OBTENCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE UN FERMENTADO DE *LACTOBACILLUS* CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA PARA EL CUIDADO DE LA PIEL

Johan Sebastian Arbelaez Narvaez

Tatiana Marcela Rodríguez Suarez

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

Química

Química Farmacéutica

Cali

2024

OBTENCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE UN FERMENTADO DE *LACTOBACILLUS* CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA PARA EL CUIDADO DE LA PIEL

Johan Sebastian Arbelaez Narváez

Tatiana Marcela Rodríguez Suárez

Trabajo de grado para optar por el título de Químico y Química farmacéutico

Tutor: Juan Fernando Pinillos Madrid

Químico Farmacéutico

Co-tutor: Esteban González Rodríguez

Químico Farmacéutico

Cali

2024

AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del Tutor:

Juan Fernando Pinillos Madrid

Firma del Co-Tutor:

Esteban González Rodríguez

Firma del estudiante 1:

Johan Sebastian Arbelaez Narváez

Firma del estudiante 2:

Tatiana Marcela Rodríguez Suárez

ÍNDICE

1. Resumen 5
2. Introducción 6
3. Metodología 10
3.1 Esterilización de materiales 10
3.2 Preparación del sustrato (Cáscara-mango) 10
3.3 Preparación del hidrolizado para fermentación 10
3.4 Filtración 10
3.5 Ajuste de pH 10
3.6 Preparación de curva de calibración de glucosa 11
3.7 Curva de crecimiento estándar de *L. plantarum* 12
3.8 Activación de la bacteria 13
3.9 Fermentación 13
3.10 Control de parámetros 13
3.10.1 Cuantificación de azúcares reducidos (DNS) 13
3.10.2 Determinación de grados brix 14
3.10.3 Determinación del ácido láctico 14
3.10.4 Diluciones seriadas 15
3.10.5 Determinación de vitamina C 15
3.11 Lisis de la bacteria 16
3.12 Identificación de lisis bacteriana 16
3.13 Diseño experimental 16
4. Resultados y discusión 17
5. Conclusiones 27
6. Agradecimientos 27
7. Anexos 28
8. Referencias bibliográficas 30

1. Resumen

El proyecto de investigación tuvo como objetivo producir un fermentado de *Lactobacillus plantarum* a partir de residuos agroindustriales (cáscaras de mango) para su aplicación en la industria cosmética. Para ello, se realizó una búsqueda exhaustiva de referencias bibliográficas sobre los diferentes procesos de fermentación a partir de hidrólisis ácida. Posteriormente, se diseñó y llevó a cabo una metodología de fermentación que involucra una hidrólisis ácida de las cáscaras de mango para obtener monosacáridos de glucosa, seguida de ensayos de fermentación a diferentes condiciones de pH y temperatura. Durante los ensayos, se monitoreó la disminución del pH y de los azúcares, así como la producción diaria de ácido láctico y la concentración de bacterias al inicio y final de la fermentación. Finalmente, se puede concluir que la metodología de fermentación diseñada es una buena alternativa para producir ácido láctico a partir de residuos agroindustriales. Además, se estableció que las condiciones óptimas para la mayor producción de ácido láctico son una temperatura de 30°C y un pH de 6.

Palabras clave: Hidrólisis ácida, *Lactobacillus plantarum*, fermentación, ácido láctico, azúcares reductores, pH.

2. Introducción

El mercado en alimentos y bebidas ha presentado un alto nivel de consumo del ácido láctico desde 1982; donde más del 50% de ácido láctico producido es usado para dar el sabor característico de la masa madre en productos de panadería. También se usa como saborizante, acidulante, inhibidor de deterioro bacteriano en alimentos procesados, como bebidas suaves, dulces, mermeladas, jaleas, regulador de acidez en comidas, entre otros [1]. De igual manera, es empleado en formulaciones farmacéuticas como lociones, ungüentos, y en la preparación de polímeros biodegradables. Actualmente, el ácido láctico obtenido de la fermentación de *Lactobacillus* se encuentra alrededor de un 0.52% como ingrediente de formulaciones cosméticas, con la función de mantener la piel en buenas condiciones, regular pH y humectar. Entre los productos que más lo contienen, destacan, lociones y cremas faciales, agua micelar, suero hidratante y tratamiento para el contorno de ojos [2].

Naturalmente, este ácido se produce como dos enantiómeros que resultan en tres tipos de ácido láctico; dos isómeros ópticos, el D (-) ácido láctico, L (+) ácido láctico y su forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas D y L. Aquí, es importante resaltar que el isómero D(-) es nocivo para el metabolismo humano y puede causar principalmente acidosis y descalcificación. No obstante, se ha reportado que el isómero L(+) es asimilado en el ser humano en la producción de la enzima L-lactato deshidrogenasa y es clasificado por la FDA como una sustancia GRAS, generalmente reconocido como seguro para uso como aditivo alimenticio[1,3]. Comercialmente, el ácido láctico puede ser producido a través de síntesis química o por fermentación microbiana. De la síntesis química, se obtiene una mezcla racémica de ácido láctico; aumentando así, el costo de separación. Por otro lado, la síntesis de manera biológica produce ácido láctico ópticamente puro (D y L) mediante fermentaciones microbiológicas. En las cuales, se usan bacterias ácido-lácticas (BAL) y se controlan ciertas condiciones como la temperatura, concentración de sustrato y el pH. Además, la síntesis biológica permite usar materias primas baratas como residuos agroindustriales ricos en carbohidratos, que pueden usarse como sustrato de fermentación, disminuyendo los costos de producción.

La producción biotecnológica de ácido láctico es llevada a cabo por microorganismos BAL que incluyen los géneros *Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus Tetragenococcus, Vagococcus* y *Weissellla* [4].Y, los hongos filamentosos del género *Rhizopus*. Debido al gran número de bacterias lácticas, son de mayor interés los géneros altamente productores de ácido láctico. Entre estos, destacan algunas especies de bacterias del género *Lactobacillus*.

El género *Lactobacillus* está comprendido por bacterias de forma bacilar de 0,5 – 1,2 x 1,0 – 10,0 µm. Son bacterias Gram +, anaerobias facultativas, de cadena corta, no formadoras de esporas, con pruebas de catalasa y citocromo negativas. Según las secuencias del ARNr 16S, los lactobacilos se distribuyen filogenéticamente en siete grupos: *Lb. buchneri , Lb. casei , Lb. delbrueckii , Lb. plantarum , Lb. reuteri , Lb. sakei y Lb. Salivario*[5]. Son exigentes en cuanto a aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos, degradan la sacarosa para producir lactato. Para el crecimiento de *Lactobacillus* se consideran indispensables aminoácidos como leucina, valina, ácido glutámico, arginina, tirosina y triptófano; el pantotenato y el niacina son dos vitaminas necesarias, así como la presencia de ciertos metales como el Mn^{2+} y el Fe^{2+} [5,6,7].

