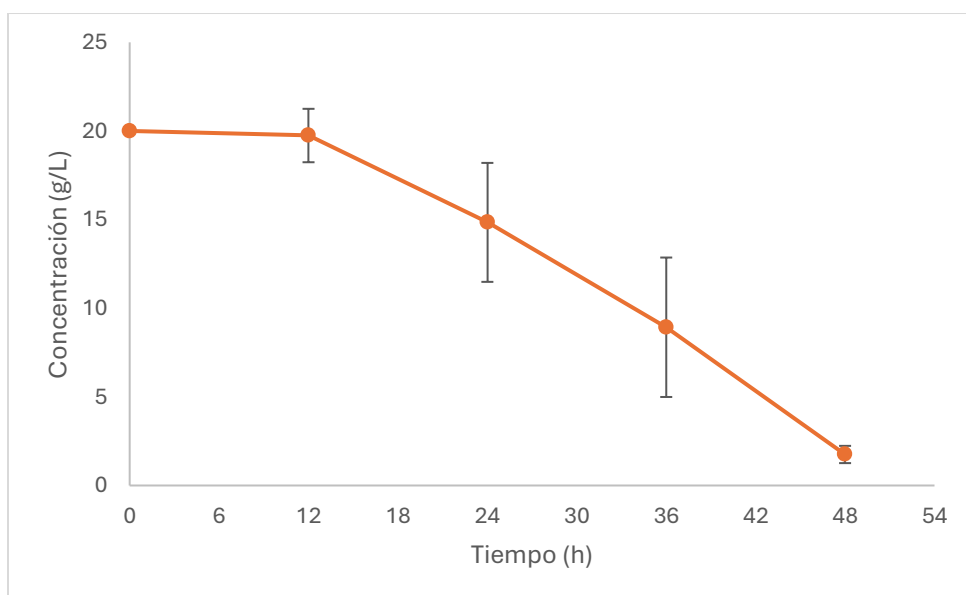
	MMT	DESVEST	INTER CONF
0	20	0	
12	21,52847396	1,918404	2,852965131
24	11,8125174	1,324718	1,970061372
36	5,46679198	2,306318	3,429854154
48	1,673628516	0,494246	0,73502104

