

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Victoria Vuan – 169440

Tutora: Erienne Jackson

2018

Declaración de Autoría

Yo, Victoria Vuan, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Proyecto de Grado de la Licenciatura en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otro, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente que fue contribuido por otros, y que fue contribuido por mi;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Victoria Vuan

7 de Marzo de 2018

Resumen

El incremento de la demanda mundial de petróleo para la producción de energía, compuestos químicos y materiales ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de energías renovables que suministren a las industrias. En particular, los residuos agroindustriales cada vez más atraen la atención como materias primas renovables debido a su amplia disponibilidad y bajo costo para la producción de químicos, materiales y biocombustibles.

A su vez, existe un creciente interés en el estudio de microorganismos como maquinarias de síntesis para la generación de un amplio rango de compuestos químicos de interés industrial. En los últimos 15 años se ha visto un crecimiento exponencial en los reportes relacionados a la producción de compuestos de interés generados mediante procesos fermentativos o biocatalíticos y el campo se encuentra en un crecimiento activo. Algunos ejemplos de moléculas obtenidas a partir de residuos lignocelulósicos mediante procesos fermentativos incluyen ácidos orgánicos como el ácido láctico.

La producción de ácido láctico ha crecido en gran medida en los últimos años debido al desarrollo de nuevos usos y productos.

En este trabajo se llevó a cabo un análisis del estado del arte de las estrategias de producción de ácido láctico que utilizan como principal fuente de carbono recursos renovables.

Nuestro enfoque incluyó tanto el estudio de estrategias íntegramente químicas como el de bioprocesos.

Palabras clave

Recursos renovables, bioconversiones, biomasa, procesos fermentativos, ácido láctico.

Índice

1. Introducción	7
1.1. Ácido láctico	9
1.2. Definición y clasificación de la biomasa.....	10
2. Síntesis química de ácido láctico	14
2.1. Estrategias de síntesis que utilizan fuentes no renovables	14
2.2. Estrategias de síntesis que utilizan fuentes renovables	16
3. Síntesis biotecnológica de ácido láctico.....	19
3.1. Selección de la biomasa	20
3.2. Selección del microorganismo para la síntesis de ácido láctico.....	22
3.2.1. Bacterias productoras de ácido láctico	23
3.2.2. Hongos productores de ácido láctico.....	26
3.2.3. Modificaciones genéticas en microorganismos no productores de ácido láctico	28
3.2.4. Modificaciones genéticas en microorganismos productores naturales de ácido láctico.....	31
3.3. Producción de ácido láctico.....	32
3.3.1. Pretratamiento de la biomasa	33
3.3.1.1. Pretratamientos mecánicos/físicos	34
3.3.1.2. Pretratamientos fisicoquímicos/termoquímicos	34
3.3.1.3. Pretratamientos biológicos.....	37
3.3.1.4. Criterios de selección de pretratamiento	39
3.3.2. Sacarificación	40
3.3.3. Fermentación.....	42
3.3.3.1. Medio de cultivo y suplementos	42
3.3.3.2. Fermentación sumergida o en estado sólido	43
3.3.3.3. Cultivos puros o mixtos	43
3.3.3.4. Modalidad de fermentación en lote o discontinua	45
3.3.3.5. Modalidad de fermentación en lote o repetida.....	46
3.3.3.6. Modalidad de fermentación semicontinua	47
3.3.3.7. Modalidad de fermentación continua.....	47
3.3.3.8. Ejemplos de producción de ácido láctico.....	47

C, concentración; R, rendimiento; P, productividad; PO, pureza óptica.....	48
3.4. Purificación	48
4. Conclusiones finales	52
5. Perspectivas de futuro	54
6. Referencias bibliográficas.....	56

1. Introducción

La disponibilidad limitada de los recursos fósiles se ha convertido en un asunto crucial para el futuro de las industrias de productos químicos y energía. Estas industrias entregan combustibles, químicos y energía, útiles para asegurar las necesidades fundamentales de la sociedad, principalmente para la agricultura, alimentos, transporte, calefacción, etc. El resultado de estas actividades es la contaminación del aire por gases de efecto invernadero, materia particulada, gases tóxicos como NO_x y CO_2 así como la contaminación del suelo y el agua por los desechos. La crisis energética mundial y la contaminación ambiental derivada del uso de recursos fósiles convencionales, concretamente petróleo, carbón y gas natural, han llevado a la búsqueda y explotación de recursos alternativos renovables, sostenibles, eficientes y rentables como la biomasa (1).

El término “recursos renovables” se refiere a aquellos recursos naturales que luego de su explotación, pueden retornar a sus niveles de existencia anteriores, a una velocidad superior o igual a la de su consumo. A diferencia de los recursos no renovables, algunos recursos renovables como la energía solar, eólica y la presión geotermal presentan esencialmente un suministro interminable, mientras que otros, como las plantas o animales, se consideran renovables, aunque se deba dedicar algún tiempo o esfuerzo para su regeneración. En este contexto, se entiende por biomasa a todos los organismos vivos o muertos y materiales orgánicos de origen no fósil, que tienen un contenido intrínseco de energía química (2).

Mientras que las reservas fósiles se concentran en pocos lugares, y como consecuencia, se convierten en puntos focales de conflictos geopolíticos, la biomasa es abundante y está distribuida de manera más uniforme en todo el planeta. Para los países que tienen recursos fósiles limitados, la incorporación de biomasa al perfil industrial podría contribuir a preservar la independencia energética y brindar nuevas oportunidades en el campo de los productos químicos con mayor valor agregado. En tanto, las preocupaciones sobre la sustentabilidad financiera, ambiental y social de las materias primas basadas en recursos fósiles, han motivado la investigación de la producción de biocombustibles y químicos a partir de biomasa (1,3).

Los dominios científicos que describen las investigaciones sobre rutas químicas o biotecnológicas (que explotan microorganismos o enzimas) para la producción de energía y compuestos químicos a partir de biomasa, incluyen la Química Verde y la Biotecnología Blanca (antes Biotecnología Industrial). La biotecnología blanca juega un papel fundamental en la economía industrial del futuro, especialmente porque transforma biomasa en productos valiosos mediante procesos que requieren un suministro bajo de energía, generan menores cantidades de desecho especialmente en términos de emisiones de CO_2 (2,4,5).

Uno de los principales desafíos asociados a la conversión de la biomasa mediante rutas químicas, es la degradación selectiva de la biomasa y compuestos. Si bien hay ejemplos donde se ha logrado una alta selectividad, como regla general la selectividad sigue siendo un desafío que no puede resolverse utilizando únicamente rutas químicas. Por el contrario, las rutas biotecnológicas presentan la ventaja de utilizar biocatalizadores (microorganismos o enzimas) altamente específicos. Como consecuencia, se ha sugerido que las rutas biotecnológicas sean el frente de las estrategias para la conversión de biomasa en productos de valor agregado. Además, las condiciones en las que se desarrollan las reacciones mediadas por biocatalizadores demandan un menor consumo energético (3).

La cantidad y tipos de moléculas químicas que pueden producirse a partir de biomasa y/o bioprocesos son sorprendentemente grandes. La lista incluye: productos químicos plataforma (**Figura 1**) tales como propano y butanodiol, ácidos carboxílicos, olefinas de cadena corta, isopreno y etanol, aminoácidos, vitaminas, polímeros como alginato y goma xantano, proteínas y enzimas industriales cada vez más importantes a nivel comercial, como las utilizadas en los aditivos para polvos de lavandería (2).

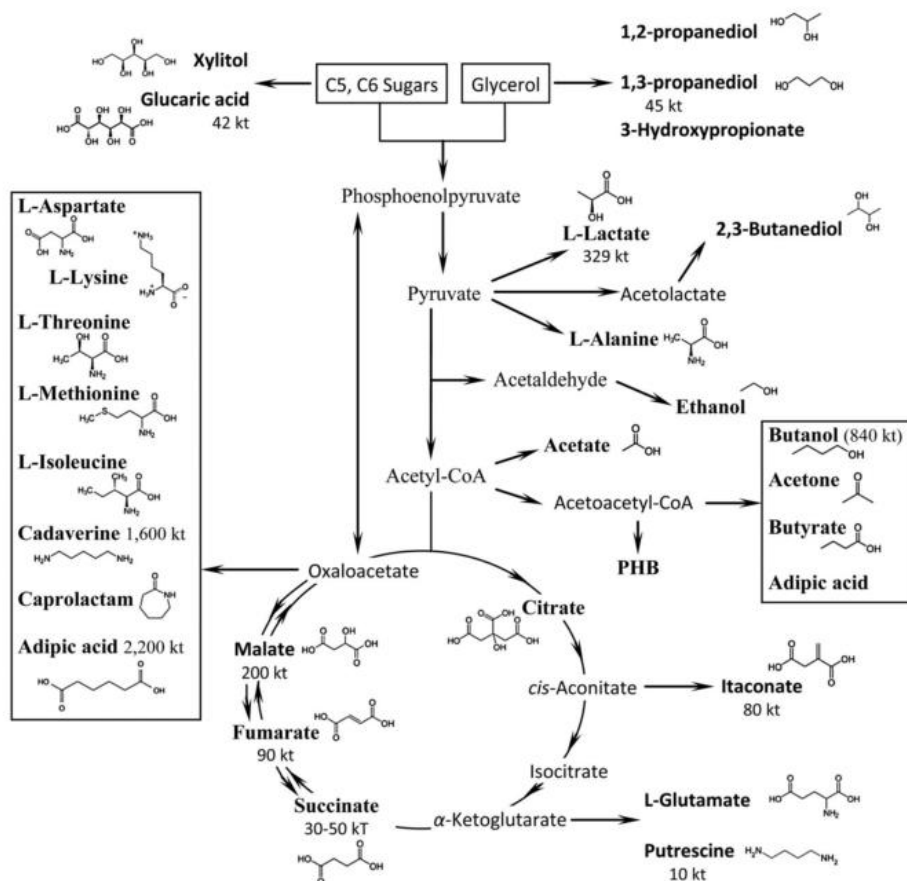


Figura 1. Productos químicos que pueden obtenerse mediante rutas biotecnológicas. Los números indican la producción total anual en miles de toneladas. Tomado de *Dimian 2015* (2).

A partir de lo mencionado anteriormente, resulta fundamental introducir el concepto de biorrefinería. Actualmente, no existe una definición formal pero de acuerdo a la Agencia Internacional de Energía la biorrefinería puede definirse como “el procesamiento sustentable de la biomasa en un espectro de productos comercializables y energía (1).

En la última década, se ha prestado una gran atención a la creación de productos comerciales valiosos mediante estrategias biotecnológicas de transformación de la biomasa. Entre ellos, el ácido láctico representa uno de los productos de mayor importancia cuyo interés particular radica en su amplia gama de aplicaciones, principalmente en farmacia, cosmética, químicos, alimentos y recientemente en la industria de los biopolímeros (6).

1.1. Ácido láctico

El ácido láctico es tanto un ácido como un alcohol y presenta un carbón asimétrico que le confiere actividad óptica. Las formas ópticamente activas que se pueden encontrar son L y D, o la mezcla racémica de ácido D/L láctico. Los dos isómeros presentan las mismas propiedades físicas (punto de fusión, solubilidad, constante de disociación, densidad, etc.) y las mismas propiedades químicas, excepto cuando se trata de reacciones en las que están presentes otros compuestos con actividad óptica (7).

La síntesis de ácido láctico puede desarrollarse tanto por rutas químicas como por rutas biotecnológicas. En las rutas químicas la materia prima utilizada puede ser biomasa o acetaldehído derivado del petróleo. La síntesis a partir de fuentes no renovables implica la reacción en fase acuosa y bajo alta presión que requiere el uso de cianuro de hidrógeno, ácido sulfúrico y metanol. La síntesis a partir de biomasa utiliza tecnologías de conversión hidrotermal en condiciones alcalinas. Ambas rutas de síntesis en general producen una mezcla racémica de D/L ácido láctico (8–12).

Las rutas biotecnológicas de síntesis de ácido láctico utilizan biomasa como materia prima y la conversión en ácido láctico es mediada principalmente por microorganismos mediante fermentación. Dependiendo del tipo de biomasa, se requieren de pasos de pretratamiento y sacarificación previos a la fermentación. Utilizando microorganismos específicos y las condiciones adecuadas de fermentación, se puede obtener ácido láctico D ó L ópticamente puro (9,10,13,14).

Actualmente, los principales productores de ácido láctico son *Purac*, *Cargill* y *Henan Jindan Lactic Acid Technology*. Por otro lado, en la **Figura 2** se muestran los principales sectores demandantes de ácido láctico. Para el caso de los sectores de alimentos y bebidas y cuidado

personal utilizan el isómero L ya que el isómero D puede resultar tóxico para el ser humano. En cuanto al sector de los polímeros, este demanda isómero D ó L ya que los plásticos contruidos a partir de isómeros puros presentan propiedades superiores a los elaborados a partir de mezcla racémica. Por último, el sector de solventes y otros usos industriales utiliza la principalmente la mezcla racémica de ácido láctico ya que no es tan importante la quiralidad en este tipo de aplicaciones (10).

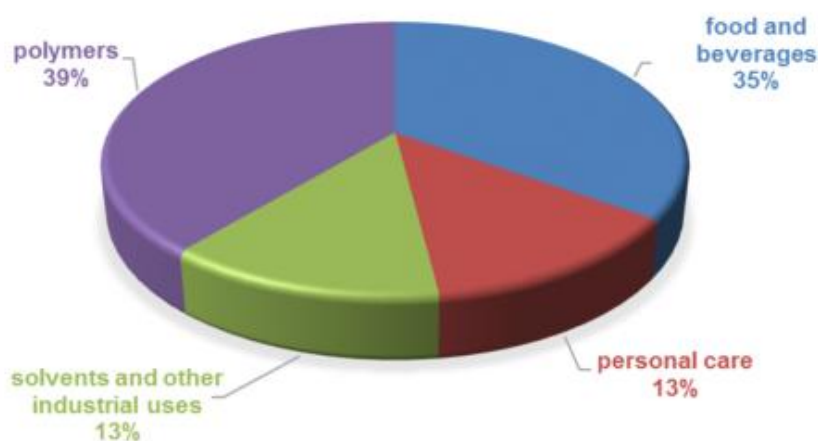


Figura 2. Principales sectores demandantes de ácido láctico. Tomado de *Komesu y cols. 2017* (10).