Lactobacillus Se puede clasificar en bacterias homofermentativas y heterofermentativas según la fermentación de lactosa. El metabolismo homoláctico de las bacterias ácido lácticas (BAL) implica la conversión de hexosas como la glucosa y la fructosa a través de la vía de Emden-Meyerhoff, generando ácido láctico como producto principal, mientras que las pentosas se metabolizan mediante la vía de la fosfocetolasa o del fosfato de pentosa, produciendo también ácido láctico[3,8,9]. Aunque la glucosa es el sustrato preferido, las BAL pueden utilizar fructosa, sacarosa y maltosa como alternativas. En presencia de glucosa, estas bacterias realizan una fermentación homoláctica, transformando el piruvato en ácido láctico y regenerando NADH a través de un lactato deshidrogenasa dependiente de NAD^+. Las bacterias homofermentativas son altamente eficientes en la conversión de azúcares, especialmente glucosa, en ácido láctico, utilizando el piruvato como aceptor de electrones y, ocasionalmente, generando etanal que se reduce posteriormente a etanol [10,11].

Por otro lado, las bacterias heterofermentativas del ácido láctico, como *Lactobacillus* (*plantarum, ramnosus, coryneformis, curvatus, casei, paracasei, brevis, buchnerí, fermentun, kéfir, reuteri, leuconostoc*), utilizan la vía del 6 fosfogluconato/fosfocetolasa para fermentar hexosas, produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono a partir de glucosa en condiciones anaeróbicas [10]. En este metabolismo heteroláctico, se forma xilulosa-5 fosfato a partir de glucosa-6 fosfato, que se divide en acetilfosfato y gliceraldehído 3-fosfato. El gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ácido láctico, mientras que el acetilfosfato puede tener diferentes destinos según las condiciones ambientales. El uso de aceptores de electrones alternativos en las BAL heterofermentativas posibilita la utilización de acetilfosfato para producir ATP [9,11,12]. Algunas de estas bacterias no pueden fermentar la glucosa sin la presencia de aceptores de electrones alternativos debido a la falta de alcohol deshidrogenasa.

La encapsulación es un proceso en el cual, un componente activo o núcleo es atrapado o cubierto por una pared matricial. Esta matriz aísla a la molécula bioactiva del ambiente que la rodea hasta que se libera en respuesta a las condiciones externas, por ejemplo, presión, pH, temperatura, etc. Dicha pared, puede componerse de algún polímero, ya sea natural o sintético, estos pueden ser, gomas, lípidos, carbohidratos, celulosas, proteínas y materiales inorganicos[13,14]. Este proceso, se puede llevar a cabo mediante nanoencapsulación o microencapsulación. Generalmente, existen diversos métodos para la encapsulación de ingredientes activos, entre los cuales, destaca el secado por aspersión (spray drying) método más usado para la encapsulación en un 80-90%. El porcentaje restante, corresponde a técnicas como la aspersión en frío (spray-chilling), lecho fluido, liposomas, complejos de inclusión molecular, electroaspersión coaxial, liofilización, gelación iónica, entre otros[13,15,16].

De esta forma, la encapsulación de biocompuestos, tales como ácidos, probióticos, enzimas, minerales, vitaminas y antioxidantes se lleva a cabo en las industrias alimenticias, farmacéuticas y cosméticas con el fin de obtener productos funcionales[17,18]. Esta técnica tiene como objetivo, proteger el principio activo de degradación, controlar la liberación en un tiempo determinado y enmascarar el olor o sabor del compuesto principal. Además de esto,

también proporciona estabilidad durante el almacenamiento y mejora las cualidades organolépticas, entre otros[18].

3. Metodología

3.1 Esterilización de materiales

Esterilizar los materiales requeridos para el procedimiento experimental a 121°C durante 30 minutos a 15 psi.

Mantener condiciones asépticas durante todo el procedimiento, incluyendo la sanitización de materiales, manos y superficies de trabajo.

3.2 Preparación del sustrato (Cáscara-mango)

Pelar y picar 35 g de cáscaras de mango maduras en pequeños trozos, mezclarlas con 140 mL de agua destilada en proporción 1:4 p/v, y someterlos al procesador de comida eléctrico hasta que el fluido quede lo más homogéneo posible, a temperatura ambiente (25 °C)

Una vez licuado, depositar el fluido resultante en un Erlenmeyer de 250 mL limpio.

3.3 Preparación del hidrolizado para fermentación

Adicionar 5 mL de H2SO4 al 96% al Erlenmeyer de 250 mL que contiene el fluido resultante del licuado, para obtener una concentración final de ácido del 4% en el hidrolizado.

Agitar por 10 minutos y colocar un tapón de algodón o envolver con papel aluminio.

Autoclavar a 121°C durante 30 minutos a 15 psi. Posteriormente, dejar enfriar el hidrolizado ácido.

3.4 Filtración

Una vez que el hidrolizado esté a temperatura ambiente, filtrar usando una bomba de vacío y un filtro Whatman.

3.5 Ajuste de pH

Ajustar el pH del hidrolizado con NaOH puro, agregar la cantidad que sea necesaria hasta obtener un pH de 6 y 4. Medir el pH usando tiras indicadoras, y para finalizar, el pH metro,

tomando una muestra en un tubo falcón. Evitar contaminar el hidrolizado (no introducir magnetos, varillas, espátulas etc).

3.6 Preparación de curva de calibración de glucosa

A partir de una solución stock de glucosa de 2 mg/mL, preparar soluciones con concentraciones entre 0.0-1.4 mg/mL (el volumen final de la solución será de 500µL).

Agregar 500µL de DNS a las soluciones de glucosa, agitar.

Cubrir los tubos con papel aluminio y rotular con las concentraciones respectivas.

Calentar los tubos entre 94-100°C por 5 minutos.

Enfriar usando baño en hielo por 30 segundos y adicionar 3.5 mL de agua destilada a cada tubo, agitar.

Transferir parte del contenido de los tubos a celdas previamente rotuladas**.**

Leer en el espectrofotómetro a 540 nm. Recuerde calibrar con el blanco (solución de glucosa 0 mg/mL).

Elaborar una curva de calibración de absorbancia vs concentración y determinar la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación.

En un tubo de ensayo, agregar 250 µL de muestra y 250 µL de DNS.

Colocar en baño maría por 5 minutos, detener la reacción en baño en hielo por 30 segundos.

Agregar 3.5 mL de agua destilada, agitar y dejar reposar por 15 minutos.

Determinar la absorbancia a 540 nm y usar como blanco el agua destilada.

3.7 Curva de crecimiento estándar de *L. plantarum*

Para conocer la cantidad de bacterias en el cultivo según el tiempo, y su fase exponencial y estacionaria, se realiza una curva de crecimiento.

Agregar 100 mL de caldo MRS a un Erlenmeyer de 250 mL y adicionar 3 a 5 colonias como inóculo.

Tapar el Erlenmeyer con un tapón de algodón y agitar la suspensión bacteriana en una incubadora Shaker a 150 rpm a 37°C por 72 horas.

Tomar 1 mL de la suspensión bacteriana para realizar medición del tiempo 0 en absorbancia a una longitud de 540 nm y para el recuento inicial.

Para el recuento inicial, realizar diluciones seriadas tomando 0,5 ml de la bacteria activada en series de tubos que contengan 4,5 ml del diluyente de solución salina 0.9%.