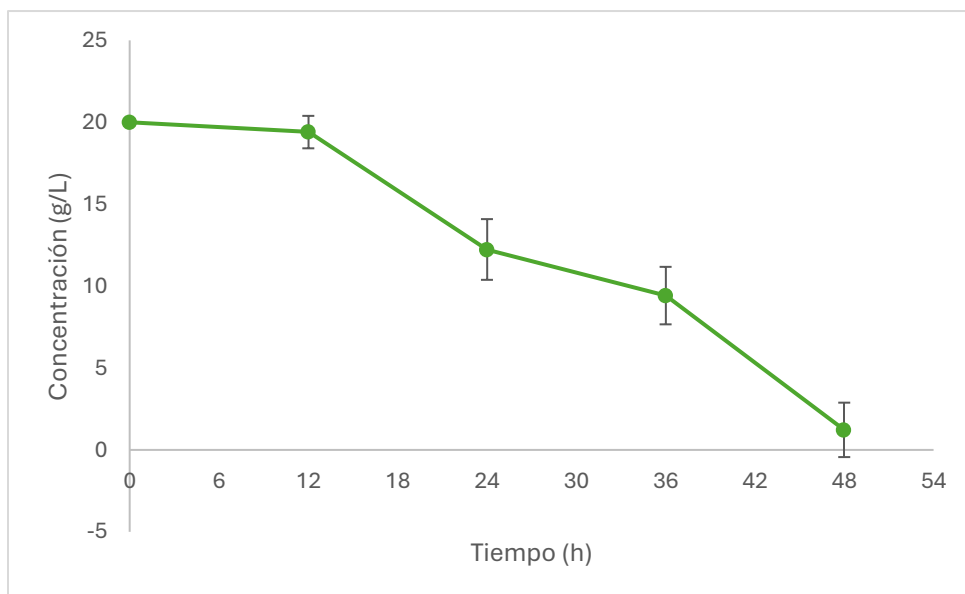
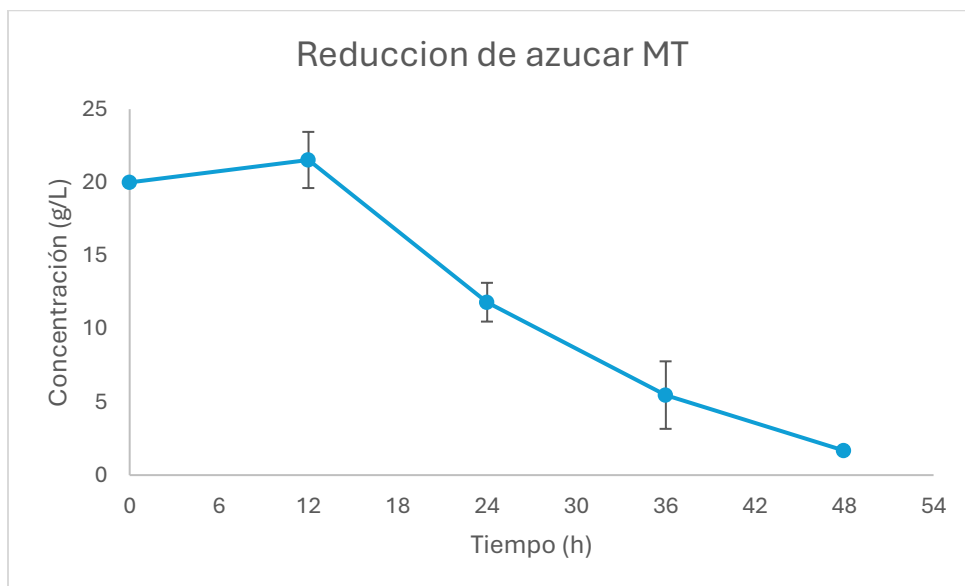
ANEXO F: GRAFICAS INDIVIDUALES DE REDUCCIÓN DE AZUCRES DE CADA MEDIO