En este trabajo se llevó a cabo una revisión crítica de las estrategias de síntesis de ácido láctico a partir de fuentes renovables. Para esto se discute en primer lugar la alternativa química de síntesis para luego contrastar con la estrategia biotecnológica. En este proyecto se propone la realización de un análisis crítico de las estrategias de síntesis de ácido láctico planteadas en los últimos 5 años partiendo de fuentes renovables (biomasa) como principal fuente de de materia prima.

1.2. Definición y clasificación de la biomasa

La definición de biomasa es extensa y existen numerosas definiciones reportadas en la bibliografía. De acuerdo a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático la biomasa puede definirse como: “toda materia orgánica originada de plantas, animales o microorganismos, que son producidos en ecosistemas naturales o gestionados (agricultura, acuicultura, forestal), transformada o no industrialmente” (5,13,15–19).

Para la producción de moléculas químicas o biocombustibles, la biomasa usualmente se relaciona con materiales provenientes de plantas. La misma es el resultado del proceso de bioconversión solar. A través del proceso de fotosíntesis, las plantas absorben energía solar, que les permiten convertir CO₂ en glucosa y liberar O₂. El carbón utilizado para producir biomasa es absorbido de la atmósfera por las plantas como dióxido de carbono, utilizando la energía solar. El carbón de las plantas puede ser transferido a través de la cadena de alimentos a los animales y los humanos. Si los materiales de las plantas no son consumidos, generalmente son degradados por microorganismos. Durante la biodegradación, el carbono vuelve a la atmósfera principalmente como dióxido de carbono en condiciones aeróbicas o como metano en condiciones anaeróbicas (5,13,15–19).

En la bibliografía se encuentran reportadas distintas clasificaciones de la biomasa basadas en la composición, valor potencial, origen y generaciones. Existen pequeñas variaciones dentro de las clasificaciones en cuanto a las biomásas contempladas, tanto en las clasificaciones como en las categorías de las mismas. A partir de estas variaciones se realizó una puesta en común de la información recopilada, con el fin de obtener una visión global de los criterios y tipos de clasificaciones, y se plasmó el resultado del análisis en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificaciones de la biomasa

<u>Según composición</u>	<u>Según origen</u>	<u>Según valor potencial</u>	<u>Según generación</u>
Leñosa Lignocelulósica	Natural	Valor calorífico	Primera Cultivos comestibles
No leñosa Almidonada Lignocelulósica Aceites y grasas	Residual Agrícola	Contenido de nitrógeno	Segunda Cultivos no comestibles
	Forestal Agroindustrial	Contenido de azúcares	
Azúcares	Cultivos energéticos	Contenido de celulosa	Tercera Microalgas y desechos industriales orgánicos

La clasificación de acuerdo a su composición, se basa en la proporción de los principales componentes de la biomasa: carbohidratos, lignina, proteínas y lípidos. En este sentido la biomasa puede dividirse en cuatro categorías: biomasa lignocelulósica, aceites y grasas, almidonada y azúcares. Asimismo, esta clasificación permite agruparlas en biomásas leñosas y no leñosas. La biomasa leñosa provee únicamente materiales lignocelulósicos, mientras que la no leñosa puede proveer biomasa lignocelulósica y el resto de las categorías mencionadas (5,13,15–19).

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es un homopolímero lineal de cadena larga, compuesto por monómeros de glucosa mientras que, la hemicelulosa es un heteropolímero ramificado de cadena corta, que presenta una estructura amorfa y está compuesta por pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (manosa, glucosa y galactosa). La celulosa y hemicelulosa se encuentran interconectados formando fibras con la lignina. La lignina es un polímero complejo compuesto de alcoholes aromáticos y no contiene azúcares (5,13,15–19).

La biomasa lipídica está compuesta principalmente por triglicéridos derivados de animales o plantas consisten en ácidos grasos y glicerol, mientras que la biomasa almidonada (incluyendo azúcares) está compuesta por polisacáridos de glucosa. En este contexto, cabe destacar que la hidrólisis de biomasa almidonada es un proceso sencillo lo que hace que esta sea la opción de mayor preferencia para los procesos de fermentación (5,13,15–19).

Según su origen, la biomasa puede categorizarse como natural, residual o de cultivos energéticos. La biomasa natural se refiere a la biomasa que se genera naturalmente en un ecosistema dado. Dado que no ha sufrido ninguna transformación y con el fin de mantener los hábitats donde crece, este tipo de biomasa no es considerado como adecuado para su uso con fines energéticos o industriales. Por otro lado, la biomasa que se origina de los cultivos energéticos, proviene de cultivos cuyo propósito es su utilización para la producción de energía. Esta categoría puede subdividirse en cultivos leñosos y cultivos vegetales anuales de crecimiento (5,13,15–19).

La biomasa residual consiste en residuos orgánicos generados luego de que la biomasa natural se transforma, y se clasifica como residuos agrícolas, forestales y agroindustriales. Los residuos agrícolas tales como los generados a partir de cultivos leñosos y herbáceos, residuos obtenidos de la poda periódica y anual de café, caña de azúcar, cultivos de cereales (paja, hojas, cáscara de semillas, etc.), caña (hojas y partes superiores), palma (hojas, racimos, cascara, etc.), heno, arroz (paja, cáscara) y maíz (tallos, hojas, cascara, seda y borla), entre otros. Los residuos forestales son los derivados de tratamientos, intervenciones y/o mejoras forestales. Dentro de esta categoría se pueden destacar los residuos de poda de árboles comerciales con imperfecciones o los árboles que se deben talar cerca de las zonas de incendios o que están enfermos. Además, aserrín y otros residuos de la producción de tablas de madera (5,13,15–19).

Los residuos agroindustriales son los provenientes de la fabricación de papel (pula y residuos del proceso), jugos (cáscaras y pulpa), azúcar (bagazo), extracción de aceite (fibras, semillas de palma), quesos (suero de leche), constituyentes de bacterias (ácidos nucleicos, proteína, carbohidratos y lípidos) y sus productos de descomposición, sustancias orgánicas de degradación incompleta y sustancias inorgánicas (lodo de aguas residuales y estiércol de

animales). Los desechos domésticos también son relevantes, especialmente los generados en los centros de almacenamiento de alimentos, mercados y las empresas administrativas que generan grandes cantidades desperdicios de papel. Los residuos de esta categoría son uno de los pocos recursos energéticos cuyo suministro es continuo y no depende significativamente de las condiciones climáticas (5,13,15–19).

La clasificación de la biomasa de acuerdo a su valor potencial, se basa principalmente en componentes clave presentes en la biomasa con respecto a las tecnologías de conversión. La clasificación fue propuesta por *Lim y Lam 2014* con el objetivo de mejorar el entendimiento del potencial de la biomasa para las distintas aplicaciones. Para ello, la biomasa se clasificó de acuerdo a su valor calorífico, contenido de nitrógeno, contenido de azúcares y contenido de celulosa. Las biomásas con alto contenido calorífico presentan un gran potencial para la producción de energía y biocombustibles. En tanto las biomásas con alto contenido de nitrógeno son las de preferencia para la producción de fertilizantes y enzimas, las biomásas con alto contenido de azúcares para la producción de moléculas químicas, mientras que las biomásas con alto contenido de glucosa presentan gran potencial para la generación de alimentos para animales y bioetanol (20).

La clasificación basada en generaciones no muestra un criterio puntual de clasificación, pero de acuerdo al análisis de la bibliografía se puede inferir que la clasificación está basada en la conjunción del costo de la biomasa como materia prima, importancia para el ser humano en términos alimentarios y cronología de las tecnologías de bioconversión. En este sentido, dentro de la biomasa de primera generación están comprendidos los cultivos comestibles (almidonados, azúcares y triglicéridos) que son los de mayor costo como materia prima. Además, fueron los primeros cultivos a partir de los cuales se desarrollaron las tecnologías de bioconversión debido a su sencillez en cuanto a la obtención de azúcares fermentables para la producción de compuestos de valor agregado (5,13,15–19).

La biomasa de segunda generación comprende todos los cultivos no comestibles que, además de presentar un menor costo que la biomasa de primera generación, se encuentran ampliamente disponibles. Por último, la biomasa de tercera generación comprende la biomasa de microalgas y desechos agroindustriales. La biomasa de microalgas presenta una composición balanceada de lípidos, azúcares y proteínas y se estima que el costo de producción podría ser lo suficientemente bajo en términos espaciales y de mantenimiento, para ser contemplada como materia prima (5,13,15–19).

2. Síntesis química de ácido láctico

La síntesis de ácido láctico mediante estrategias químicas puede ser dividida en dos grandes enfoques que se diferencian principalmente por el tipo de fuente de materia prima que utilizan: renovable y no renovable. Dentro de la estrategia que utiliza fuentes no renovables, se encuentra el uso de materia prima derivada directamente del petróleo o a través de subproductos de industrias derivadas del mismo. Por otro lado, las estrategias de síntesis químicas reportadas a partir de fuentes renovables, utilizan principalmente biomasa y residuos de biomasa de otras industrias. La similitud de los enfoques está en el producto final de síntesis: una mezcla racémica de ácido D/L láctico.

2.1. Estrategias de síntesis que utilizan fuentes no renovables

La síntesis química de ácido láctico a partir de fuentes no renovables emplea rutas que parten de los bloques de construcción de la industria petrolera o de productos generados a partir de estos. En la **Tabla 2** se muestran los bloques de construcción obtenidos a partir del refinado del petróleo y algunos ejemplos de productos que pueden obtenerse a partir de los primeros. Las vías de síntesis de ácido láctico reportadas, incluyen la oxidación de propilenglicol, oxidación de propileno con ácido nítrico, hidrólisis de ácido cloropropanoico, reacciones a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua a altas temperaturas en presencia de catalizador y la hidrólisis ácida de lactonitrilo (2,10,21).

Tabla 2. Bloques de síntesis de derivados del petróleo crudo

Nº Carbono	Compuesto	Ejemplos de productos
1	Metano	Metanol, metileno, acetileno, cianamida
2	Etano/etileno	Óxido de etileno, etilenglicol, polietileno
3	Propileno	Óxido de propileno, propilenglicol, acrilonitrilo
4	Butano	Ácido maleico, THF, GBL, MTBE
5	N/D	
6	Benceno/xileno	Estireno, ácido adípico, fenol, acetona, tolueno

N/D, no disponible; THF, tetrahidrofurano; GBL, gamma-butirolactona; MTB, éter metil ter-butílico. Tomado y modificado de *Northwest 2004* (21).

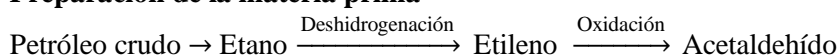
Si bien existen diversas rutas posibles para la producción de ácido láctico, se ha demostrado que ninguna de estas es factible desde el punto de vista técnico y económico, a excepción de la ruta que utiliza lactonitrilo. A partir de estas rutas mencionadas se obtiene una mezcla racémica de ácido láctico (50% D y 50% L). Esto último supone una limitación a las estrategias químicas, ya que los isómeros puros presentan son más valiosos a nivel comercial.

Por ejemplo, el isómero L es el de preferencia cuando se trata de aplicaciones específicas como alimentos, cosméticos y farmacia (2,10,21).

La ruta de síntesis del lactonitrilo se discute brevemente en este trabajo ya que es utilizada a nivel industrial y actualmente ocupa el 10% de la producción mundial de ácido láctico. La materia prima necesaria para llevar a cabo el proceso depende principalmente de la producción de etano y subproductos como el lactonitrilo y acetaldehído, provenientes de industrias derivadas del petróleo. El proceso involucra reacciones simples, con una primera etapa de refinado del petróleo, que si bien no forma parte de la industria del ácido láctico propiamente dicha, resulta relevante introducir el mecanismo de obtención de la materia prima. Brevemente, el petróleo crudo es refinado para producir etano, que luego mediante deshidrogenación es transformado en etileno y subsecuentemente oxidado en acetaldehído (**Esquema 1**) (8–10).

En la siguiente etapa se desarrolla una reacción catalítica en fase líquida de acetaldehído con hidrógeno de cianuro bajo condiciones de alta presión y en presencia de un catalizador básico para producir el intermediario lactonitrilo. Posteriormente, el lactonitrilo crudo es purificado por destilación y luego es sometido a una hidrólisis fuerte con ácido sulfúrico para generar ácido láctico y sal de amonio como subproducto. En la última etapa del proceso, el ácido láctico crudo es esterificado con metanol y posteriormente purificado por destilación. Durante la reacción de esterificación, se produce lactato de etilo que luego de la purificación del ácido láctico, es hidrolizado en presencia de un catalizador ácido para producir ácido láctico y metanol. Finalmente, el ácido láctico remanente es purificado mediante destilación y el metanol es reciclado (8–10).

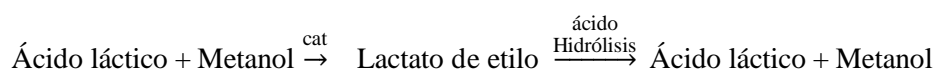
Preparación de la materia prima



Síntesis de ácido láctico



Purificación



Esquema 1. Reacciones químicas de la síntesis de ácido láctico a partir de fuentes no renovables. Tomado y modificado de *Gezæe y cols. 2016* (8).

El proceso de síntesis mediante esta ruta presenta un rendimiento de 95%, en donde se requieren 0,515 kg de acetaldehído, 0,300 kg de cianuro de hidrógeno y 0,573 kg de ácido sulfúrico para producir 1 kg de ácido láctico. Sin embargo, utiliza reactivos costosos y altamente peligrosos y tóxicos para el ser humano y el ambiente. Además, al abastecerse principalmente de fuentes no renovables está ligado a la decreciente disponibilidad de la

materia prima y a la generación de emisiones de efecto invernadero. En este contexto, resulta de gran interés el estudio y desarrollo de estrategias más limpias con el fin de reducir dichas emisiones y utilizar fuentes de energía renovables de menor costo (9,18,22).