Sembrar 100 µL de inóculo en cada caja Petri que contiene agar MRS, usar un Asa en L estéril para la siembra, incubar a 37 °C por 72 h.

Se realizan las diluciones seriadas pertinentes hasta llegar a 10^{-6}.

Para conocer la concentración de la bacteria, calcular UFC /mL para cada dilución usando la siguiente ecuación (1)

$$(1)\quad \frac{UFC}{mL} = \frac{Número\ de\ UFC \cdot factor\ de\ dilución}{Volumen\ sembrado}$$

Tener en cuenta, que se debe realizar medición de absorbancia y recuento de UFC/mL cada 12 horas hasta completar las 60 horas de incubación.

Finalmente, elaborar una curva de crecimiento de Tiempo vs concentración (UFC/mL)

3.8 Activación de la bacteria

Tomar 5 colonias de la caja Petri, realizar siembra en 100 mL de caldo MRS estéril, llevar a la incubadora shaker por 24-30 horas a 37°C y 150 rpm**.**

3.9 Fermentación

Una vez se tenga ajustado el pH del hidrolizado, adicionar 120 mL de hidrolizado y 30 mL de caldo MRS a un erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizado. Para un volumen final de fermentación de 150 mL.

Adicionar al erlenmeyer de fermentación un total de 7.5 mL de bacteria activada para una concentración del 5% de inóculo. Tener en cuenta que este proceso se debe hacer dentro de la cabina de flujo laminar.

Tapar el erlenmeyer con papel aluminio o con un tapón de algodón estéril, seguidamente introducir en la incubadora shaker con las siguientes condiciones 150 rpm y 30°C.

3.10 Control de parámetros

Para controlar adecuadamente el proceso de fermentación se toman medidas durante los 3 días, incluyendo el día 0.

3.10.1 Cuantificación de azúcares reducidos (DNS)

Una vez el hidrolizado tenga el caldo MRS, realizar la cuantificación de azúcares reductores. En tubos de ensayo, realizar una dilución ⅕ de muestra en agua destilada. Luego, agregar 500 µL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y agitar. Envolver los tubos con papel aluminio para proteger la reacción de la luz y calentar en un baño termostático a 92 °C por 5 minutos. Pasado ese tiempo, enfriar en los tubos en hielo por 1 minuto para detener la reacción. Adicionar 3,5 mL de agua destilada a cada tubo y agitar.

Realizar la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a longitud de onda de 540 nm

Usar como blanco DNS y agua destilada.

3.10.2 Determinación de grados brix

Determinar los grados brix usando un refractómetro portátil

Lavar y limpiar el prisma del refractómetro con agua destilada y secar.

Seguidamente, se debe calibrar el instrumento a 0 ya sea con agua destilada o con una colusión calibradora Brix.

Para medir, se debe dejar caer de 3 a 4 gotas sobre todo el prisma, dispersar de manera uniforme cubriendo con la tapa a temperatura ambiente 25°C.

Una vez utilizado, lavar el prisma con agua destilada, secar y guardar en su estuche.

Tener en cuenta que la muestra debe estar a temperatura ambiente, de lo contrario, los grados brix tendrán variaciones.

3.10.3 Determinación del ácido láctico

Realizar un método de acidez titulable usando NaOH 0,1 M estandarizado previamente con biftalato de potasio como agente titulante y fenolftaleína 1% como indicador.

Tomar 5 mL de muestra y adicionar 50 mL de agua destilada a un Erlenmeyer de 100 mL.

Agregar 2 gotas de la solución de fenolftaleína 1% y agitar para homogeneizar.

Agregar lentamente y con agitación la solución 0,1 M de hidróxido de sodio, hasta conseguir el cambio de color persistente por 1 minuto.

Leer en la bureta el volumen de solución empleada, registrar el valor, aplicar la ecuación (2) para hallar el porcentaje de ácido láctico.

$$(2)\quad \frac{g}{L}\,\text{ácido láctico} = \frac{L(NaOH)\cdot N\cdot 90}{V}$$

Donde

L= volumen de NaOH consumido en Litros

N= normalidad NaOH (Eq g/L)

90= peso equivalente del ácido láctico (g/Eq)

V= volumen en L de muestra titulada

3.10.4 Diluciones seriadas

Con el fin de llevar un registro del crecimiento de la bacteria durante este proceso, se realizan diluciones seriadas al día 0, día ½ y día 3 último día de fermentación.

Tomar 500 µL del caldo de fermentación y adicionar a un tubo de ensayo que contenga 4.5 mL del diluente estéril SSN 0.9%.

A partir de ese primer tubo, realizar diluciones en serie hasta llegar a 10^{-5}

Sembrar 100 µL de inóculo de cada tubo en cada caja Petri que contiene agar MRS, usar un Asa en L estéril para la siembra, incubar a 37 °C por 72 h.

Realizar todo este proceso en condiciones estériles dentro de la cabina de flujo laminar.

Para calcular las UFC/mL usar la ecuación (1)

3.10.5 Determinación de vitamina C

Se realiza una titulación por yodometria únicamente en el día 3 de la fermentación, a través de los siguientes pasos

Preparación almidón al 1%: pesar 0.5 g de almidón soluble, calentar en un frasco con 50 mL de agua destilada y dejar enfriar.

Agente titulante:

- Disolver 2.5 g de yoduro de potasio (KI) y 0.134 g de yodato de potasio (KIO3) en 100 ml de agua destilada.
- Añadir 15 ml de 3 M de ácido sulfúrico.
- Diluir la solución anterior en un balón aforado de 250 mL con agua destilada y agitar.

Solución estándar

-Pesar 250 mg de ácido ascórbico, llevar a un matraz de 250 mL y aforar con agua destilada.

- Sacar una alícuota de 25 ml de la solución estándar y agregar 1 ml de la solución indicadora (almidón) y mezclar.

-Titular con la solución de yodo hasta lograr viraje de color a azul permanente.

Preparación de la muestra

-Tomar una alícuota de 25 ml de muestra y depositar en un Erlenmeyer de 125 ml.

- Añadir 1 ml de la solución indicadora (almidón), mezclar bien.

- Titular la muestra con la solución de yodo hasta lograr viraje de color a azul oscuro

3.11 Lisis de la bacteria

Llevar el caldo de fermentación a ultrasonido a una frecuencia de 40kHz y con 100W de potencia transmitida al medio durante 10 minutos a 55°C.

Dejar reposar a temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos**.**

3.12 Identificación de lisis bacteriana

Realizar un proceso de siembra en agar MRS, incubar a 37°C por 72h.

En el caso de no observar crecimiento de colonias, indicaría que el proceso de lisis se realizó adecuadamente.

3.13 Diseño experimental

Para lograr un buen proceso de estandarización de la metodología de fermentación de ácido láctico, fue necesario plantear un diseño de experimentos factorial $2^{2.}$ En este, se pueden evaluar y analizar dos o más factores (variables) independientes, que los investigadores consideraron como factores que afectan al proceso planteado.