MT



WMT1



WMT2**MMT**

**ANEXO G: DATOS OBTENIDOS TRAS EL ANALISIS DE ACIDO LACTICO PARA
LOS MEDIOS DE FERMENTACIÓN**

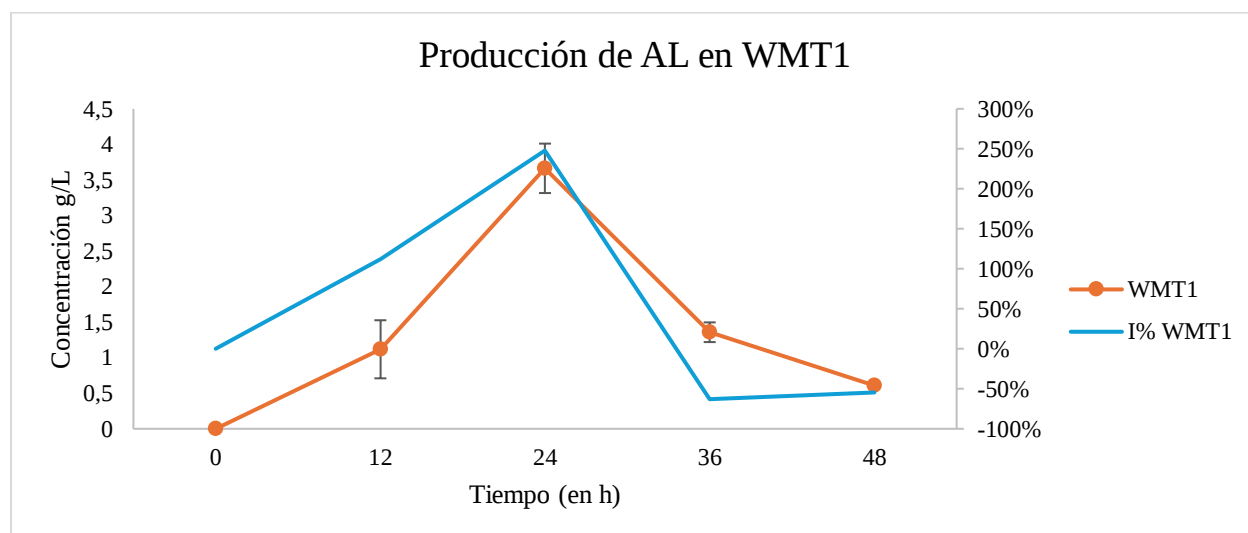
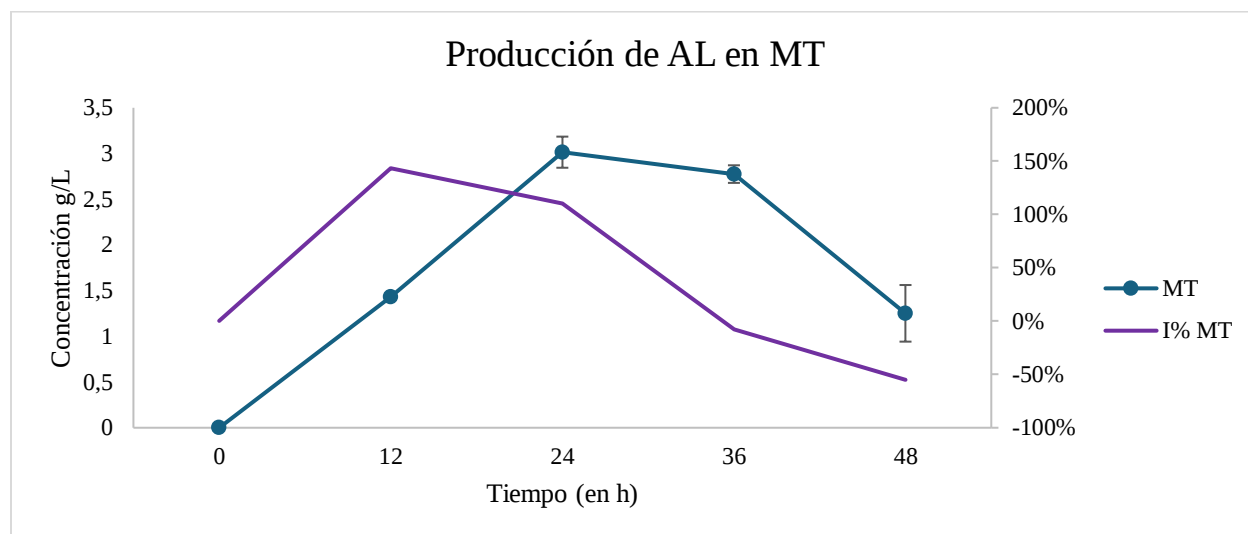
Inj .	Injection Name	Ret.Time	Area	Height				
No .	Selecte d Peak:	min	mAU*min	mAU				
		UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	Concentraci on	FACTO R	g/L	Incremen to
		Ácido Láctico	Ácido Láctico	Ácido Láctico				
1	I 1.1	2,377	0,1262	1,23	40,4667	809,333333	0,8093	80,93%
2	I 1.2	2,377	0,1495	1,6	48,2333	964,666667	0,9647	96,47%
3	I 1.3	2,38	0,242	2,91	79,0667	1581,33333	1,5813	158,13%
4	I 2.1	2,377	0,1395	1,79	44,9000	898	0,8980	89,80%
5	I 2.2	2,38	0,2179	3,23	71,0333	1420,66667	1,4207	142,07%
6	I 2.3	2,377	0,1791	2,39	58,1000	1162	1,1620	116,20%
7	I 0.1	2,377	0,2184	2,4	71,2000	1424	1,4240	142,40%
8	I 0.2	2,377	0,2211	2,46	72,1000	1442	1,4420	144,20%
9	II 1.1	2,38	0,5209	8,17	172,0333	3440,66667	3,4407	325,12%
10	II 1.2	2,38	0,5276	8,72	174,2667	3485,33333	3,4853	261,30%
11	II 1.3	2,38	0,6144	9,32	203,2000	4064	4,0640	157,00%
12	II 2.1	2,38	0,5775	9,42	190,9000	3818	3,8180	325,17%
13	II 2.2	2,38	0,6379	9,77	211,0333	4220,66667	4,2207	197,09%
14	II 2.3	2,38	0,6126	9,93	202,6000	4052	4,0520	248,71%
15	II 0.1	2,38	0,4389	7,19	144,7000	2894	2,8940	103,23%
16	II 0.2	2,38	0,475	7,54	156,7333	3134,66667	3,1347	117,38%
17	III 1.1	2,38	0,1938	2,75	63,0000	1260	1,2600	-63,38%
18	III 1.2	2,377	0,1995	2,85	64,9000	1298	1,2980	-62,76%
19	III 1.3	2,38	0,2323	3,27	75,8333	1516,66667	1,5167	-62,68%
20	III 2.1	2,377	0,1703	2,67	55,1667	1103,33333	1,1033	-71,10%
21	III 2.2	2,377	0,2021	3,1	65,7667	1315,33333	1,3153	-68,84%
22	III 2.3	2,377	0,2251	3,37	73,4333	1468,66667	1,4687	-63,75%