2.2. Estrategias de síntesis que utilizan fuentes renovables

Dentro de las tecnologías de conversión química de biomasa se encuentran ampliamente reportadas la combustión directa, pirólisis, y conversión hidrotermal (HTC; del inglés *hydrothermal conversion*), desarrolladas para producir combustibles, productos químicos o energía. Dentro de estas metodologías, la conversión hidrotermal es la más prometedora para la producción de ácido láctico debido a su aplicabilidad en biomasa húmeda, menores temperaturas que la pirólisis y alta eficiencia energética. Además, las tecnologías como pirólisis y combustión directa son consideradas energéticamente menos favorables en comparación a la HTC ya que, por ejemplo, implica pasos de secado de la biomasa previo a su conversión (11,12).

Los procesos HTC utilizan agua subcrítica y supercrítica como medio de reacción. El agua subcrítica, es agua presurizada que se encuentra a temperaturas por encima de su punto de ebullición a presión ambiente y por debajo de su punto crítico (616 K, 22,1 MPa). Para el caso del agua subcrítica, la presión ejercida sobre el agua es tal, que no permite la ebullición conservando el estado líquido, mientras que, el agua supercrítica (por encima de su punto crítico) presenta un comportamiento líquido-gas. Durante el proceso de HTC, la celulosa y hemicelulosa son inicialmente hidrolizadas a oligosacáridos y monosacáridos. La glucosa, uno de los principales monosacáridos de la despolimerización de la celulosa, se puede convertir en diversos productos químicos de valor agregado, incluyendo 5-hidroximetil furfural, furfural, alcohol, ácido levulínico, ácido fórmico y ácido láctico, entre otros (11,12,23,24).

Se encuentra reportado que los procesos de HTC en condiciones alcalinas, promueven la transformación selectiva de la celulosa, hemicelulosa y sus monosacáridos en gliceraldehído, gliceraldehído, dihidroxiacetona, eritrosa y productos de degradación de estos intermediarios (**Figura 3**). El gliceraldehído y la dihidroxiacetona son considerados precursores del ácido láctico por su deshidrogenación y conversión en piruvaldehído. Por otro lado, el gliceraldehído y eritrosa, también pueden generar ácido láctico. Sin embargo, el gliceraldehído presenta mayores rendimientos lo que lo hace el intermediario de preferencia para la síntesis de ácido láctico (11,12,23,24).

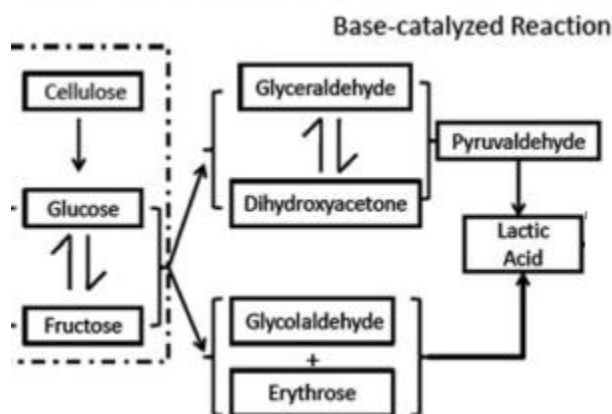


Figura 3. Vía principal de reacción de la celulosa mediante conversión hidrotermal. Tomado de Wang y cols. 2014 (24).

Teniendo en cuenta los precursores del ácido láctico mencionados en el párrafo anterior, se ha investigado el uso de glicerol como sustrato para la producción de ácido láctico. El glicerol es un producto de desecho de las industrias de jabones y detergentes y subproducto de la producción de biodiesel y puede ser revalorizado. La oxidación del glicerol mediante HTC en condiciones alcalinas, implica su deshidrogenación en dihidroxiacetona y gliceraldehído y la subsiguiente transformación en ácido láctico (24–26).

En ocasiones los procesos HTC requieren de grandes cantidades de base y en consecuencia se producen sales en la mezcla de reacción lo que implica pasos adicionales para neutralizarlas y generación de costos adicionales al proceso. Asimismo, la neutralización de las sales produce sales inorgánicas de desecho que añaden dificultad a la hora de purificar el ácido láctico (24,26,27).

Por otra parte, se ha demostrado que el uso de catalizadores en conjunto con distintas condiciones de operación promueve la oxidación selectiva de los sustratos y la subsecuente formación de ácido láctico. En general, los catalizadores más estudiados están compuestos de metales nobles, que debido a su baja disponibilidad y alto costo hacen que el proceso a gran escala sea económicamente inviable. Además, el uso de catalizadores homogéneos dificulta el proceso de separación ya que se encuentran en la misma fase que los reactivos. Por este motivo, se ha explorado el uso de catalizadores heterogéneos que, al presentarse en una fase distinta a los reactivos, facilita su separación y permite su reutilización. Finalmente, dependiendo del sustrato utilizado, catalizadores, condiciones de reacción y las distintas combinaciones de estos factores, se generan intermediarios vía cascadas de reacciones químicas complejas, donde se produce una mezcla racémica de ácido láctico (24,26–28).

En esta sección se presentaron estrategias químicas de síntesis de ácido láctico utilizando biomasa como materia prima en donde se produce una mezcla racémica de ácido láctico. Dado que la pureza óptica es un requisito para las industrias alimentarias y farmacéuticas y para la síntesis de ácido poliláctico (D o L), se debe aplicar un proceso de purificación para poder separar los isómeros D y L entre sí. Estos procedimientos de purificación pueden realizarse a través de cromatografía, esterificación e hidrólisis, cristalización diferencial, sistemas de membranas, entre otros, añadiendo dificultad y costos al proceso. En este sentido, la problemática sobre la pureza óptica puede abordarse desde las estrategias de síntesis biotecnológicas a partir de las cuales es posible obtener ácido láctico ópticamente puro (D o L) (13,29,30).

3. Síntesis biotecnológica de ácido láctico

Las rutas de síntesis biotecnológicas utilizan microorganismos o moléculas biológicas, para la producción de compuestos de valor agregado. En la **Figura 4** se esquematiza un proceso general de síntesis de productos biotecnológicos mediante fermentación. La biomasa seleccionada, sirve como fuente de carbono y energía para el crecimiento de los microorganismos. Generalmente, los microorganismos son incapaces de asimilar la biomasa directamente, por lo que se deben aplicar una serie de tratamientos para convertirla en compuestos de fácil asimilación (azúcares simples o fermentables) (9,10,13,14).

De acuerdo a la composición de la biomasa y los azúcares fermentables que puedan obtenerse a partir de ella, se selecciona el microorganismo con el metabolismo adecuado para la producción del compuesto de interés. Mediante un proceso de fermentación controlada, los azúcares simples son transformados por los microorganismos y, según las características del producto de interés y las exigencias de la industria, el producto es purificado para su posterior uso o comercialización (9,10,13,14).

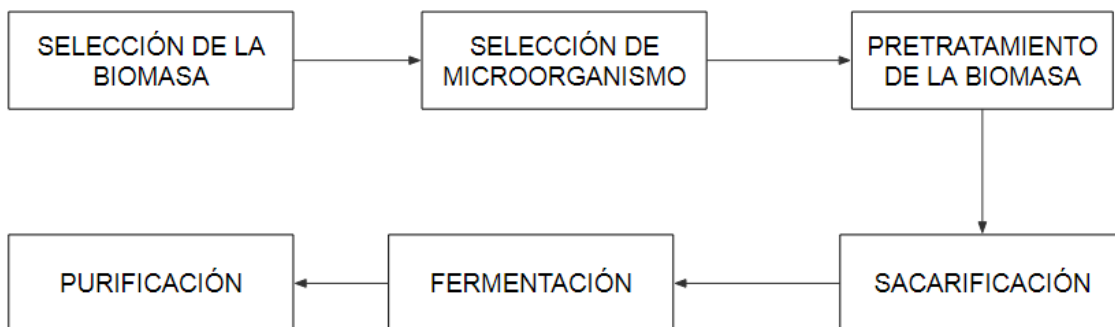


Figura 4. Estrategia general de síntesis de compuestos de valor agregado mediante fermentación microbiana.

Los procesos microbianos pueden presentar un impacto positivo en el medio ambiente ya que los mismos son biodegradables, producen compuestos de valor agregado a partir de fuentes renovables, emplean condiciones de reacción moderadas que implica procesos con menor consumo de energía y se pueden obtener moléculas con la quiralidad deseada. En el caso del ácido láctico, los microorganismos productores utilizan ácido pirúvico como precursor de síntesis, donde la estereoespecificidad (D, L o D/L) depende de las enzimas L-lactato deshidrogenasa y D-lactato deshidrogenasa dependientes de NADH (10,31).

3.1. Selección de la biomasa

La selección de la biomasa para la producción de ácido láctico, así como la de otras moléculas químicas obtenidas mediante procesos de fermentación, se basa principalmente en su disponibilidad, nivel de competencia con el sector alimentario, precio y pureza. Además, en la medida que sea posible, resulta crucial tener un conocimiento claro de la composición de la biomasa seleccionada, ya que la misma dirigirá la elección de los pretratamientos para la obtención de azúcares fermentables así como la elección del microorganismo para la fermentación (9,10,13,14,32,33).

La biomasa seleccionada debe encontrarse ampliamente disponible, en cualquier época del año y a un bajo costo. Actualmente, la producción industrial de ácido láctico utiliza biomasa almidonada de primera generación (maíz y caña de azúcar), que dada su composición y acompañada de una metodología de despolimerización de la biomasa y microorganismo con el metabolismo adecuado, permiten fácilmente la obtención de monómeros de glucosa con un alto rendimiento de ácido láctico. Sin embargo, la biomasa utilizada representa el principal costo de producción y compite con el sector alimentario (9,10,13,14,32,33).

El costo de la biomasa también se ve influenciado por su localización geográfica. Por ejemplo, los residuos de la agricultura y forestación son de preferencia por su bajo costo. En tanto, establecer una planta de producción en zonas cercanas al punto de generación de residuos, reduce significativamente los costos de transporte y establecimiento la biomasa (9,10,13,14,32,33).

La pureza de la biomasa se refiere a su composición, es decir, a la proporción de componentes que pueden ser transformados en azúcares fermentables, asimilados por los microorganismos seleccionados para la fermentación y que presentan mínima o nula formación de subproductos. Está ampliamente reportado que a mayor pureza de sustrato de fermentación, mayor será la pureza del producto final y menores los costos implicados en la purificación. Sin embargo, los azúcares puros son más costosos que los procesos de purificación, lo que continúa siendo económicamente desfavorable (9,10,13,14,32,33).

Las biomásas complejas, generalmente requieren de tratamientos previos para promover la ruptura de su estructura y despolimerización de sus componentes. Durante estos procesos, se pueden generar subproductos que inhiben el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación o afectan la pureza del producto final. Si bien la inhibición por los subproductos generados dependerá de la vulnerabilidad del microorganismo seleccionado, se debe tener en cuenta que la complejidad de la biomasa en combinación con la metodología de tratamiento puede afectar negativamente el proceso. Por este motivo, las biomásas que requieran el menor

tratamiento de despolimerización siempre son las preferidas desde el punto de vista técnico y económico (9,10,13,14,32,33).

Recientemente, se ha centrado gran atención al uso de biomasa lignocelulósica (de segunda generación). En estos casos se evita la competencia con el sector alimentario, presentan gran contenido de polímeros ricos en azúcares (celulosa y hemicelulosa), se encuentran ampliamente disponibles durante todo el año y a bajo costo. A pesar de las ventajas de la biomasa lignocelulósica y residuos de biomasa de industrias en cuanto a su sustentabilidad y disponibilidad, el uso comercial de estas biomasa continúa siendo un reto debido a su complejidad, los extensos pretratamientos requeridos para la liberación de azúcares fermentables y los costos asociados (9,10,13,14,32,33).

Los residuos de biomasa industriales, ya sean sólidos o líquidos, también han llamado la atención para la producción de ácido láctico. Debido a su composición química basada principalmente en azúcares y otros compuestos de interés, los residuos pueden utilizarse para producir una gran cantidad de productos de valor agregado como etanol, aditivos alimentarios, enzimas y ácidos orgánicos incluyendo ácido láctico. El uso de residuos de biomasa, contribuye favorablemente con el medio ambiente mitigando la problemática asociada a la acumulación de residuos. Además, el no uso de estos materiales constituye una pérdida de fuentes potenciales valiosas (9,10,13,14,32,33).

La biomasa de microalgas también ha llamado la atención para la producción de ácido láctico, debido a su gran contenido de azúcares fermentables, capacidad para crecer a bajo costo en una amplia gama de fuentes de carbono en tierras no cultivables y carecen de lignina lo que simplifica el proceso de sacarificación. Actualmente, el costo de conversión de la biomasa de microalgas es comparativamente más alto y se encuentra en fase temprana de investigación. Los esfuerzos están concentrados en mejorar las tecnologías existentes asociadas a biomasa (9,10,13,14,32,33).

En la **Tabla 3** se resumen los principales criterios de selección de biomasa discutidos tanto para la producción de ácido láctico como la de otras moléculas de interés comercial. Actualmente, no existe tal biomasa que cumpla con todos los criterios de selección resumidos. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías de bioconversión, el descubrimiento de nuevos microorganismos, el uso de microorganismos modificados genéticamente, la optimización de parámetros de fermentación, el avance de las investigaciones y la combinación de tecnologías, podría permitir el diseño de procesos más eficientes que se adecuen a las características de las biomasa disponibles.

Tabla 3. Principales criterios de selección de biomasa

Alta disponibilidad anual
Disposición geográfica cercana a la producción
Mínimo o ningún nivel de competencia con el sector alimentario
Bajo costo
Mínimo o ningún pretratamiento requerido
Alto contenido de azúcares
Alta pureza
Contribución medioambiental positiva

3.2. Selección del microorganismo para la síntesis de ácido láctico

La elección del tipo de microorganismo a utilizar depende ante todo de los carbohidratos que van a ser fermentados, ya que el metabolismo de los microorganismos difiere con diferentes fuentes de carbono. En vista de lo mencionado anteriormente, también se utilizan cultivos mixtos de dos o más microorganismos seleccionados, para rutas metabólicas que permitan la conversión de sustratos con mezclas de carbohidratos (10,31,32,34).