Para esta investigación, se plantearon dos factores como el pH y la Temperatura, cada uno con dos niveles (pH: 4 y 6, Temperatura: 30°C y 40°C). Cada nivel correspondiente a un

factor se combina con los demás niveles del segundo factor planteado Ver tabla 1. Estas combinaciones describen cómo realizar los experimentos de la manera más apropiada, para dar a conocer qué efecto tienen los niveles de los factores sobre la variable de respuesta que en este caso es la producción de ácido láctico, y permite determinar si hay una interaccionan entre ellos o no.

Tabla 1. Niveles y factores del diseño factorial 2^2.

pH	Temperatura (°C)
4	40
6	40
4	30
6	30

Inicialmente, se realizó una serie de experimentos para determinar qué concentración de ácido sulfúrico en el hidrolizado era la mejor para obtener una mayor cantidad de azucares, se evaluó concentraciones del 2% y 4%, los resultados se registran en la tabla. Una vez obtenido el diseño factorial, se llevaron a cabo dos ensayos del proceso de fermentación bajo las condiciones que el diseño proporcionó. Además, Se realiza un ensayo preliminar para usando únicamente hidrolizado (control negativo) para evaluar su efecto en la variable de respuesta. Cada uno de estos ensayos duró una semana, donde se monitoreo mediante acidez titulable, la producción del ácido láctico durante los tres primeros días de la fermentación. Ver tabla 2, 3 y 4.

Además, se realizó una supervisión constante de la disminución del pH (tabla 4) y del consumo de azúcares presentes en la fermentación (tabla 3). Con el fin de observar, de que, a medida que la bacteria utilizara los azúcares del hidrolizado preparado, también generara un cambio en el pH del este medio de fermentación tras la producción del ácido láctico.

4. Resultados y discusión

En primer lugar, en la figura 1 se presenta la curva de calibración de glucosa, realizada para conocer la cantidad de azucares usados por la bacteria durante la fermentación.

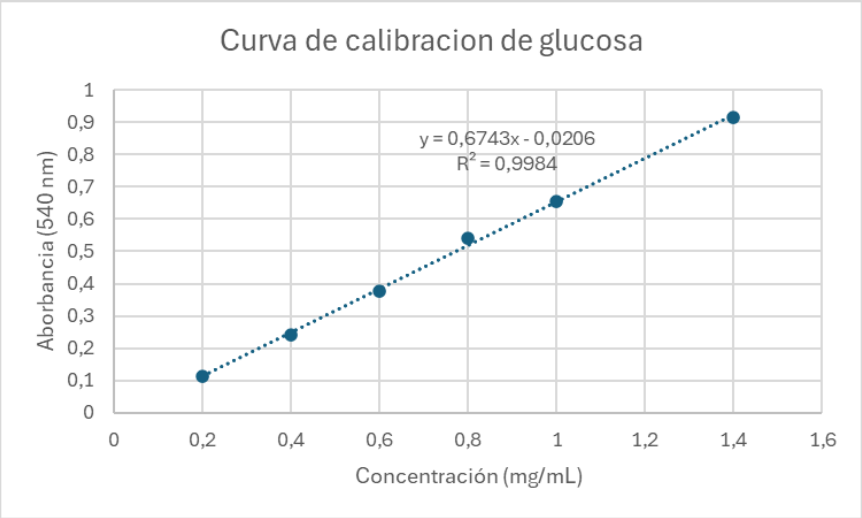


Figura 1. Curva de calibración de glucosa.

Adicionalmente, en la figura 2 se presenta la curva de crecimiento de L.plantarum durante 60 horas.

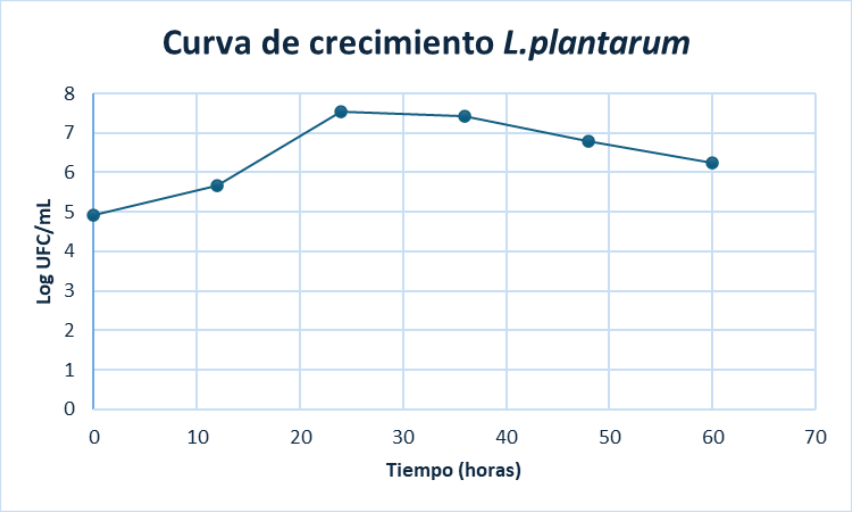


Figura 2. Curva de crecimiento de *L.plantarum.*

A continuación, se presentan los datos obtenidos del diseño factorial, junto con los resultados de los controles diarios realizados durante los 3 días de fermentación.

Tabla 2. Resultados del diseño factorial para la producción de ácido láctico.

pH	Temperatura (°C)	Observación	
		Ensayo	Ácido láctico (g/L)
4	40	1	5,63
6	40	1	4,86
4	30	1	4,68
6	30	1	12,24
4	40	2	5,58
6	40	2	3,06
4	30	2	3,42
6	30	2	9,36

Tabla 3. Cambio de azúcares (mg/mL).

pH	Temperatura (°C)	Cambio de azúcares (mg/mL)				
		Ensayo	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
4	40	1	0,49	0,48	0,40	0,36
6	40	1	0,39	0,38	0,36	0,32
4	30	1	0,59	0,41	0,31	0,26
6	30	1	0,60	0,44	0,25	0,21
4	40	2	0,49	0,45	0,39	0,37
6	40	2	0,58	0,46	0,39	0,36
4	30	2	0,54	0,46	0,43	0,36
6	30	2	0,41	0,32	0,28	0,24
Control (+)	40	1	0,63	0,38	0,25	0,25
Control (-)	40	1	0,53	0,44	0,41	0,31
Control (+)	30	2	0,65	0,09	0,08	0,12
Control (-)	30	2	0,56	0,51	0,43	0,62

Tabla 4. Cambio de pH.

pH	Temperatura (°C)	Cambio de pH				
		Ensayo	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
4	40	1	4,27	4,27	4,29	4,27
6	40	1	5,61	4,70	4,52	4,47
4	30	1	4,14	4,12	4,10	4,08
6	30	1	5,74	4,08	3,77	3,74
4	40	2	4,50	4,43	4,43	4,38

6	40	2	6,19	5,26	5,23	5,18
4	30	2	4,45	4,35	4,33	4,17
6	30	2	5,70	4,70	3,95	3,6
Control (+)	40	1	6,00	4,63	4,39	4,36
Control (-)	40	1	5,61	4,88	4,86	4,85
Control (+)	30	2	6,06	3,90	3,86	3,90
Control (-)	30	2	5,60	4,92	4,69	4,57

Además, se realizó un ensayo iniciando con un pH de 4,72 para observar su efecto en la variable de respuesta.