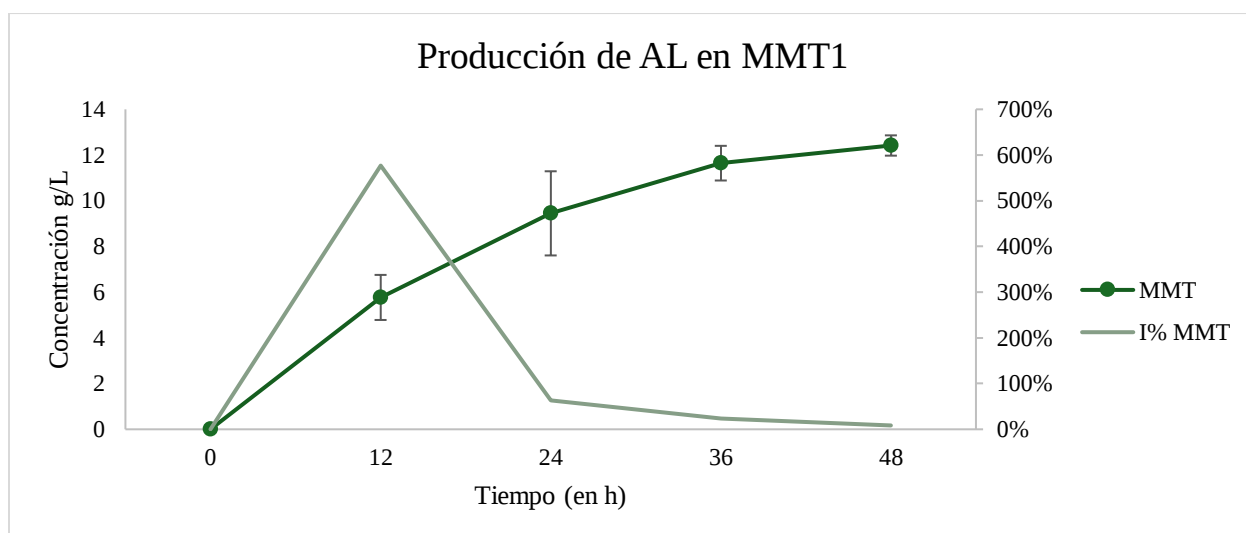
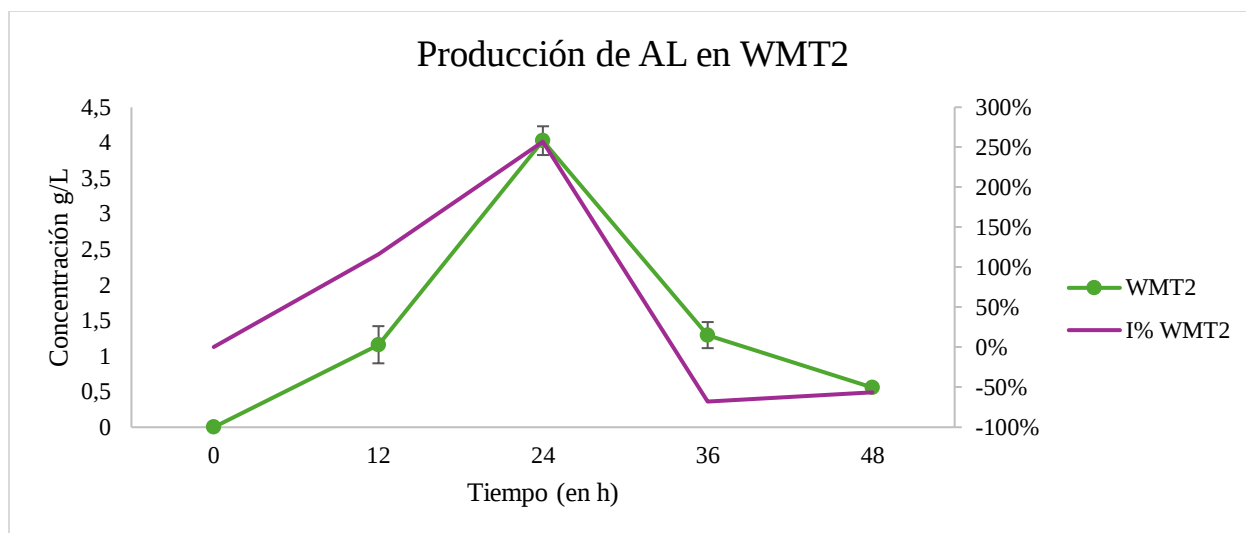
23	III 0.1	2,38	0,4108	6,01	135,3333	2706,666 67	2,7067	-6,47%
24	III 0.2	2,38	0,4312	6,31	142,1333	2842,666 67	2,8427	-9,32%
25	IV 1.1	2,373	0,0951	1,42	30,1000	602	0,6020	-52,22%
26	IV 1.2	2,373	0,0973	1,54	30,8333	616,6666 67	0,6167	-52,49%
27	IV 1.3	2,373	0,0963	1,39	30,5000	610	0,6100	-59,78%
28	IV 2.1	2,373	0,0857	1,38	26,9667	539,3333 33	0,5393	-51,12%
29	IV 2.2	2,373	0,0907	1,46	28,6333	572,6666 67	0,5727	-56,46%
30	IV 2.3	2,373	0,0895	1,38	28,2333	564,6666 67	0,5647	-61,55%
31	IV 0.1	2,377	0,1597	2,81	51,6333	1032,666 67	1,0327	-61,85%
32	IV 0.2	2,377	0,2254	3,6	73,5333	1470,666 67	1,4707	-48,26%
	0.3 I		0,8441	10,14	279,7666667	5595,333 33	5,5953	559,53%
	0.3 II		1,3914	19,15	462,2	9244	9,2440	65,21%
	0.3 III		1,6872	24,11	560,8	11216 0	11,216 0	21,33%
	0.3 IV		0,7992	8,45	264,8	5296	5,2960	-52,78%
	3.1 I		0,6147	7,33	203,3	4066	4,0660	406,60%
	3.1 II		0,9528	12,08	316	6320	6,3200	55,44%
	3.1 III		0,9172	10,8	304,1333333	6082,666 67	6,0827	-3,76%
	3.1 IV		1,8048	26,83	600	12000 0	12,000 0	97,28%
	3.2 I		0,8589	10,87	284,7	5694	5,6940	569,40%
	3.2 II		1,3681	19,84	454,4333333	9088,666 67	9,0887	59,62%
	3.2 III		1,671	24,06	555,4	11108 0	11,108 0	22,22%
	3.2 IV		1,9373	29,41	644,1666667	12883,33 33	12,883 3	15,98%
	3.3 I		0,8814	10,71	292,2	5844	5,8440	584,40%
	3.3 II		1,476	20,6	490,4	9808	9,8080	67,83%
	3.3 III		1,8318	26,68	609	12180 0	12,180 0	24,18%
	3.3 IV		1,8601	27,42	618,4333333	12368,66 67	12,368 7	1,55%