La elección de la cepa productora se basa principalmente en su capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos económicos, la producción del isómero de interés (L o D), temperatura óptima de crecimiento (37°C o superior), productividad y tolerancia osmótica a concentraciones de ácido láctico crecientes. La tolerancia a pHs bajos (menor a 4) facilita el procesamiento y recuperación, ya que permite la purificación directa del ácido láctico del medio de cultivo y permite obtener una mayor productividad por lote donde también se minimiza la predisposición a contaminación (10,31,32,34).

Los microorganismos extremófilos y termófilos con temperatura óptima cercana a los 50°C son los más utilizados ya que muestran mejor adaptación a cambios de pH y temperatura. Además, los procesos a temperaturas altas reducen el desarrollo de contaminantes mesófilos y descarta la necesidad de esterilizar el medio de cultivo (13,35).

Un proceso de producción comercial requiere la utilización de microorganismos robustos que puedan alcanzar las necesidades industriales para obtener altos rendimientos, productividad y título de ácido láctico de al menos 80%, 2,5 g/l/h y 100 g/l, respectivamente. El rendimiento puede verse afectado por la utilización indirecta de azúcares poliméricos, la utilización ineficiente de azúcares y a compuestos inhibidores que pueden formarse durante el pretratamiento de la biomasa, debido a la formación de subproductos indeseados. Asimismo, la productividad y la pureza óptica pueden verse afectadas por acumulación de producto final, inhibición por pHs bajos y contaminación con microorganismos mesófilos (10,31,32,34).

El ácido láctico de calidad alimentaria requiere una pureza química de entre 80-90% mientras que la de grado farmacéutico mayor a 90%. La pureza se ve afectada por la composición del medio de fermentación que a su vez, depende de los requerimientos nutricionales del microorganismo productor. El uso de microorganismos con requerimientos nutricionales complejos resulta en costos de purificación más altos por lo que los microorganismos con bajos requerimientos nutricionales son de preferencia para la producción de ácido láctico (34).

Los microorganismos utilizados en la fermentación para la producción de ácido láctico pueden ser bacterias y hongos. Los mismos pueden ser o no productores naturales. A su vez, los mismos pueden haber recibido una o más mejoras sobre otros, como rango más amplio de asimilación de sustratos, o rendimientos y productividad más altos, reducción de requerimientos nutricionales o mejora de la pureza óptica del ácido láctico. Los principales consideraciones para la selección de microorganismos se resume en la **Tabla 4** (10,31,32,34).

Tabla 4. Principales criterios de selección de microorganismos

Capacidad de utilizar pentosas y hexosas
Temperatura de crecimiento superior a 37°C
Alta tolerancia a estrés osmótico
Alta tolerancia a pH ácido (menor a 4)
Rendimiento ácido láctico 80% o superior
Productividad ácido láctico 2,5 g/L.h o superior
Título ácido láctico 100 g/L o superior
Requerimientos nutricionales simples
Alta pureza óptica de ácido láctico

3.2.1. Bacterias productoras de ácido láctico

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido tradicionalmente utilizadas para la producción de ácido láctico y continúan siendo el candidato principal para la producción industrial. Históricamente, las BAL se definen como una familia de microorganismos ubicuos y heterogéneos que comparten una gran cantidad características fisiológicas. En términos generales, la definición de “bacterias ácido lácticas” no refleja una clase filogenética, sino más bien las capacidades metabólicas de un grupo heterogéneo de bacterias, basado principalmente en la capacidad de fermentar azúcares exclusivamente en ácido láctico (36–40).

La mayor parte de las BAL son anaerobias facultativas, catalasa negativa, no presentan motilidad y no forman esporas. Normalmente, presentan una alta tolerancia a pH y pueden sobrevivir hasta pH 4. La temperatura óptima de crecimiento varía dentro de los géneros de

20 a 45°C. Además, los procesos industriales que utilizan BAL presentan ciertas limitaciones debido al alto riesgo de infección por fagos, baja tolerancia al estrés osmótico y requerimientos nutricionales elevados (aminoácidos, vitaminas y minerales) (36–40).

Taxonómicamente, las BAL se encuentran en dos filos distintos: *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Dentro del filo *Firmicutes*, las BAL pertenecen al orden *Lactobacillales* e incluye, entre otros, los géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Si bien sólo las bacterias del orden *Lactobacillales* se denominan bacterias ácido lácticas, los géneros *Bifidobacteria* y ciertos *Bacillales* comparten características fisiológicas similares (**Figura 5**) (36–41).

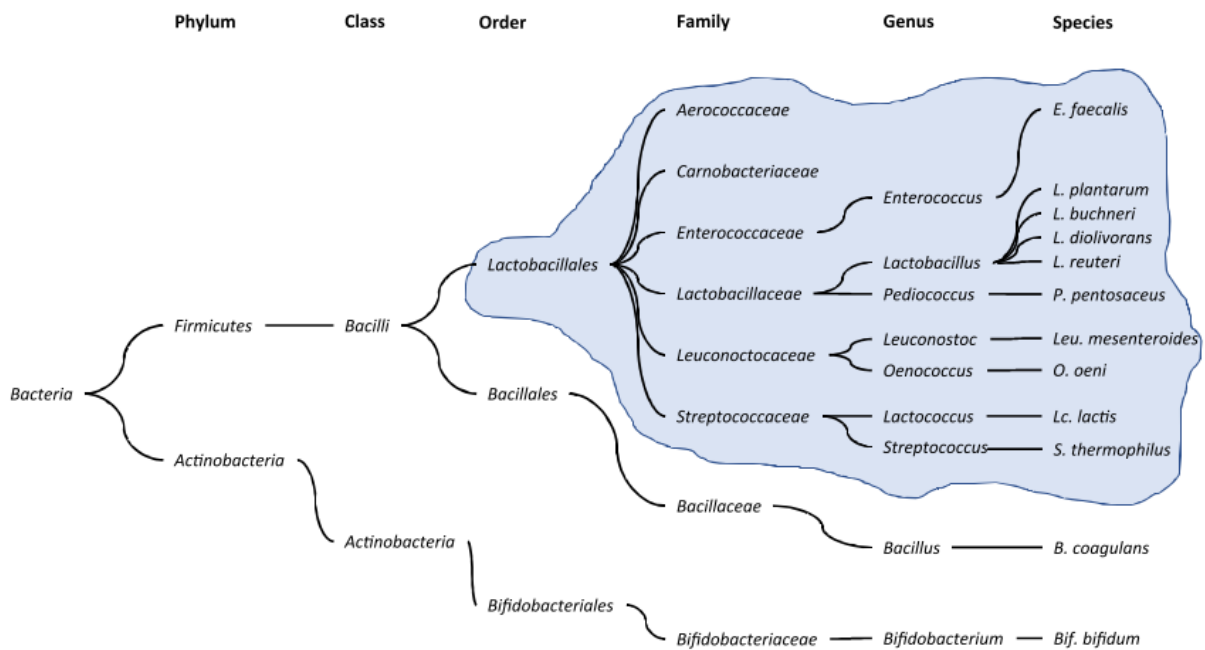


Figura 5. Descripción esquemática de la filogenia de las bacterias ácido lácticas. Tomado de *Sauer y cols. 2017* (41).

La diversidad de las capacidades metabólicas permite a las BAL adaptarse adecuadamente a una variedad de condiciones, y esto es lo que principalmente conduce a su éxito en la fermentación ácido láctica. La diversidad metabólica se ve reflejada en la clasificación de las BAL en función del tipo de fermentación de hexosas y la capacidad de metabolizar pentosas: homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas (**Tabla 5**) (36–40).

Las BAL homofermentativas obligadas, fermentan glucosa exclusivamente a ácido láctico por la vía de *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) pero no pueden fermentar pentosas como

arabinosa, ribosa y xilosa y compuestos relacionados (ej. gluconato). Las BAL heterofermentativas facultativas, fermentan glucosa exclusivamente a ácido láctico vía glucólisis (EMP) y fermentan pentosas y compuestos relacionados por la vía de la fosfocetolasa. El tercer grupo de BAL, las heterofermentativas obligadas, metabolizan glucosa, pentosas y compuestos relaciones por la vía de la fosfocetolasa (36–40).

La clasificación de las BAL como homofermentativas y heterofermentativas obligadas, depende de la presencia o ausencia de la FDP aldolasa o la fosfocetolasa, dos enzimas clave en la glicólisis y la vía de la fosfocetolasa, respectivamente. Las homofermentativas obligadas poseen la FDP aldolasa pero no la fosfocetolasa, las homofermentativas obligadas poseen la fosfocetolasa pero no la FDP aldolasa y las heterofermentativas facultativas presentan las dos enzimas (36–40).

Tabla 5. Metabolismo de carbohidratos de las BAL

Tipo de fermentación	Carbohidrato	Ruta	Géneros
Homofermentativas obligadas	Hexosas	EMP	Grupo I <i>Lactobacillus spp</i>
Homofermentativas facultativas	Hexosas	EMP	<i>Enterococcus,</i> <i>Lactococcus,</i> <i>Lactovum,</i> <i>Paralactobacillus,</i> <i>Pediococcus,</i> <i>Streptococcus,</i> <i>Vagococcus,</i> y Grupo II <i>Lactobacillus spp</i>
	Pentosas o compuestos relacionados	Fosfocetolasa	
Heterofermentativas obligadas	Hexosas Pentosas y compuestos relacionados	Fosfocetolasa	<i>Leuconostoc,</i> <i>Oenococcus,</i> <i>Weissella</i> y Grupo III <i>Lactobacillus spp</i>

De acuerdo a la fermentación de glucosa y otras hexosas, las BAL se pueden dividir en dos grupos: homolácticas y heterolácticas. Las homolácticas fermentan glucosa y otras hexosas por la vía de EMP, en donde una molécula de glucosa es convertida en dos moléculas de ácido láctico. Las BAL heterolácticas utilizan la vía de la fosfocetolasa (6-fosfogluconato), donde teóricamente, una molécula de glucosa consumida produce una molécula de ácido láctico, una de CO₂ y una de etanol (36–40).

Dependiendo de la especie, las condiciones de operación y principalmente la presencia de la D o L lactato deshidrogenasa dependiente de NAD, se puede producir ácido D ó L láctico, respectivamente. Está reportado que las BAL que producen ácido D láctico, como *Lactobacillus delbrueckii*, lo hacen de forma exclusiva. Mientras que, las que producen el isómero L, producen también un pequeño porcentaje del isómero D. Es decir, se genera un exceso enantiomérico de ácido L láctico, pero este no se produce de forma exclusiva. Algunos ejemplos de BAL productores de ácido L láctico en exceso son *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactococcus lactis* (36–40,42,43).

La producción de ácido D láctico por parte de las BAL que producen L láctico en exceso, puede deberse a la presencia una D lactato deshidrogenasa de muy baja actividad. Por otro lado, se ha reportado que algunas BAL presentan la enzima lactato racemasa, que es inducida por el ácido L láctico acumulado y lo convierte en el isómero D hasta alcanzar el equilibrio. *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* son ejemplos de BAL que generan una mezcla racémica de ácido láctico. La disminución de la pureza óptica, representa un problema serio en la producción de ácido láctico ya que las impurezas quirales del isómero D incrementa los costos asociados a la purificación (36–40,42,43).

Recientemente, las cepas de *Bacillus coagulans* han sido extensamente aplicadas en la producción del isómero L y es considerado un excelente productor de ácido láctico debido a sus características. En comparación con otras BAL, ofrece ventajas como bajos requerimientos nutricionales y el mantenimiento de los cultivos para su conservación es sencillo. Además, presenta alta tolerancia a las altas temperaturas y pH bajo, gran resistencia a compuestos inhibidores que se generan en los pretratamientos, una alta pureza óptica y es capaz de fermentar pentosas y hexosas mediante la ruta de EMP (44).

Estos hallazgos sobre *B. coagulans* aumentarán en gran medida la competitividad comercial del uso de biomasa lignocelulósica para la producción de ácido L láctico y atraerán gran atención para el desarrollo de un sistema de fermentación de ácido láctico eficiente y económica utilizando cepas de *B. coagulans* capaces de homofermentar glucosa y xilosa (44).

3.2.2. Hongos productores de ácido láctico

Se encuentra reportado que los hongos de los géneros *Rhizopus*, *Mucor* y *Monilia* producen ácido láctico. Sin embargo, los reportes sobre hongos productores de ácido láctico, se encuentran enfocadas especialmente en el género *Rhizopus* (9,45–48).

Rhizopus oryzae es un hongo filamentoso perteneciente al orden *Mucorales* del filo *Zygomycota*. Las cepas de *Rhizopus* pueden dividirse en dos tipos dependiendo del ácido

orgánico que producen. Las cepas del tipo I, producen ácido L láctico y contienen los genes de dos lactato deshidrogenasas dependientes de NAD (LDHA y LDHB). Mientras que, las cepas del tipo II producen ácido fumárico y ácido L málico, y contienen únicamente el gen de la enzima LDHB. La cepa *R. oryzae* (tipo I) ha sido el foco de numerosos estudios para la producción industrial de ácido L láctico, debido a sus capacidades amilolíticas, xilanolíticas, pectinolíticas y celulolíticas, que permiten la conversión de residuos poliméricos de la agricultura (9,45–48).

Las células de hongos presentan mayor resistencia osmótica a la acumulación de ácido láctico y pueden sobrevivir a temperaturas de hasta 44°C. Sin embargo, la producción de ácido láctico por *R. oryzae* ha demostrado ser sensible a la temperatura donde la temperatura óptima de producción se encuentra en el rango de 27-35°C^{9,45–48}. A su vez, las células de *Rhizopus* presentan menores requerimientos nutricionales que las bacterias ácido láctico, pero dado que se trata de microorganismos aerobios, se requiere aireación vigorosa. Esto último puede ser considerado una desventaja ya que el proceso industrial podría verse limitado por la transferencia de oxígeno que afecta la pureza del ácido láctico por generación de subproductos como etanol (9,45–48).