Tabla 5. Resultados experimentales del tratamiento a pH 4,72.

Cambio de pH	Día 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	4,72	4,13	3,83	3,81
g/L de ácido láctico	NA	8,1	9,414	10,08

La hidrólisis ácida es relevante en esta investigación, ya que permite obtener monosacáridos de glucosa a partir de biopolímeros como la celulosa y hemicelulosa, presentes en las paredes vegetales del mango. Es importante mencionar que, la celulosa se compone únicamente de monómeros de glucosa y la hemicelulosa de diferentes monómeros de azúcares como xilano, manano, galactano, glucano, glucuronoxilano, galactoglucomanano, entre otros [19]. Gracias a la hidrólisis ácida, todos estos monosacáridos son liberados de la pared celular tras romper los enlaces glucosídicos β (1-4), de esta manera la bacteria ácido láctica podrá consumir los azúcares presentes en durante la fermentación.

Basándose en los artículos donde realizan hidrólisis ácida de frutas, se encontró que al preparar un hidrolizado de ácido sulfúrico al 1% se obtienen muy buenos resultados en la liberación de azúcares. Se asegura que, bajo este porcentaje se puede favorecer la obtención de monosacáridos presentes en las fibras vegetales [20,21]. No obstante, con el fin de obtener una mayor cantidad de azúcares a partir de la cáscara de mango, se planteó preparar un hidrolizado con ácido sulfúrico al 2% y al 4%. Los azúcares totales de cada hidrolizado se cuantificaron por el método de DNS y grados brix ver tabla 6.

Tabla 6. Azúcares totales de los hidrolizados.

	% de ácido sulfúrico	azúcares totales (mg/mL)	Grados brix
Experimento 1	2%	0,84	7,6
	4%	0,88	10
Experimento 2	2%	0,69	5,4
	4%	0,73	8,8

En vista a los anteriores resultados, se decidió seguir preparando hidrolizados al 4%, ya que, presenta un leve incremento de azúcares comparado con el hidrolizado al 2%. Una vez seleccionando el % de ácido que tendrá el hidrolizado, se realiza la fermentación.

Para el diseño experimental, en artículos como (Fonseca et al., 2020) se ha reportado que la bacteria puede crecer a una temperatura de 37°C y que su pH óptimo se encuentra entre 4.5 y 6. Por consiguiente, se decidió tener un amplio rango de pH (4 y 6) y temperatura (30°C y 40°C) que permitiera un mejor análisis respecto al comportamiento de la bacteria, para así determinar cuál es el pH y la temperatura donde hay un mejor crecimiento microbiano y a su vez una mejor producción de ácido láctico [30].

Durante el proceso de fermentación se realizó tanto un control positivo (únicamente caldo MRS) como uno negativo (150 mL de hidrolizado). Se observa que, en control negativo, *L plantarum* logró adaptarse y utilizar carbohidratos presentes en el sustrato hidrolizado para iniciar la fermentación. Sin embargo, la producción de ácido láctico se encuentra entre el rango de 2-3 g/L. Las bacterias ácido lácticas son microorganismos nutricionalmente exigentes que requieren ciertas concentraciones de aminoácidos específicos. Por lo tanto, dependen de la producción de peptidasas proteinasas y sistemas de transporte de aminoácidos y péptidos [22]. Debido a dichos requerimientos nutricionales, y con el fin de obtener una mayor cantidad de ácido láctico, se decide suplementar el medio de fermentación con caldo MRS, con el fin de incrementar. Se escoge medio MRS como medio de suplementación e incubación de *L. plantarum,* ya que, por su formulación permite el adecuado desarrollo de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas. Este medio contiene proteosa peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa. Estas, constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano. Y, el citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas [23].

Adicionalmente, se elige una proporción de hidrolizado: MRS de ¼, es decir, 120 mL de hidrolizado y 30 mL de MRS, basándose en la relación planteada por Umesh y Preethi. Esta relación permitió obtener concentraciones de ácido láctico en g/L muy similares a las reportadas por estos investigadores, quienes obtuvieron 10 g/L de ácido láctico [24].

Según lo obtenido en la curva de crecimiento de *L. plantarum,* Se nota que, a partir de 36 horas la bacteria inicia su estado estacionario, reflejado en la disminución de UFC/mL. (figura 2). En esta fase, la bacteria comienza a agotar los nutrientes disponibles su catabolismo y anabolismo, al igual que, la presencia de sustancias de desecho convierte al medio en uno inhóspito para el crecimiento bacteriano. Una de estas sustancias es el ácido láctico, su acumulación reduce drásticamente el pH del medio, lo que ocasiona efectos inhibitorios, provocando así una disminución en el crecimiento celular, un período de fermentación prolongado y una reducción de la productividad del ácido láctico [25,26]. Por ello, al conocer que la bacteria luego de 36 horas entrará en estado estacionario, lo que significa que no habrá incremento significativo en la producción de ácido láctico. Y, en base a los cambios de pH obtenidos experimentalmente, el pH más bajo obtenido fue de 3,6 en el día 3 (tabla 4), para evitar una inhibición del crecimiento celular, se decide realizar el proceso de fermentación únicamente por 3 días.

La concentración de inóculo se estableció como una variable fija, del 5%. Puesto que, a mayor concentración de inóculo, habrá un proceso de fermentación más acelerado, una mayor producción de ácido láctico, con un menor tiempo de latencia. Basándose en el experimento de Wardani et al, se realizan tratamientos a diferentes concentraciones de inóculo para fermentación de leche, siendo la mayor 10%. Se llegó a la conclusión, de que la producción de ácido láctico, la disminución de pH y de azúcares, tanto en 5% como en 10% es muy similar, por ello, se opta por seleccionar un 5% de inóculo para este estudio [27].

Asimismo, se realizó medición de parámetros para llevar un control adecuado de proceso. Para la cuantificación de azúcares totales, se llevó a cabo el método de Miller con el ácido 3,5-dinitrosalicílico o también conocido como reactivo DNS. Ya que este reactivo reacciona solo con los azúcares reductores de una muestra. Además, su importancia radica en la alta sensibilidad y facilidad de obtención debido a que es una técnica espectrofotométrica [28]. De igual modo, se realizó un monitoreo diario de los azúcares presentes en fermentación y cambio de pH. Para observar una disminución constante de ambos parámetros (azúcares y pH) y poder asegurar que la bacteria consumiera los azúcares producto de la hidrólisis ácida como fuente de carbohidratos. Se esperaba que al tiempo en que se consumieran estos azúcares, se estuviera produciendo ácido láctico, por lo que se midió el cambio de pH, para observar que el medio se estuviera volviendo más ácido tras la obtención del ácido láctico, ver del anexo 1 al 2.1.

En lo que refiera a la determinación de la vitamina C, se evidencia que el método de titulación por yodometría no fue preciso, la cantidad de vitamina C presente es inferior al 1%. Por lo

tanto, se recomienda usar métodos como HPLC o espectrofotometría para una mejor sensibilidad.