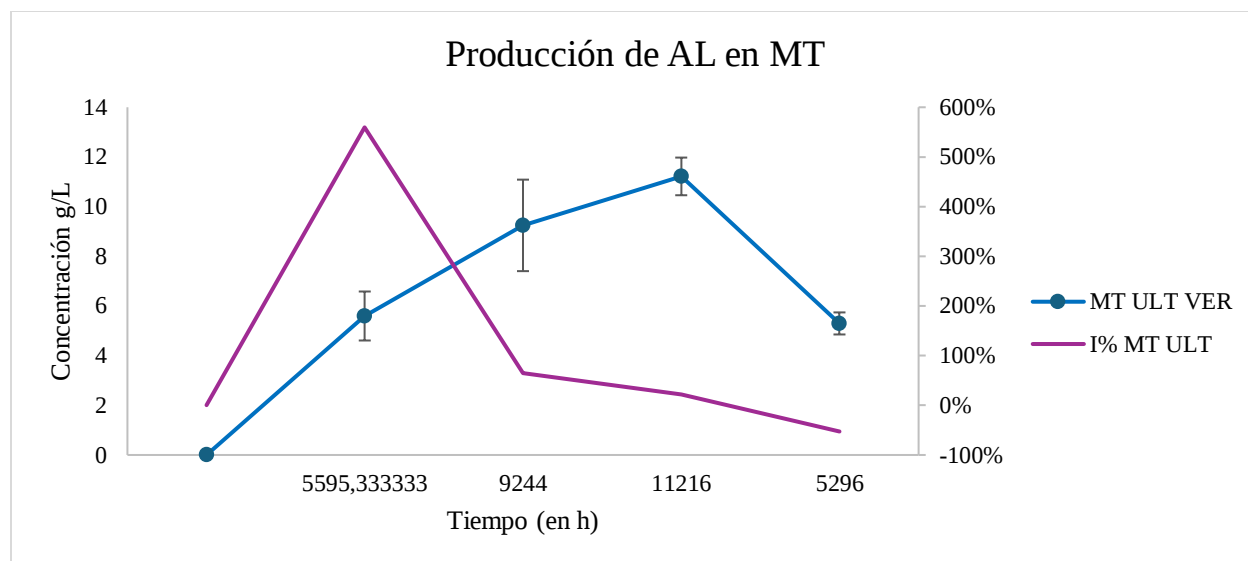
MT					
Tiempo	g/L	DES VEST	INT CONF	0,00%	0,00%