R. oryzae produce etanol mediante la conversión de piruvato en acetaldehído y dióxido de carbono por medio de la enzima piruvato descarboxilasa (PDC), seguido de la oxidación de acetaldehído a etanol por la alcohol deshidrogenasa (ADH) (**Figura 6**). Limitar el flujo de piruvato hacia rutas no deseadas puede ser una alternativa para inhibir estas enzimas que promueven la producción de etanol (9,45–48).

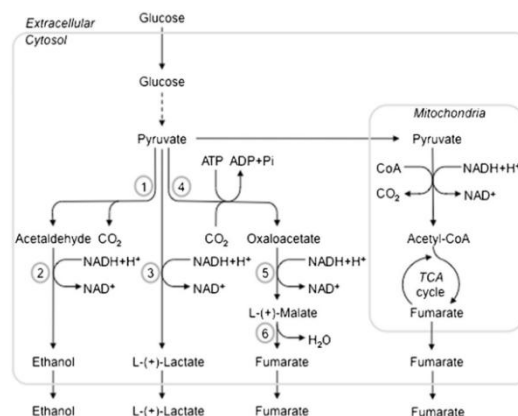


Figura 6. Descripción simplificada de las principales rutas de fermentación de *R. oryzae* con glucosa como fuente de carbono. Los números indican las enzimas clave de la vía: 1, piruvato descarboxilasa (PDC); 2, alcohol deshidrogenasa (ADH); 3, lactato deshidrogenasa (LDH); 4, piruvato carboxilasa (PYC); 5 malato deshidrogenasa (MDH); 6, fumarasa (FUM). Tomado de *Meussen y cols. 2012 (45)*.

Además, está reportado que la transferencia de oxígeno se puede mejorar controlando la morfología de crecimiento del hongo. Para el control de la morfología se han empleado distintas técnicas de inmovilización previas al proceso de fermentación. Sin embargo, mediante la inmovilización también se ha observado producción de etanol, aunque en menores cantidades. A partir de esto se ha concluido que el etanol se genera como consecuencia del crecimiento celular y por lo tanto la pureza del ácido láctico y el proceso de purificación se ven afectados negativamente (9,45–48).

Por otro lado, *R. oryzae* presenta un rango de pH entre 4 y 9, pero el pH óptimo de crecimiento y producción de ácido láctico es de 6,5. Como se mencionó anteriormente, pHs superiores a 4 añade dificultad y costos al proceso de purificación. Este organismo bajo suficiente suministro de oxígeno convierte glucosa en piruvato y este último ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), donde se genera ATP y NADH (**Figura 6**). La energía y los cofactores generados en TCA, facilitan la conversión de piruvato a ácido láctico por medio de las enzimas lactato deshidrogenasas. A diferencia de las bacterias ácido lácticas homofermentativas, la fermentación con *R. oryzae* en determinadas condiciones, resulta en cuatro productos principales incluyendo ácido L láctico, biomasa celular, ácido fumárico y etanol (9,45–48).

Los inconvenientes asociados a la producción de ácido láctico y las limitaciones de los microorganismos productores naturales, se pueden abordar a nivel de la fermentación, ya se optimizando las condiciones de cultivo, modalidades de la fermentación y utilizando compuestos inhibidores de ciertas enzimas de las rutas metabólicas no deseadas, o a nivel de microorganismo. A nivel de los microorganismos, el abordaje pueden tomar dos caminos: modificar genéticamente microorganismos no productores de ácido láctico robustos y que presentan ventajas sobre los productores naturales o introducir mejoras genéticas en microorganismos productores naturales (45).

3.2.3. Modificaciones genéticas en microorganismos no productores de ácido láctico

Comúnmente, los inconvenientes asociados a las cepas en la producción de ácido láctico son la baja tolerancia de las cepas a pH bajos y su capacidad de utilizar cantidades limitadas de sustratos. Además, si bien el ácido láctico es producido por las BAL como metabolito primario, la pureza química y óptica del ácido láctico puede variar, dado que los microorganismos pueden consumir sustratos por rutas metabólicas ineficientes (6,34,49,50).

La ingeniería metabólica es una de las tecnologías emergentes más utilizadas para incrementar la tolerancia al ácido, redirigir el consumo de sustratos por rutas más eficientes y

producir ácido láctico más puro. El enfoque convencional de ingeniería metabólica, generalmente se centra en la redirección de rutas o en la expresión heteróloga de genes, mientras que las herramientas basadas en mutagénesis sitio dirigida son las más comunes en los métodos modernos (6,34).

La modificación genética de microorganismos no productores de ácido láctico supone siempre la expresión heteróloga del gen de una L o D lactato deshidrogenasa, dependiendo del tipo de isómero que se desea producir. Los microorganismos más reportados presentan capacidades favorables como requerimientos nutricionales bajos o conversión de pentosas por homofermentación y las herramientas para su transformación son amplias (50).

En ocasiones, es necesario bloquear ciertas rutas metabólicas que conducen a la generación de subproductos y compiten con la vía de síntesis de ácido láctico. Además, el bloqueo de rutas metabólicas secundarias disminuye la interferencia de los subproductos con la pureza y aumenta el rendimiento de ácido láctico. El incremento del flujo metabólico a través de la vía de síntesis de ácido láctico puede darse por delección o atenuación de genes de enzimas clave de las vías competitivas o que generan subproductos. Los casos más reportados están asociados a la producción de etanol, e involucra la delección de genes como los de la piruvato descarboxilasa (PDC), alcohol deshidrogenasa (ADH) o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GDP). Además, en ocasiones, también puede aplicarse a microorganismos productores naturales para mejorar los rendimientos y evitar la conversión de azúcares fermentables en otros productos distintos al ácido láctico (50).

Junto a la ingeniería de las vías metabólicas se ha propuesto la ingeniería asociada al balance redox. Se ha reportado que la delección de los genes de las enzimas NADH deshidrogenasa citosólicas, genera un aumento de la disponibilidad de NADH que se traduce en una mejora de la producción de ácido láctico (50).

Mediante ingeniería metabólica se han alcanzado mejoras notables en microorganismos no productores de ácido láctico, pero la aplicación de este enfoque es limitada cuando se trata de microorganismos en donde no hay un conocimiento detallado sobre las relaciones genotipo-fenotipo. Por lo tanto, esta estrategia suele limitarse a hospedadores bien caracterizados como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *sonorensis*, *Kluyveromyces lactis* y *marxianus*, *Pichia stipitis*, *Aspergillus niger* y *oryzae* y *Escherichia coli* (41,50,51).

Otra de las alternativas reportadas de ingeniería metabólica, implica la sobreexpresión del activador transcripcional de la respuesta a estrés por ácidos débiles. Esta modificación se realizó en una cepa *S. cerevisiae* y mejoró considerablemente la adaptación de la levadura al pH ácido. Sin embargo, cuando la modificación se realizó sobre otra cepa de *S. cerevisiae*,

la productividad de ácido láctico fue un 32% más baja. Este resultado mostró que no todos los microorganismos hospedadores responden con la misma eficiencia a las modificaciones genéticas (6).

Recientemente, *S. cerevisiae* ha sido modificada para producir ácido L láctico a partir de lactosa. Se expresaron los genes del transportador de celodextrina (CDT-1) que también transporta lactosa y el gen de la beta-galactosidasa (GH1-1) que también actúa como beta-galactosidasa, de *Neurospora crassa*. Además, se expresó el gen de LDHA de *R. oryzae*. Este reporte es una primera aproximación a la síntesis de ácido láctico a partir de la biomasa residual de suero de leche utilizando *S. cerevisiae* modificada genéticamente mediante ingeniería metabólica (52).

Existen numerosos reportes sobre ingeniería metabólica aplicada a microorganismos no productores de ácido láctico y algunos ejemplos de las mejoras se muestran en la **Tabla 6**. Cada gen es expresado en un microorganismo es responsable de una actividad metabólica específica. Por lo tanto en todos los casos, es esencial realizar un análisis completo del gen transferido y la reacción en el microorganismo hospedero para determinar el éxito del proceso (6).

Tabla 6. Ejemplos de modificaciones genéticas en microorganismos no productores naturales

Microorganismo	Modificación	Mejora
<i>Aspergillus oryzae</i>	Gen L-LDH bovina + delección LDH endógena	Producción ácido L láctico
<i>S. cerevisiae</i>	Gen L-LDA <i>Pelodiscus sinensis</i> + delección gen PDC1, CYB2, GDP1, NDE1 y NDE2	Producción ácido L láctico y bloqueo de ruta metabólica del etanol
<i>S. cerevisiae</i>	Gen CDT1 y GH1-1 <i>Neurospora crassa</i> + Gen LDHA <i>R. oryzae</i>	Producción de ácido L láctico y utilización de lactosa
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Gen D-LDH <i>L. bulgaricus</i>	Pureza óptica de ácido D láctico
<i>Candida sonorensis</i>	Gen LDH <i>L. helveticus</i> + delección genes PDC1 y PDC2	Producción ácido L láctico y bloqueo de ruta metabólica del etanol

3.2.4. Modificaciones genéticas en microorganismos productores naturales de ácido láctico

Uno de los principales obstáculos desde el punto de vista de la ingeniería metabólica, es que las BAL presentan una gran diversidad natural que hace que la ingeniería genética tenga distintos niveles de éxito en las diferentes BAL y muchas de ellas son altamente resistentes a la transformación o nunca han podido ser transformadas. Algunas BAL son fáciles de transformar como *L. plantarum*, *L. casei* o *L. helveticus* (Tabla 7) y se encuentran descritas muchas herramientas para su transformación mediante ingeniería metabólica (41).

Mediante ingeniería metabólica se ha logrado incrementar la pureza óptica del ácido láctico, a través de la remoción del promotor del gen de la D lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus helveticus*. Sin el promotor de este gen, *L. helveticus* solo produce ácido L láctico. Sin embargo, su complejidad nutricional continúa siendo un obstáculo a nivel industrial (34).

La mejora de las cepas basada en mutagénesis aleatoria secuencial es uno de los principales métodos para el desarrollo de microorganismos industriales incluyendo BAL y *R. oryzae*, en donde ha tenido una aplicación exitosa y se ha visto mejorada la producción de ácido láctico. Mediante esta estrategia es posible interrumpir la funcionalidad de genes o incrementar la productividad de los procesos metabólicos Sin embargo, es una estrategia laboriosa y lenta especialmente para la ingeniería de fenotipos complejos y presenta riesgos de que se generen mutaciones múltiples. Además requiere de una cantidad considerable de tiempo para detectar los microorganismos que hayan adquirido una mutación favorable así como rondas de selección posteriores (34,45,51).

La estrategia de *genome shuffling* ha logrado resultados exitosos en la mejora de fenotipos complejos como los de las BAL, en donde se reducen los efectos nocivos de la acumulación de mutaciones raras³⁴. La técnica ha sido utilizada para mejorar la resistencia a pH ácido en cepas de *Lb. casei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum* y *Lb. rhamnosus*. También se ha logrado mejoras asociadas a la utilización de otras fuentes de carbono y mejora de parámetros como la inhibición por concentraciones altas de glucosa (34,51).

Tabla 7. Ejemplos de modificaciones genéticas en microorganismos productores naturales

Microorganismo	Modificación	Mejora
<i>Lb. helveticus</i>	Deleción promotor gen D-LDH	Mejora pureza óptica isómero L
<i>Lactococcus lactis</i>	Expresión histidina descarboxilasa CHCC1524	Mejora resistencia pH ácido
<i>Lb. plantarum</i>	Expresión de α -amilasa (AmyA) y deleción gen L-LDH	Producción isómero D a partir de almidón

3.3. Producción de ácido láctico

Una vez que se seleccionan la biomasa y los microorganismos, de acuerdo a los criterios mencionados anteriormente, el proceso de producción de ácido láctico se rige, esencialmente, de acuerdo al diagrama de flujo que se muestra en la **Figura 7**.

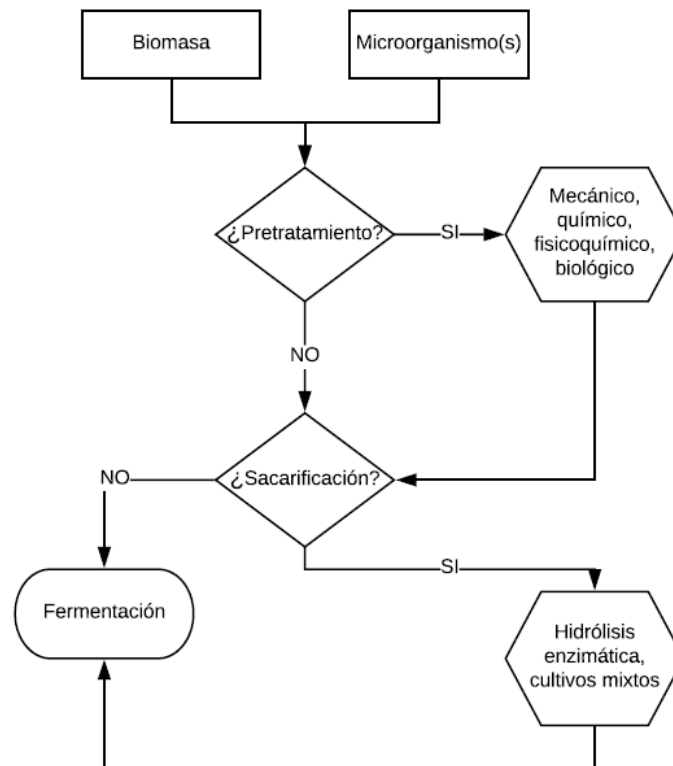


Figura 7. Diagrama de flujo de las operaciones previas al proceso de producción de ácido láctico mediante fermentación. Se toma como punto de partida las características composicionales de la biomasa en cuestión y las capacidades metabólicas del/los microorganismo/s seleccionados.