Se observa que cuando el tratamiento tenía un pH inicial de 4,7 la producción de ácido láctico no se veía afectada (ver tabla 5). Sin embargo, cuando el pH inicial fue de 4,45 la producción de ácido láctico fue mucho más lenta, teniendo inclusive una caída en su producción al tercer día. Se evidencia la influencia del pH en la producción de ácido láctico, donde las condiciones óptimas evidenciadas de crecimiento se sitúan en un rango de pH de 5 a 6, muy similar a lo obtenido por Vega et al, donde evaluaron dos cepas de *L. plantarum,* y los mejores resultados se observaron desde pH 5 hasta pH 7,5 [29]. De la misma forma, la temperatura es un factor relevante, que impacta la producción de ácido láctico. Se obtuvo que cuando la temperatura era de 40°C, pasados los 3 días, no existía presencia alguna de crecimiento bacteriano y la producción de ácido láctico permaneció casi constante desde el día 1. Caso contrario a la temperatura de 30°C, que impacto positivamente en el crecimiento bacteriano.

Por otra parte, en base a los resultados de la producción del ácido láctico, se obtiene un análisis de varianza (ANOVA) a través del programa DisignExpert, ver tabla 7.

Tabla 7. ANOVA del modelo factorial seleccionado.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	62,23	3	20,74	12,64	0,0165	significant
A-Temperature	13,97	1	13,97	8,51	0,0433	
B-pH	13,03	1	13,03	7,94	0,0479	
AB	35,24	1	35,24	21,48	0,0098	
Pure Error	6,56	4	1,64			
Cor Total	68,8	7				

En la tabla anterior, se pueden observar todos los efectos de las variables independientes sobre la variable de respuesta (ácido láctico). Los valores P inferiores a 0.05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, se puede evidenciar que la temperatura y el pH tienen un efecto significativo. Sin embargo, la temperatura tiene un mayor efecto individual sobre la variable de respuesta comparada con el pH. Por otro lado,
se obtiene que la interacción doble de estos dos factores también es significativa, siendo esta mucho mayor que los efectos individuales. Por último, el valor F del modelo de 12.64 implica

que el modelo es significativo y que solo hay un 1.65% de posibilidades de que se produzca un valor F mucho más grande a causa del ruido (factores que no se consideraron en el modelo o errores de medición).

En la figura 3. Se encuentra el cuadro de Pareto en donde se muestra cómo los dos factores de tratamiento tienen un efecto significativo en la variable de respuesta.

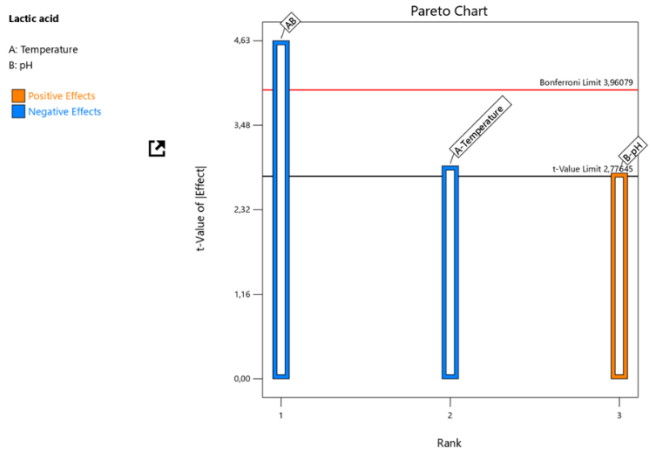


Figura 3. Cuadro de Pareto.

Por otro lado, en la tabla 8 de estadísticas de ajuste, se obtuvo un **R²** de 0.9046, lo cual significa que los resultados del diseño experimental son buenos y reproducibles. No obstante, el **R²** pronosticado de 0.6185 no está cercano al **R²** ajustado de 0.8331 como se esperaba. La predicción no es buena, ya que la diferencia está al límite de 0,2. Esto puede indicar un posible problema con el modelo y/o los datos. Ahora bien, se tiene que la precisión adecuada debe ser superior a 4. En este caso, su relación de 7.552 indica una señal adecuada y que el porcentaje de error nos es muy alto. Por último, se tiene que el porcentaje del coeficiente de variación es del 20.98%, lo que significa que los valores están muy dispersos de la media. Sin embargo, es importante considerar que este diseño es biológico, así que es normal que los valores difieran entre sí.

Tabla 8. Estadísticas de ajuste.

Std. Dev.	1,28	R^2	0,9046
Mean	6,1	Adjusted R^2	0,8331
C.V. %	20,98	Predicted R^2	0,6185
		Adeq Precision	7,5522

Adicionalmente, la tabla 9 muestra que, los efectos no tienen correlación y por lo tanto no hay un incremento significativo de la varianza. También, se encuentra que los factores de

temperatura y pH al presentar una estimación del coeficiente del -1.32 y 1.28 respectivamente, es dónde se obtendrá una mayor producción de ácido láctico. Esto quiere decir, que al trabajar a una temperatura de 30°C y a un pH 6, se generará un incremento del ácido láctico. Además, los valores VIF (factor de inflación de la varianza) son de 1.00, esto indica que los factores no tienen una multicolinealidad. Lo anterior significa que, los efectos no tienen correlación y por lo tanto no hay un incremento significativo de la varianza.

Tabla 9. Coeficientes en términos de factores codificados.

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	6,1	1	0,4528	4,85	7,36	
A-Temperature	-1,32	1	0,4528	-2,58	-0,0639	1
B-pH	1,28	1	0,4528	0,0189	2,53	1
AB	-2,1	1	0,4528	-3,36	-0,8414	1

Finalmente, en la figura 4 es posible observar cómo la producción de ácido láctico va incrementando acorde al aumento de la superficie del diagrama. Dicho en otras palabras, se obtendrán mejores resultados respecto a la producción si se trabaja a una temperatura de 30°C y a pH 6, de lo contrario, la producción será muy poca.

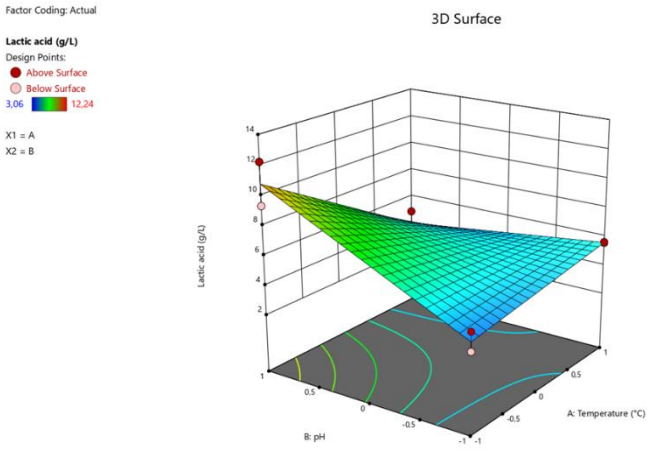


Figura 4. Diagrama de contorno (Superficie 3D).