12	1,4330	0,01272792	0,014402735	143,30%	143,30%
24	3,0143	0,17017703	0,192569902	110,31%	253,61%
36	2,7747	0,09616652	0,108820665	-7,89%	245,71%
48	1,2517	0,30971277	0,350466552	-55,06%	190,66%
WMT1					
0	0	0		0,00%	0,00%
12	1,1184	0,40832794	0,462058068	111,84%	111,84%
24	3,6633	0,34770549	0,393458578	247,81%	359,65%
36	1,3582	0,1385261	0,156754163	-62,94%	296,71%
48	0,6096	0,00734343	0,008309718	-54,83%	241,88%
WMT2					
0	0	0		0,00%	0,00%
12	1,1602	0,26133787	0,295726204	116,02%	116,02%
24	4,0302	0,20221477	0,228823353	256,99%	373,01%
36	1,2958	0,18345006	0,207589475	-67,90%	305,11%
48	0,5589	0,01740158	0,019691374	-56,38%	248,74%
MMT					
0	0	0		0,00%	0,00%
12	5,7690	0,98608384	1,115838402	576,90%	576,90%
24	9,4483	1,84160707	2,083936286	63,72%	640,62%
36	11,6440	0,75801847	0,857762886	23,20%	663,83%
48	12,4173	0,44367305	0,502054097	8,77%	672,59%
MT alternativo					
0	0			0,00%	0
12	5,5953	0,01272792	0,014402735	559,53%	559,53%
24	9,244	0,17017703	0,192569902	65,21%	624,74%
36	11,216	0,09616652	0,108820665	21,33%	646,08%
48	5,296	0,30971277	0,350466552	-52,78%	593,29%