Dentro de las situaciones que pueden presentarse, la biomasa puede ser utilizada directamente como sustrato de fermentación o bien puede requerir algún pretratamiento ya sea para la obtención de azúcares fermentables, o la descomposición parcial de la biomasa a la cual se la deba someter a una posterior sacarificación para la obtención de azúcares fermentables.

3.3.1. Pretratamiento de la biomasa

Como se muestra en la **Tabla 1**, la biomasa puede clasificarse según sus principales componentes en: lignocelulósica, almidonada, azucarada y lipídica. Dado que la obtención de azúcares fermentables de cada biomasa dependerá de la pureza de la misma, se comentarán los pretratamientos en función de la composición de la biomasa, enfatizando en las biomásas más complejas (lignocelulósicas) ya que las azucaradas y almidonadas, generalmente, no requieren de pretratamientos previos.

El objetivo de los pretratamientos es remover, modificar o reducir la cristalinidad, el tamaño de las partículas, recalcitrancia y solubilidad de los componentes de la biomasa y en consecuencia, aumentar la accesibilidad de las enzimas o facilitar la asimilación de los componentes por parte de los microorganismos (8,15,36,39).

Las biomásas azucaradas y almidonadas son las más utilizadas en los procesos de bioconversión, debido a su sencillez estructural y a que se encuentran reportados una gran cantidad de microorganismos, naturales o modificados genéticamente, que presentan la capacidad de asimilarlas y convertirlas en ácido láctico sin necesidad de pretratamiento previo. Sin embargo, al estar estrechamente vinculadas al sector alimentario, el foco de las investigaciones se ha desviado hacia biomásas provenientes de residuos industriales orgánicos, lignocelulósicas y microalgas principalmente (36,39,53,54).

Particularmente la biomasa lignocelulósica, es la que se encuentra más ampliamente disponible y a un bajo costo, además de no competir con el sector alimentario. Se estima que es la biomasa más prometedora para satisfacer la demanda de ácido láctico. En este contexto, existe un vasto repertorio de investigaciones vinculadas a estrategias transformación de la biomasa lignocelulósica en donde se incluyen metodologías de pretratamiento que han sido aplicadas para distintos tipos de biomásas complejas (36,39,53–55).

Los pretratamientos se pueden clasificar en mecánicos/físicos, fisicoquímicos/termoquímicos y biológicos. En la **Tabla 8** se resumen los pretratamientos de biomasa más ampliamente reportados y utilizados (36,39,53–55)

Tabla 8. Metodologías de pretratamiento de biomasa

Mecánicas	Fisicoquímicas	Biológicas
Molienda	Explosión con vapor	Hidrólisis enzimática
Irradiación con microondas	Explosión con amonio	Tratamiento con hongos
	Hidrólisis ácida	
	Hidrólisis alcalina	
	Hidrotermales	

3.3.1.1. Pretratamientos mecánicos/físicos

Generalmente, las metodologías mecánicas/físicas se utilizan en conjunto y previo a una metodología fisicoquímica o biológica. La función de los pretratamientos mecánicos/físicos es la de reducir el tamaño de la biomasa utilizando metodologías como la molienda o chipeado (36,39,53–56).

La molienda mecánica es uno de los principales pretratamientos que afecta significativamente la eficiencia general del proceso, en términos de digestibilidad de la celulosa, toxicidad en la fermentación y tratamiento de residuos. Facilita la sacarificación enzimática de las biomásas reduciendo el tamaño y la cristalinidad de la celulosa. Se requiere una gran cantidad de energía para obtener celulosa pulverizada, adecuada para la sacarificación enzimática. Se han reportado herramientas como molino de bolas, de anillo de bolas, y de discos, que permiten obtener partículas finas con un diámetro medio que se encuentra en el rango de 20-50 μm (35,57).

3.3.1.2. Pretratamientos fisicoquímicos/termoquímicos

La explosión con vapor utiliza vapor a alta presión de alrededor de 0,69 a 4,84 MPa (~7 y 48 veces la presión atmosférica, respectivamente) con temperaturas que van desde 120 a 160°C y requiere tiempos desde segundos a minutos. El vapor penetra en la biomasa y expande las paredes celulares de las fibras, previo a la explosión y la hidrólisis parcial. A continuación, la presión se reduce rápidamente hasta la condición atmosférica. Se ha reportado que se puede alcanzar cerca de un 90% de eficiencia de hidrólisis enzimática luego del tratamiento por explosión con vapor. En comparación con la molienda mecánica, la explosión con vapor es uno de los procesos más rentables. Sin embargo, no se logra una disrupción completa de la matriz de la biomasa (lignina-carbohidrato), y por lo tanto hay una recuperación parcial de los polisacáridos (35).

Otro inconveniente asociado a la explosión con vapor, además de las condiciones extremas de temperatura y presión, incluyen la producción de compuestos inhibidores de microorganismos y enzimas de los procesos posteriores. La eliminación de estos subproductos es necesaria previo a la obtención de azúcares fermentables lo cual añade complejidad y costos al proceso (35).

El pretratamiento de la biomasa por hidrólisis ácida, utiliza ácidos diluidos (menos de 4% H_2SO_4) a temperaturas elevadas de entre 130 y 200°C y puede tomar desde 2 a 80 minutos. El mecanismo de la degradación de polisacáridos en monómeros está asociado con la ruptura de enlaces glucosídicos. Cuando se utiliza un medio ácido para el pretratamiento de la biomasa, el ácido tiene la capacidad de actuar como un catalizador que da como resultado la despolimerización de los polisacáridos (35,39,56).

La hidrólisis con ácidos diluidos es un proceso de bajo costo, donde se puede obtener hasta un 90% de rendimiento durante la hidrólisis de hemicelulosa y glucosa. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes está relacionado con problemas de corrosión, lo que demanda el uso de materiales costosos de equipamiento y operación. Además Durante la hidrólisis acida de la biomasa lignocelulósica, es importante seleccionar las condiciones apropiadas del pretratamiento para maximizar la solubilización de la hemicelulosa y minimizar la formación de compuestos inhibidores (35,39,56).

La hidrólisis alcalina utilizando NaOH o $Ca(OH)_2$ puede expandir los poros de la biomasa celulósica a temperaturas de entre 25 a 85°C. El pretratamiento alcalino puede reducir el grado de polimerización y la cristalinidad, aumentar el área de superficie y la solubilización de lignina y hemicelulosas. La relación sólido/líquido de los tratamientos alcalinos es de un 10-20% y el tiempo del proceso puede tomar de 1 a 30 horas dependiendo de la temperatura y la concentración de la base utilizada. El tratamiento alcalino es más efectivo en residuos agrícolas y cultivos herbáceos energéticos, que en biomásas leñosas (35,39,56).

En comparación con otros pretratamientos químicos, la hidrólisis alcalina puede realizarse a temperaturas y presiones más bajas, causando menor degradación de azúcares que el pretratamiento con ácidos. Sin embargo, requiere mayor tiempo de proceso para las biomásas leñosas (35,39,56).

El pretratamiento e hidrólisis de biomásas complejas mediante las metodologías descritas, dan como resultado la formación de productos inhibidores del tipo fenólicos que pueden ser generados por la degradación de la lignina, compuestos de furano (ej. Furfural y 5-hidroximetilfurfural) generados por la degradación indeseada de azúcares, y también iones inorgánicos y bioalcoholes. Estos compuestos inhiben en gran medida el proceso de

fermentación, afectando el crecimiento celular y las actividades enzimáticas que permiten la producción de ácido láctico, constituyendo uno de los principales obstáculos para la utilización de biomasa lignocelulósica. Es necesario desintoxicar la biomasa para poder utilizarla para la sacarificación o fermentación (13,35,39,56).

Se ha reportado que los lavados de la biomasa pretratada con agua desionizada, permite remover cerca del 90% de los inhibidores. Por otro lado, se han reportado estrategias de lavados que utiliza CaOH que es un reactivo de bajo costo. Sin embargo, se requiere equipamientos y operaciones para remover los residuos sólidos (cal) que se generan. Una alternativa al CaOH es el uso NH₄OH, que no genera residuos sólidos. Sin embargo, presenta la desventaja de ser un reactivo significativamente costoso (35,39,56).

Otra alternativa para la remoción de inhibidores, es la exclusión a través de osmosis inversa. El uso de membranas para desintoxicación de las biomásas es un proceso de fácil escalamiento, por lo que podría ser utilizado a nivel industrial. Sin embargo, se han reportado pérdidas de azúcares fermentables y ciertos nutrientes de la biomasa, durante los procesos de desintoxicación reportados. Otros métodos de desintoxicación reportados incluyen, tratamiento con carbón, intercambio iónico, evaporación, adición de agentes reductores y desintoxicación microbiana o enzimática. Sin embargo, estos métodos hacen que el proceso sea más complejo y aumentan el costo de producción de ácido láctico (35,39,56).

La explosión de fibras con amonio, presenta un mecanismo similar a la explosión con vapor, a diferencia que utiliza amonio líquido. Esta metodología no requiere pasos de desintoxicación o lavado de la biomasa pretratada por lo que, en ocasiones, es la de preferencia. Sin embargo, al utilizar grandes cantidades de amonio (1-2 kg de amonio líquido por kg de biomasa seca), requiere un consumo significativamente alto de energía para recuperar y reciclar el amonio (35,39,56).

En cuanto a la biomasa de microalgas para la producción de ácido láctico, la misma debe ser procesada con el fin de extraer los lípidos y liberar azúcares. Para la extracción de lípidos se han reportado metodologías de extracción con cloroformo-metanol o cloroformo-metanol-agua. Si bien estos métodos son efectivos, no son aplicables a escala industrial ya que el cloroformo implica riesgos ambientales y para la salud. Además, estas metodologías producen contaminantes no lipídicos que inhiben el procesamiento posterior. El hexano ha sido reportado como alternativa al cloroformo, que si bien es menos contaminante y presenta menos generación de subproductos no lipídico, no es tan efectivo (58).

3.3.1.3. Pretratamientos biológicos

Desde el punto de vista económico y ambiental, los pretratamientos utilizando hongos de la podredumbre blanca que degradan selectivamente la lignina, han recibido gran interés como una alternativa a los pretratamientos químicos/físicoquímicos. La factibilidad del pretratamiento fúngico para mejorar la digestibilidad, se ha reportado en varias biomásas residuales como rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, tallos de algodón y biomasa leñosa. Además, las investigaciones están especialmente interesadas en el pretratamiento fúngico en estado sólido ya que permite utilizar cargas de sustratos considerablemente más altas que en cultivos de estado líquido (33,35,36,55,59).

Las especies ligninolíticas de hongos de la podredumbre blanca más estudiadas, son los que presentan un sistema enzimático compuesto de lacasas, manganeso peroxidasas (MnP) y lignina peroxidasas (LiP), que degradan la lignina y compuestos análogos a la lignina. Ciertos hongos de la podredumbre blanca como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus vesicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Cyathus stercoreus*, y *Ceriporiopsis subvermispora*, entre otros, han sido estudiados para el pretratamiento de una amplia variedad de biomásas. Sin embargo, no todas las enzimas del sistema lingocelulolítico han sido detectadas en los cultivos de estos hongos. Por ejemplo, en el cultivo de *P. chrysosporium* se detectó LiP y MnP, pero no lacasas. En el caso de *C. subvermispora* solo produjo MnP y lacasas y no se detectó LiP (33,35,36,55,59).

Además de los hongos, ciertas bacterias como *Pseudomonas* y bacterias filamentosas como *Actinomycetes*, presentan la capacidad de deslignificar la pared celular de plantas con la ayuda de enzimas como peroxidasas, MnP, LiP, demetilasas, catalasas y fenol oxidasas. Sin embargo, además del complejo enzimático lignocelulósico, la mayoría de los microorganismos lingocelulolíticos, producen otras enzimas como pectinasas, proteasas, lipasas y fitasas cuando son cultivados sobre sustratos lignocelulósicos. Por lo tanto, junto con la eliminación de la lignina, también hay biodegradación de una porción de celulosa y hemicelulosa, generando pérdidas de azúcares fermentables. Los microorganismos selectivos son escasos y son todos hongos de la podredumbre blanca (33,35,36,55,59).

Los procesos de degradación mediada por hongos, presentan la ventaja de ser de bajo costo, bajo requerimiento energético, utiliza técnicas simples, condiciones de proceso moderadas, ausencia o reducción de productos de desecho, presenta altos rendimientos sin generación de subproductos contaminantes y reducción o ausencia de inhibidores de la fermentación. Sin embargo, presentan la desventaja de requerir tiempos largos de pretratamiento y velocidades de hidrólisis bajas, y en ocasiones hay una pérdida sustancial de celulosa y hemicelulosa (33,35,36,55,59).

Para abordar estas problemáticas y obtener una biomasa rica en celulosa pero altamente deslignificada, es necesario utilizar hongos altamente selectivos. Además, los parámetros de cultivo también afectaran los rendimientos del pretratamiento, por lo que el escalamiento del proceso, descontaminación de la biomasa y diseño del reactor deben abordarse detalladamente para aplicaciones industriales. Otro aspecto a destacar sobre la selectividad, es que esta varía entre las especies de hongos de la podredumbre blanca, y dentro de una misma especie puede haber diferencias con el tiempo de pretratamiento (en el orden de semanas a meses) y degradación según la biomasa utilizada (33,35,36,55,59).

La degradación mediada puede ocurrir lentamente requiriendo tiempos largos de pretratamiento para alcanzar una remoción alta de lignina. Además, los procesos de degradación lenta son más susceptibles a contaminación, y por lo tanto añaden costos significativos al proceso. La combinación de estrategias químicas/fisicoquímicas con la degradación de hongos, ha demostrado mejoras en la degradación enzimática y se han reducido potencialmente los tiempos del proceso. Por otro lado, el aislamiento de las enzimas ligninolíticas y su utilización por separado, sería una alternativa a la mejora de la selectividad y a la reducción del tiempo de degradación (33,35,36,55,59).