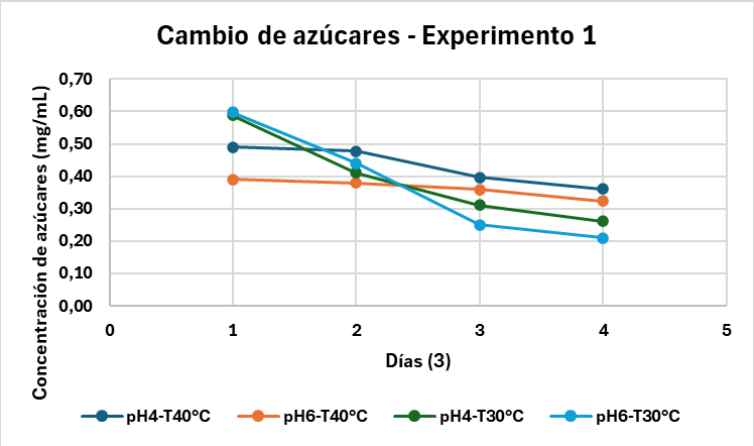
5. Conclusiones

Se evidencia que los mejores resultados de concentración de ácido láctico, en g/L, se obtienen a pH ligeramente básicos y a una temperatura de 30°C. Por el contrario, el uso de pH ácidos, inferiores a 4.5, y temperaturas elevadas, como 40°C, limita su producción. Es importante destacar que los azúcares provenientes del hidrolizado fueron consumidos por la bacteria, y la disminución del pH es indicativa de la producción de ácido láctico. Finalmente, la metodología de fermentación propuesta permitió obtener ácido láctico utilizando residuos agroindustriales como sustrato principal. Además, el diseño experimental sirve como modelo predictivo. Sin embargo, se recomienda realizar un mayor número de experimentos para determinar si las variables son realmente significativas.

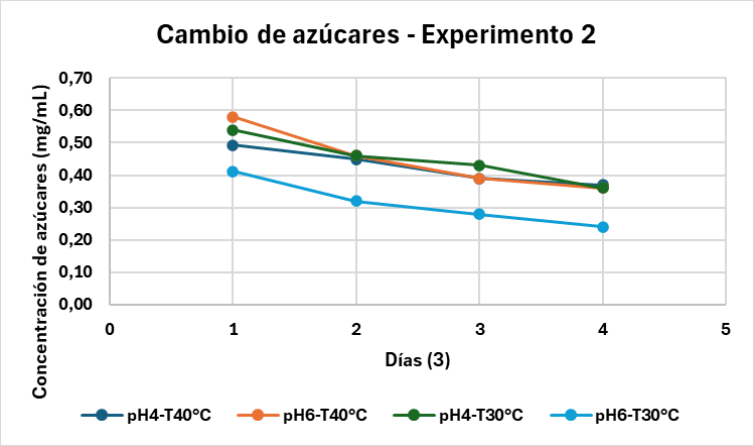
6. Agradecimientos

Primeramente, queremos expresar nuestra más sincera gratitud a Dios y a nuestras familias por el apoyo constante e incondicional durante todo el desarrollo de nuestro proyecto de grado. Agradecemos a nuestros tutores por toda la paciencia, disposición y confianza que depositaron en nosotros. Su orientación y guía fueron esenciales para cumplir con el objetivo de investigación de la mejor manera posible. Finalmente, queremos agradecer a la universidad Icesi por brindarnos los espacios y materiales requeridos para el desarrollo del proyecto, el apoyo y los recursos brindados fueron fundamentales para llevar a cabo nuestra investigación de manera efectiva y exitosa.

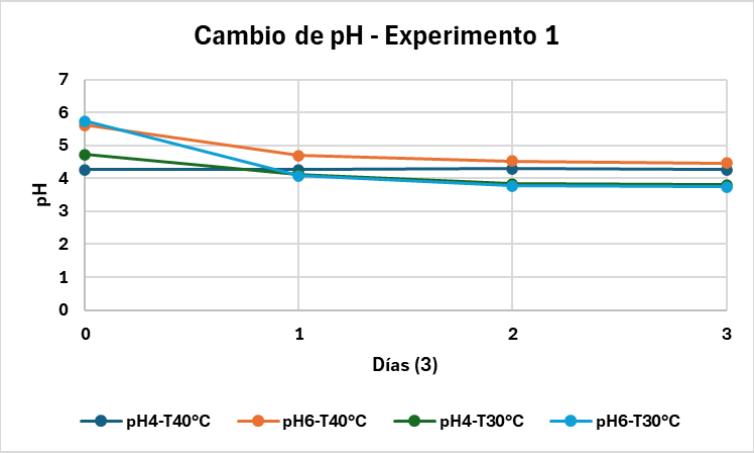
7. Anexos



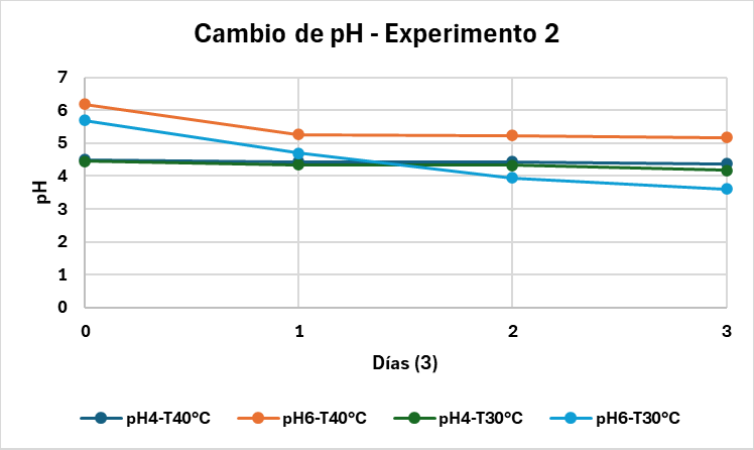
Anexo 1. Cambio de azúcares - Experimento 1.



Anexo 1.1. Cambio de azúcares - Experimento 2.



Anexo 2. Cambio de pH – Experimento 1.



Anexo 2.1. Cambio de pH – Experimento 2.