ANEXO H: PRODUCCION DE ACIDO LACTICO E INCREMENTO DE ESTE EN LOS MEDIOS DE FERMETNACIÓN







**ANEXOS I: VALORES OBTENIDOS EN LA MEDICIÓN DE LA ACIDEZ EN CADA
MEDIO DE FERMENTACIÓN**

Medio	Tiempos	pH
MT	0	6
	12	6,02
	24	5,53
	36	6,38
	48	6,57
	0	5,96
	12	6,03
	24	5,50
	36	6,33
	48	6,67
	0	6,09
	12	5,93
	24	5,43
	36	6,27
	48	6,6
WMT1	0	6
	12	6,05
	24	5,59
	36	6,5
	48	6,84
	0	6,15
	12	6,04
	24	5,52
	36	6,45
	48	6,79
	0	6,09
	12	6,02
	24	5,44
	36	6,32
	48	6,67
WMT2	0	6
	12	6,07
	24	5,8
	36	6,17
	48	6,5
	0	5,95

	12	6,13
	24	5,75
	36	6,05
	48	6,38
	0	6,11
	12	6,18
	24	5,74
	36	6,28
	48	6,75
	0	6,13
MMT	12	6,27
	24	5,9
	36	5,55
	48	5,7
	0	6,1
	12	6,25
	24	5,65
	36	5,38
	48	5,43
	0	6,2
	12	6,28
	24	5,67
	36	5,36
	48	5,44

**ANEXO J: FOTOGRAFÍAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO en BIOREACTORES ,
MUESTRAS y FERMENTACIONES**

Cultivo en agar



Máquina de destilación Kjeldahl



Método DNS



Medios MT, WMT1 Y WMT2 antes de la esterilización



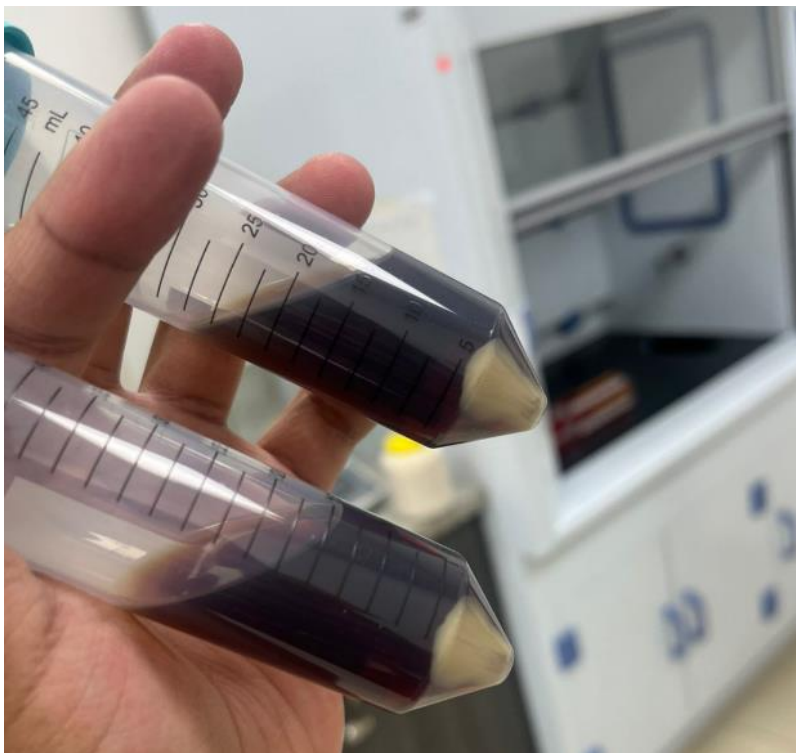
Medios MT, WMT1 Y WMT2 después de la esterilización antes de la fermentación