La hidrólisis enzimática medida por las enzimas ligninolíticas se lleva a cabo incubando las enzimas mencionadas anteriormente, con la biomasa en cuestión. Presenta el potencial para superar los inconvenientes asociados al tratamiento con hongos debido a su alta selectividad y a tiempos que varían de horas a días (33,35,36,55,59).

Del mismo modo que la degradación mediada por hongos, la hidrólisis enzimática de la biomasa debe desarrollarse en condiciones estériles para prevenir la degradación de los azúcares fermentables liberados, por parte de los microorganismos endógenos que están presentes naturalmente en la biomasa (33,35,36,55,59).

El uso de enzimas a nivel industrial todavía se encuentra limitado principalmente porque las enzimas son relativamente inestables a altas temperaturas, los costos de aislamiento y purificación son altos y la separación de la biomasa pretratada es dificultosa. Actualmente, se están llevando a cabo extensas investigaciones sobre enzimas con termoestabilidad mejorada, ya que las altas temperaturas podrían acelerar el tiempo de reacción de hidrólisis (33,35,36,55,59).

Otra desventaja que presenta el uso de enzimas hidrolíticas es el alto costo de producción y la inhibición de las mismas por acumulación de producto además de que se requieren grandes cantidades de enzima para hidrolizar la biomasa, por lo que plantea limitaciones en la aplicación industrial (33,35,36,55,59).

3.3.1.4. Criterios de selección de pretratamiento

En la **Tabla 9**, muestran los principales criterios que se considerados para la selección de un pretratamiento o la combinación de varios pretratamientos.

Tabla 9. Principales criterios de selección de pretratamientos

Bajo costo
Mínima o ninguna formación de subproductos inhibidores
Bajo consumo energético
Mínimo o ningún degradación de azúcares fermentables
Alta producción de biomasa digerible
Mínimo o ningún paso de lavado o desintoxicación
Efectivo para altas cantidades de sólidos
Tiempos cortos de proceso

Actualmente, no existe una única metodología de pretratamiento que sea de un solo paso y que cumpla con todos los criterios de selección. Generalmente, se utiliza una combinación de pretratamientos y los más utilizados son los mecánicos junto con hidrólisis ácida o alcalina, y posterior desintoxicación de la biomasa. Por lo tanto, la tendencia sobre las investigaciones está enfocada esencialmente en la búsqueda de un único pretratamiento y no pretratamientos sucesivos.

Ciertamente, ciertos microorganismos son capaces de fermentar directamente polímeros de lignina, celulosa y hemicelulosa en productos de valor agregado. En este contexto, las herramientas y la tecnología actual podrían permitir el desarrollo de microorganismos modificados genéticamente resistentes a los inhibidores generados durante los pretratamientos o capaces de producir ácido láctico. También optimizar condiciones y parámetros de los procesos de bioconversión o desarrollar enzimas a un bajo costo para la obtención de ácido láctico, sin necesidad de emplear etapas sucesivas de pretratamiento.

Hasta la fecha, no se han reportado procesos de bioconversión en donde los microorganismos o enzimas puedan utilizar la biomasa sin tratamiento previo. Al tratarse de biocatalizadores, siempre será necesario un paso de esterilización de la biomasa para evitar la contaminación con microorganismos endógenos. Además, las demandas del mercado son exigentes en cuanto a la pureza del ácido láctico, por lo que la esterilización se hace inevitable.

Dado que técnicamente no hay tecnología tal que permita evadir las metodologías de pretratamiento, se deberá centrar la atención en la búsqueda de la combinación de

pretratamientos más rentables o la posibilidad de acoplar los residuos y componentes tóxicos para los microorganismos durante la fermentación, a otros sistemas de biorrefinerías.

3.3.2. Sacarificación

La sacarificación es el proceso de conversión de los polisacáridos en la forma de azúcares solubles o fermentables, que facilitan la eficiencia de utilización de la biomasa durante la producción de ácido láctico. El proceso de conversión es necesario cuando el microorganismo utilizado es incapaz de producir ácido láctico a partir de polisacáridos como celulosa y hemicelulosa provenientes de biomasa lignocelulósica (6,17,33,35,39,57,60–62).

Como se mostró en la **Figura 6**, la sacarificación en ocasiones no es necesaria, ya que el microorganismo utilizado puede presentar la capacidad de convertir la biomasa directamente en ácido láctico. Las BAL y ciertos microorganismos modificados genéticamente con el gen de una LDH, son capaces de convertir fácilmente azúcares simples refinados (hexosas y pentosas), disacáridos (sacarosa, maltosa y lactosa) o biomasa almidonada en ácido láctico. En cambio, las biomasa lignocelulósicas son más complejas desde el punto de vista químico y estructural. Esto requiere generalmente de uno o más pretratamientos y sacarificación previa a la fermentación. De hecho, la hidrólisis de la celulosa es uno de los principales factores limitantes en la utilización eficiente de biomasa lignocelulósicas como materia prima para los procesos de fermentación y existe una gran repertorio bibliográfico asociado a metodologías de conversión de celulosa y biomasa lignocelulósica (6,17,33,35,39,57,60–62).

Una gran diversidad de bacterias y hongos pueden hidrolizar celulosa y hemicelulosa en monómeros de azúcares. Las especies hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas entre hongos y en bacterias de los órdenes *Actinomycetales* y *Clostridiales*, siendo este último el más investigado. Si bien estos microorganismos pueden utilizarse para la sacarificación, los monosacáridos obtenidos son compuestos intermedios del metabolismo celulolítico y generalmente es difícil detener el metabolismo a nivel de monosacáridos. Por lo tanto, la sacarificación con enzimas libres ha sido ampliamente explorada y es la metodología más prometedora para producir azúcares fermentables debido a la alta selectividad de las enzimas (6,17,33,35,39,57,60–62).

La hidrólisis enzimática de celulosas implica reacciones sinérgicas catalizadas por enzimas celulasas, en donde al menos tres son las actividades predominantes. La endo-1,4- β -glucanasa ataca regiones de baja cristalinidad en la celulosa creando extremos de cadenas libres, la exo-1,4- β -exoglucanasa que remueve unidades de celobiosa de los extremos, y la β -glucosidasa (celobiasa) que hidroliza celobiosa para producir glucosa. La eficiencia de sacarificación de la celulosa depende de una combinación balanceada de estas tres actividades

así como del tipo de biomasa pretratada (6,17,33,35,39,57,60–62).

A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa es químicamente más compleja y por lo tanto requiere múltiples enzimas para su degradación. Las xilanasas son las enzimas clave del mecanismo donde se destacan las actividades endo- β -1,4-xilanasas, β -xilosidasa y diferentes glucosidasas. Los sistemas de hemicelulasas no se encuentran ampliamente estudiados como los de celulasas y por lo tanto su mecanismo no está del todo comprendido. Posiblemente se deba a que la hemicelulosa es más susceptible a hidrólisis ya que no forma estructuras cristalinas y su estructura es amorfa. Además, se pueden obtener azúcares solubles fácilmente durante los pretratamientos químicos descritos en el apartado anterior. Sin embargo, en el futuro se esperan avances en las investigaciones acerca de la degradación enzimática de la hemicelulosas y su regulación, para mejorar la degradación de las lignocelulosas (6,17,33,35,39,57,60–62).

Para maximizar la hidrólisis enzimática, se ha reportado la utilización de mezclas de celulasas y hemicelulasas. El uso de hemicelulasas además de incrementar la hidrólisis de la hemicelulosa, aumenta la accesibilidad de las celulosas, que en definitiva disminuye el tiempo de hidrólisis. Por otro lado, las celulasas individuales presentan actividad hidrolítica limitada, mientras que la mezcla de celulasas puede exhibir un efecto sinérgico (6,17,33,35,39,57,60–62).

La hidrólisis enzimática puede desarrollarse mediante dos estrategias. En la estrategia convencional (SHF; del inglés *separate hydrolysis and fermentation*), el proceso de sacarificación se desarrolla incubando la biomasa pretratada con las enzimas hidrolíticas y luego los azúcares son recuperados y utilizados como sustratos de fermentación. Generalmente, la hidrólisis enzimática ocurre a 50°C, pH menor a 5 y puede tomar entre 48 a 72 hs. La principal ventaja de la SHF es la capacidad de llevar a cabo cada etapa en condiciones óptimas para cada proceso. Sin embargo, las enzimas son inhibidas por retroalimentación de azúcares sacarificados como glucosa, xilosa, celobiosa y otros oligosacáridos, que exige que se utilicen bajas cargas de biomasa y mayores cargas de enzimas para obtener rendimientos razonables. Además, esta estrategia en dos etapas incrementa el tiempo total de procesamiento (6,17,33,35,39,57,60–62).

La estrategia de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF; del inglés *saccharification and fermentation*), ocurre en un solo paso donde se ha reportado inhibición por retroalimentación de azúcares reducida, velocidad de sacarificación mejorada, menor carga de enzima empleada, volumen reducido debido al uso de un único biorreactor, tiempo de procesamiento más rápido, menor consumo energético mayor rendimientos y productividad de ácido láctico (6,17,33,35,39,57,60–62).

Las ventajas de la SSF frente a la SFH se deben principalmente a que la glucosa formada durante la hidrólisis enzimática de la celulosa, puede ser inmediatamente consumida por los microorganismos y convertida en ácido láctico. Sin embargo, la desventaja de la estrategia radica en las diferentes temperaturas y pH óptimos requeridos para la sacarificación y fermentación. Por ejemplo cuando se utilizan ciertas BAL, la temperatura y pH óptimos de fermentación son de 37-43°C y pH 5-7 mientras que los óptimos para la hidrólisis enzimática son 50°C y 5, respectivamente. Para llevar a cabo SSF de una forma más eficiente, se espera que las BAL (o microorganismos modificados genéticamente) termotolerantes pueda tener una temperatura óptima cercana a la de la hidrólisis, como ha sido el caso de la producción de ácido láctico mediante SSF por *Bacillus coagulans* termotolerante (6,17,33,35,39,57,60–62).

Otra desventaja que presenta la SSF es la inhibición de las enzimas hidrolíticas por incremento de ácido láctico en el medio. Por ejemplo en un estudio se observó que la digestibilidad enzimática disminuyó de 90% a 56% cuando la concentración de ácido láctico aumento de 0 a 90 g/L, respectivamente y a niveles superiores a 90 g/L de ácido láctico, se observó una inhibición de la digestibilidad de un 50%. Sin embargo, la inhibición de la hidrólisis enzimática por el ácido láctico es mucho menor que la inhibición por retroalimentación durante SSH, posicionando a SSF como la estrategia de preferencia para la obtención de azúcares fermentables (6,17,33,35,39,57,60–62).

3.3.3. Fermentación

La fermentación de ácido láctico ha sido reportada en modalidades de fermentación en lote, en lote repetida, semicontinua, continua, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, con cultivos de microorganismos puros o mixtos, o en cultivos sumergidos o en estado sólido. Mediante la combinación de ciertas estrategias, es posible obtener diferentes niveles de concentración, productividad y rendimiento de ácido láctico. Actualmente, el 90% de la producción comercial de ácido láctico se lleva a cabo mediante fermentación.

3.3.3.1. Medio de cultivo y suplementos

La formulación del medio de cultivo es una etapa esencial en el diseño de procesos de fermentación exitosos. Los componentes del medio de cultivo deben satisfacer los requerimientos elementales para la producción de biomasa celular y metabolitos, y debe haber un suministro adecuado de energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular (63).

Las BAL son microorganismos con requerimientos nutricionales exigentes. Generalmente, requieren aminoácidos complejos y vitaminas para su crecimiento y se necesita de un medio

sintético para confirmar los requerimientos nutricionales que son específicos de cada cepa. Aminoácidos como L glutámico, L leucina, y L valina, Vitamina B5 y B3 son requeridos por casi todas las BAL (38).

Las principales fuentes de nitrógeno, aminoácidos y vitaminas son los extractos de levadura y el sulfato de amonio. Sin embargo, en términos de procesos industriales, el uso de extracto de levadura presenta un costo elevado aunque es el mejor suplemento de nitrógeno para el cultivo de BAL. Se han estudiado otras fuentes de nitrógeno menos costosas como autolisado de levaduras y licor de maíz, entre otros y se han reportado mejoras en la producción de ácido láctico (14).

3.3.3.2. Fermentación sumergida o en estado sólido

La producción de ácido láctico ha sido reportada tanto en fermentación sumergida como en fermentación en estado sólido, aunque la primera es la más utilizada. La fermentación sumergida puede definirse como el cultivo de microorganismos en un medio líquido homogéneo, mientras que en la fermentación en estado sólido, los microorganismos son cultivados sobre materiales sólidos en ausencia o casi ausencia de agua (62).

La fermentación en estado sólido ha sido reportada principalmente en hongos como *Rhizopus oryzae*. Las condiciones de fermentación son similares a las encontradas en el hábitat natural de *R. oryzae*, y las condiciones permiten una mayor producción de enzimas hidrolíticas que en estado líquido (64).

3.3.3.3. Cultivos puros o mixtos

Los cultivos puros formados por una población de un solo tipo de microorganismo, generalmente presentan una alta eficiencia de utilización de la biomasa, cuando estos presentan la capacidad de convertir todos los azúcares presentes en el medio de cultivo. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los hidrolizados de biomasa lignocelulósica pueden contener una mezcla de diversos azúcares provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa, y puede que el microorganismo seleccionado no tenga la capacidad para asimilar alguna de ellas (13,17,33).

Dado que una de las principales limitaciones en el uso de hidrolizados de biomasa lignocelulósica, es su heterogeneidad inherente, se han explorado estrategias para lograr una

mayor conversión de azúcares en ácido láctico. De esta forma, maximizando el uso de los azúcares, se puede mejorar el rendimiento y la productividad de ácido láctico (13,17,33).

Una de las estrategias para maximizar el rendimiento de ácido láctico, es la utilización de microorganismos que han sido modificados genéticamente. Los microorganismos pueden ser productores naturales de ácido láctico que han adquirido una mejora genética en cuanto al rango de sustrato que utilizan o microorganismos no productores que se les ha introducido un gen de la LDH. Por otro lado, el uso de cultivos mixtos de más de un tipo de microorganismo también ha sido reportado. En la **Figura 8** se muestran las principales consideraciones frente al uso de cultivos simples o mixtos (13,17,33).