8. Referencias bibliográficas

1. Tejada Tovar, R Obtención de ácido láctico por fermentación de almidón de ñame espino mediante el Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus y el Streptococcus thermophilus para su uso en la producción de ácido poliláctico. [Internet]. 2015 [citado: 2023, octubre] Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín Facultad de Ciencias Escuela de Biociencias. Disponible en:https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/55489
2. LACTOBACILLUS FERMENT - Ingrediente INCI Beauty [Internet]. [citado el 9 de octubre de 2023]. Disponible en: https://incibeauty.com/es/ingredients/2893-lactobacillus-ferment
3. Tala Orrillo NA. Evaluación de la influencia del encapsulamiento de cepas homofermentativas en la obtención del ácido láctico a partir de lactosuero. Universidad Católica de Santa María [Internet]. 2023 May 22 [cited 2023 Oct 9]; Available from: https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/12627
4. Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. Clin Infect Dis. el 15 de mayo de 2015;60 Suppl 2:S98-107.
5. De Angelis M, Gobbetti M. Lactic Acid Bacteria | Lactobacillus spp.: General Characteristics. En: Fuquay JW, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition) [Internet]. San Diego: Academic Press; 2011 [citado el 24 de septiembre de 2023]. p. 78-90. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744074002594
6. González-Vara Y R A, Vaccari G, Dosi E, Trilli A, Rossi M, Matteuzzi D. Enhanced production of L-(+)-lactic acid in chemostat by Lactobacillus casei DSM 20011 using ion-exchange resins and cross-flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via NIR. Biotechnol Bioeng. el 20 de enero de 2000;67(2):147-56.
7. Pérez-Leonard H, Hernández-Monzón A. Evaluación de sustratos con jugo de aloe vera para el crecimiento de lactobacillus plantarum. Tecnología Química [Internet]. 2015 [citado el 24 de septiembre de 2023];35(2):156-66. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2224-61852015000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

8. Castillo Martínez JF. Diseño de un proceso de producción de ácido láctico utilizando bacterias ácido lácticas aisladas del proceso de obtención de sacarosa. [Internet] [Tesis]. 2022 [cited 2023 Oct 9]. Available from: http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/4790
9. Gänzle MG. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. Current Opinion in Food Science [Internet]. 2015 [cited 2023 Oct 9];2:106-17. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799315000508
10. Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J, Grobben GJ. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. International Dairy Journal [Internet]. 2002 [cited 2023 Oct 9];12(2-3):151-61. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601001534
11. Díaz Monroy BL, Iglesias AE, Valiño E. Consorcios microbianos con actividad ácido-láctica promisoria aislados desde inoculantes bacterianos nativos para ensilajes. Revista Ciencia y Agricultura [Internet]. 2014 [cited 2023 Oct 9];11(1):17-25. Available from: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5039258
12. Serna-Cock L, Stouvenel AR de. producción biotecnológica de acido láctico: estado del arte biotechnological production of lactic acid: state of the art producción biotecnolóxica de ácido láctico: estado do arte. Ciencia y Tecnologia Alimentaria [Internet]. 2005 [cited 2023 Oct 9];5(1):54–65. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/11358120509487672
13. Tejada Tovar, R Obtención de ácido láctico por fermentación de almidón de ñame espino mediante el Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus y el Streptococcus thermophilus para su uso en la producción de ácido poliláctico. [Internet]. 2015 [citado: 2023, octubre] Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín Facultad de Ciencias Escuela de Biociencias.
14. ORCID [Internet]. 2017 [citado el 1 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://orcid.org/0000-0001-6569-3133

15. Huertas RAP. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. [Internet]. 2010;(63). Disponible en http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf
16. Pérez-Leonard H, Bueno-García G, Brizuela-Herrada MA, Tortoló-Cabañas K, Gastón-Peña C. Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. [Internet] 2013; (47). Disponible en https://www.redalyc.org/pdf/2231/223126409003.pdf
17. Matos González M, Luque Rodríguez S, Gutiérrez Cervelló G. Formulación y estabilidad de emulsiones para encapsulación de biocompuestos. Anales de Química de la RSEQ [Internet]. 2020 [cited 2023 Oct 17];(2):69-80. Available from: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8109259
18. Aldana AS, Sandoval ER, Aponte AA. Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. Ingeniería y Competitividad [Internet]. 2004 [citado 2023 Oct 17];5(2):73-83. Disponible en: https://revistaingenieria.univalle.edu.co/index.php/ingenieria_y_competitividad/article/view/2298
19. Bárány I, Berenguer E, Solís M-T, Pérez-Pérez Y, Santamaría ME, Crespo JL, et al. Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. J Exp Bot [Internet]. 2018;69(6):1387–402. Disponible en: https://digital.csic.es/bitstream/10261/249832/3/Newsletter%203_Mart%C3%ADnez_MJ_2021.pdf
20. AMADOR ARZE JUAN JOSÉ, CRESPO CARLA F, ÁLVAREZ A TERESA. Obtención de azúcares reductores (glucosa) a partir en granos de quinua (Chenopodium quínoa) usando hidrólisis enzimática, ácida y el metabolismo de la embriogénesis vegetal. Rev.Cs.Farm. y Bioq [Internet]. 2016 Jun [citado 2024 Jun 02] ; 4(1): 61-71. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652016000100006&lng=es.
21. Tejeda Lesly, Quintana Julio, Pérez Jairo, Young Harold. OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE PODA, MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. rev.udcaactual.divulg.cient. [Internet]. 2011 June [cited 2024 June 02] ; 14(1): 111-116. Available from:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262011000100014&lng=en.

22. Parra RA. Revisar. Bacterias acidolácticas: Papel funcional en los alimentos. 2010. Revista facultad de ciencias agropecuarias 8(1). Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042022000200004#B34
23. Britanialab.com. [citado el 3 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd4f4357a.pdf
24. Fermentative Utilization of Fruit Peel Waste for Lactic Acid Production by Lactobacillus plantarum - IJAR - Indian Journal of Applied Research [Internet]. [citado el 27 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.worldwidejournals.com/indian-journal-of-applied-research-(IJAR)/fileview/September_2014_1492846102__133.pdf
25. Othman M, Ariff AB, Rios-Solis L, Halim M. Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review. Front Microbiol [Internet]. el 20 de noviembre de 2017 [citado el 27 de mayo de 2024];8:2285. Disponible en: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02285/full
26. Ojo AO, De Smidt O. Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification. Processes [Internet]. el 24 de febrero de 2023 [citado el 27 de mayo de 2024];11(3):688. Disponible en: https://www.mdpi.com/2227-9717/11/3/688
27. Cahyanto, Rahayu. The effect of inoculum size and incubation temperature on cell growth , acid production and curd formation during milk fermentation by Lactobacillus plantarum Dad 13. 2017 [citado el 3 de junio de 2024]; Disponible en: https://www.semanticscholar.org/paper/0c1ea8c6d1abc8d41f3bc9be781940b0e1d26634
28. Montañez LJB. Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Revista de Investigación [Internet]. 2020 Dec 15 [cited 2024 Jun 2];13(1):57–66. Available from: https://revistas.uamerica.edu.co/index.php/rinv/article/view/326
29. Vera-Mejía Ronald, Ormaza-Donoso José, Muñoz-Cedeño Jesús, Arteaga-Chávez Fátima, Sánchez-Miranda Lilian. Cepas de Lactobacillus plantarum con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos. Rev Salud Anim. [Internet]. 2018 Ago [citado 2024 Mayo 27] ; 40(2): . Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000200004&lng=es

30. Fonseca Hugo Calixto, Duarte Eduardo Robson, Souza Lívia Caroliny Almeida Santos, Mariano Emanuelly Gomes Alves, Pires Ana Clarissa dos Santos, Lima Tatiana Santos et al . Growth, viability, and post-acidification of Lactobacillus plantarum in bovine transition milk. Rev. mex. de cienc. pecuarias [revista en la Internet]. 2020 Jun [citado 2024 Jun 02] ; 11(2): 539-552. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242020000200539&lng=es. Epub 23-Oct-2020. https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.4912.