Medios MT, WMT1 Y WMT2 después de la fermentación



Centrifugación y separación de la biomasa



Comparación de la fermentación final del medio MMT (izquierda) y MT (derecha) donde el MMT se nota muy gasificado.



ANEXO K: LISTA DE MATERIALES

Preparación de las cepas para cultivo

- Hisopos esterilizados
- Ultra congelador -80°C
- Cámara de flujo con luz UV
- Cajas Petri
- Frascos Boeco
- Asa bacteriológica
- Mechero de etanol
- Cepas *B. subtilis*
- Agar
- NaCl
- Triptona
- Extracto de levadura
- Autoclave: UNICLVE FD50A
- Vaso de precipitación
- Etanol al 95%
- Balanza analítica: Digital Analytical Balance US SOLID

Fermentación en medio MT con cepas *B. subtilis*

- Asa bacteriológica
- Algodón
- Rollo de gasa

- Pipeta de 5 ml
- Erlenmeyer de 500ml
- Incubadora con agitación
- Mechero de etanol
- Autoclave
- Dextrosa
- Peptona
- Extracto de levadura
- Probeta de 100 ml
- Vaso de precipitación de 50ml
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- K_2HPO_4
- MgCl_2
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- MgO
- CaCO_3
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- H_3BO_3
- HCl Concentrado

- Etanol al 95%

Sustituyentes

- Concentrado de proteína de Suero de leche - Naked WHEY
- Melaza “blackstrap” tipo C de caña de azúcar

Cuantificación de biomasa

- Viales de 1.5ml
- Puntas plásticas
- Pipeta de 1000ul
- Mechero de etanol
- Centrifuga HERMLE-Z206-A

Cuantificación de azúcares

- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Indicador DNS
- Celda espectrofotométrica de cuarzo
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Balanza analítica
- Vortex Scientific Industries Inc.
- Baño María
- Vaso de precipitación

- Parafilm M
- Pipeta de 1000ul
- Pipeta de 100ul
- Puntas de 1000ul
- Puntas de 100ul
- Balón volumétrico de 10 ml

Cuantificación de proteínas (Método Kjeldahl)

- H_2SO_4 - Ácido sulfúrico concentrado
- Catalizador Kjeldahl
- Pastilla antiespumante
- Unidad de digestión: DK 6-VELP Scientifica
- H_3BO_3 - Ácido Bórico
- Agua destilada
- Unidad de destilación UDK 139 – VELP Scientifica
- Indicador Tashiro
- HCl – Concentrado
- Erlenmeyer
- Bureta volumétrica
- Vaso de precipitación
- Tubos de mineralización
- Agua destilada

Cuantificación de ácido láctico

- HPLC Dionex Thermo Ultimate 3000
- Buffer de fosfato
- Columna C8
- Viales para HPLC
- Filtros para jeringas
- Jeringas
- Agua tipo I
- Agua tipo II
- Balones volumétricos
- Micropipetas Eppendorf de 1.10 μ l y 10-100 μ l
- Ultrasonido