El uso de cultivos mixtos mediante co-fermentación, presenta la ventaja de proveer a los microorganismos, acceso a múltiples fuentes de carbono y promueve la mejora de rendimiento y productividad de ácido láctico. Sin embargo, es necesario que los microorganismos sean compatibles en términos de condiciones de operación y consumo de sustrato (13,17,33).

Por otro lado, cuando las condiciones de operación de los microorganismos son incompatibles puede utilizarse la fermentación secuencial. Esta estrategia puede resultar valiosa cuando uno de los microorganismos sea susceptible a inhibición por represión por catabolito. Se desarrolla la fermentación con un de los microorganismo en condiciones óptimas y posteriormente se remueven las células y se cambian las condiciones de fermentación que mejor se adecuen al segundo microorganismo. De esta forma, es posible utilizar la mayor cantidad de azúcares para la producción de ácido láctico (13,17,33).

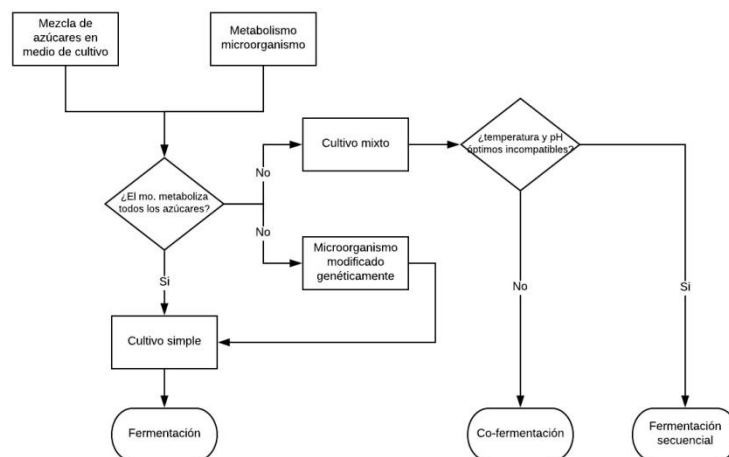


Figura 8. Diagrama de flujo de las principales consideraciones para la aplicación de cultivos simples o mixtos.

Si bien es posible mejorar los rendimientos y concentración de ácido láctico, las productividades no siempre pueden verse mejoradas ya que los tiempos de fermentación pueden ser largos. Idealmente, el aislamiento o modificación genética de un microorganismo robusto capaz de consumir todos los azúcares siempre es la mejor opción para maximizar el uso de la biomasa (13,17,33).

3.3.3.4. Modalidad de fermentación en lote o discontinua

La fermentación discontinua o en lote, ha sido tradicionalmente utilizada para la producción de ácido láctico. Se trata de un sistema de cultivo cerrado que contiene una cantidad inicial y limitada de nutrientes en donde no hay entrada o salida de componentes, a excepción de algún agente neutralizante para el control del pH. Los principales inconvenientes de la fermentación discontinua, están relacionados con el estrés osmótico que enfrentan los microorganismos por la concentración elevada de sustrato, así como la inhibición por acumulación de ácido láctico y el incremento de pH del medio. Además, los niveles de nutrientes bajos limitan la concentración celular, concentración final de ácido láctico y la productividad (13,33,63,65).

El pH del medio puede controlarse mediante la adición de un agente neutralizante como $\text{Ca}(\text{OH})_2$, pero se generan sales de lactato que aumentan la presión osmótica del entorno. Se ha reportado que la suplementación del medio de cultivo con agentes osmoprotectores puede reducir los efectos de inhibición. Sin embargo, se han desarrollado y aislado microorganismos que son capaces de resistir la acidez del medio y el estrés osmótico, lo cual simplifica en parte la necesidad de neutralización y suplementación con agentes osmoprotectores (13,33,63,65).

Si bien se han observado mejoras en la producción de ácido láctico con microorganismos tolerantes a pHs bajos y estrés osmótico, la cantidad de sustrato durante la fermentación discontinua siempre estará limitada por la tolerancia del microorganismo. Dado que el ácido láctico es un producto del metabolismo primario, se produce durante la fase exponencial de crecimiento microbiano. Esto último implica que la producción de ácido láctico durante fermentación discontinua, dependerá de la velocidad específica de crecimiento máxima que el microorganismo pueda alcanzar frente a concentraciones crecientes de ácido láctico o sales de lactato. Además, se debe tener en cuenta que la acumulación de ácido láctico puede extender el tiempo de la fermentación generando bajas productividades que es lo que usualmente sucede en las fermentaciones discontinuas (13,33,63,65).

La fermentación discontinua se ha reportado en numerosos estudios y se ha utilizado ampliamente para la producción de ácido láctico. Sin embargo, se requieren tiempos largos de fermentación que resultan en baja productividad y concentración celular. Además, la

utilización limitada de sustrato y su efecto inhibitor se considera la principal desventaja de esta modalidad de fermentación. Como alternativa, se han investigado y reportado modalidades de fermentación como discontinua repetida con reciclaje de células, con células inmovilizadas, semicontinua y continua (66).

3.3.3.5. Modalidad de fermentación en lote o repetida

La fermentación repetida en lotes es una tecnología que permite mejorar la productividad de ácido láctico mediante un aumento de la concentración inicial de células y el recambio de medio de cultivo. Este aumento se da por la re-inoculación o reciclaje de una parte o la totalidad de la masa celular inicial, de un lote al siguiente en donde también se renueva el medio de cultivo. No requiere limpieza, re-esterilización del biorreactor o etapa de desarrollo de inóculo previo a cada lote (a excepción del primer lote), por lo que el tiempo de la fermentación se ve considerablemente reducido. Las células se pueden recuperarse para su reutilización mediante centrifugación o filtración con membranas, y también se han reportado estrategias de inmovilización (13,67,68).

También se ha reportado el uso de biorreactores con membranas integradas como el de la **Figura 9**. En el primer lote, el inóculo se desarrolla como en la fermentación en lote convencional. Cuando los azúcares del primer lote se consumen, el caldo de fermentación es filtrado y el producto retenido con las células retorna al biorreactor mientras que el permeado líquido se retira del sistema. A continuación el biorreactor con el retenido de células se llena con medio de cultivo fresco (67,68).

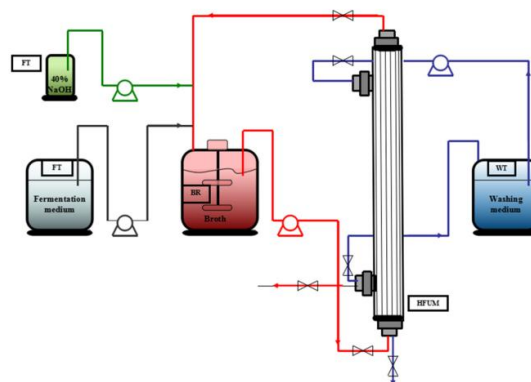


Figura 9. Representación esquemática de una fermentación en lote repetida con biorreactor integrado a módulo de membranas. BR: biorreactor. FT: tanque de alimentación con medio de cultivo fresco. WT: tanque de lavado. HUFM: módulo de membranas de ultrafiltración. En rojo se muestra la circulación del flujo de medio de cultivo filtrado, En azul el flujo del lavado del módulo de membranas, en gris el medio de cultivo fresco y en verde el agente neutralizante. Tomado de *Reddy y cols. 2016* (68).

Una de las desventajas que presenta el uso de membranas es que no hay discriminación entre células vivas y muertas por lo que concentraciones celulares altas pueden llegar a incrementar el tiempo de filtrado por el ensuciamiento de las membranas (67,68).

3.3.3.6. Modalidad de fermentación semicontinua

La fermentación semicontinua ha sido reportada para la producción de ácido láctico con el fin de superar las limitaciones asociadas al efecto de inhibición por concentraciones altas de sustrato. Mediante esta metodología, el sustrato se añade secuencialmente de forma continua o mediante pulsos de alimentación. De esta forma se mantiene la concentración de sustrato a niveles bajos o tolerables por el microorganismo y se maximiza la concentración de ácido láctico. Además, se ha reportado que los tiempos de fermentación son más cortos para la modalidad semicontinua en comparación con la fermentación en lote a altas concentraciones de sustrato. Al reducir los tiempos de fermentación, se alcanzan mejores productividades (13).

3.3.3.7. Modalidad de fermentación continua

La fermentación continua es otra modalidad de fermentación que puede mejorar la productividad de ácido láctico por medio de la reducción del efecto de inhibición por acumulación de producto final. Las fermentaciones continuas se caracterizan por presentar baja densidad celular y las concentraciones de ácido láctico en ocasiones se ven limitadas por el lavado de células. Sin embargo, se puede utilizar la estrategia de reciclaje celular utilizando membranas integradas que permitan mantener la densidad celular y de esta forma, incrementar la producción de ácido láctico y la productividad (13).

3.3.3.8. Ejemplos de producción de ácido láctico

En la **Tabla 10** se muestran algunos ejemplos de producción de ácido láctico reportados mediante fermentación microbiana y los principales parámetros de evaluación del proceso (concentración, rendimiento y productividad de ácido láctico). Se ha reportado el uso de distintas biomasas que a su vez han atravesado diferentes procesos de pretratamiento y utilizan diferentes microorganismos (ya sea productores naturales o con alguna mejora genética) bajo distintas modalidades de fermentación (células libres e inmovilizadas, cultivos mixtos, fermentación y sacarificación en simultáneo o por separado). Existe un gran repertorio de microorganismos, biomasas, procesos de pretratamiento, modalidades de fermentación que pueden combinarse para desarrollar procesos de producción de ácido láctico mediante fermentación microbiana.

Tabla 10. Ejemplos de producción de ácido láctico mediante fermentación microbiana

Biomasa	Microorganismo	Fermentación	Ácido láctico				Referencia
			C (g/L)	R (%)	P (g/Lh)	Isómero y PO (%)	
Suero de leche	<i>K. marxianus</i>	Lote	8,8	24,0	4,3	ND	(69)
	<i>Lb. helveticus</i>	Lote	10,1	23,0	5,1	ND	(69)
	<i>Lb. helveticus</i> + <i>K. marxianus</i>	Lote cultivo mixto	15,5	45,0	10,0	ND	(69)
	<i>Lb. casei</i> SU No. 22 + <i>Lb. lactis</i> WS 1042	Lote cultivo mixto	22,5	48,0	0,9	ND	(69)
		Semicontinua cultivo mixto	46,0	77,0	1,9	ND	(69)
Glicerol	<i>E. coli</i> K12 cepa <i>MG1655-LA02Δdld</i> (modificada)	Lote	32,0	85,0	0,4	D-(≥99,9)	(69)
		Semicontinua	45,0	83,0	0,5		(69)
Microalgas	<i>Lb. paracasei</i> LA 104	Lote SSF	37,1	46,0	1,0	L-(95,7-98)	(69)
	<i>Lb. pentosus</i> ATCC- 8041	Lote SSF	23,0	93,0	0,5	ND	(70)
Residuos de mazorca de maíz	<i>L. delbrueckii</i> ZU-S2	Lote	48,7	95,0	1,0	ND	(70)
		Continuo	44,2	92,0	5,7	ND	(70)
Maíz	<i>R. oryzae</i> NRRL 395	Semicontinua células inmovilizadas	ND	99,9	1,65	L-(ND)	(39)
Arroz	<i>R. oryzae</i> RBUY2- 10	Lote células inmovilizadas	ND	ND	1,84	L-(ND)	(39)
Papa	<i>R. arrhizus</i> DAR 36017	Batch tanque agitado	ND	ND	1,3- 1,6	L-(ND)	(39)

C, concentración; R, rendimiento; P, productividad; PO, pureza óptica

3.4. Purificación

La purificación o recuperación del ácido láctico es una etapa importante de la producción de ácido láctico asociada con la separación del ácido láctico del caldo de cultivo y las etapas posteriores de purificación. Dado que el caldo de fermentación puede contener impurezas como azúcares residuales, nutrientes y otros ácidos orgánicos, la estrategia de purificación seleccionada debe ser tal, que reduzca al mínimo la pérdida de ácido láctico y aumente considerablemente su pureza y requiera mínimo consumo de energía, use la menor cantidad de reactivos (14,33,71–73).

Se han reportado distintas metodologías de recuperación de ácido láctico que proporcionan diferentes grados de pureza, destacándose la recuperación por precipitación, destilación, extracción con solventes, adsorción, procesos de separación con membranas (ósmosis inversa, electrodiálisis y ultrafiltración) y cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, aún existen inconvenientes en la aplicación industrial de estas metodologías que se deben principalmente a los costos altos de equipamiento, recuperación de solventes y elevado consumo energético (14,33,71–73).

La separación por precipitación de lactato de calcio, es la etapa de purificación primaria convencional utilizada en los procesos industriales de producción de ácido láctico. La precipitación puede ser inducida durante la fermentación por adición de agentes neutralizantes como carbonato de calcio (CaCO_3) o hidróxido de calcio (Ca(OH)_2), cuando el pH de la fermentación debe mantenerse entre 5 y 6. Como se mencionó anteriormente, en ocasiones, la neutralización es necesaria ya que altas concentraciones de ácido láctico y pH bajo inhiben el metabolismo de ciertos microorganismos (14,33,71–73).

El agente neutralizante reacciona con el ácido láctico formando lactato de calcio y una vez finalizada la fermentación, se filtra el cultivo para separar las células y recuperar el lactato de calcio. El lactato de calcio recuperado se acidifica con ácido sulfúrico (H_2SO_4) en donde se obtiene ácido láctico disuelto y sulfato de calcio precipitado (yeso insoluble) como subproducto. Posteriormente se filtra el sulfato de calcio para recuperar el ácido láctico (14,33,71–73).

Las principales desventajas de la purificación por precipitación son la formación de grandes cantidades de CaSO_4 (1 tonelada CaSO_4 por cada tonelada de ácido láctico), necesidad de grandes cantidades de H_2SO_4 para disolver el ácido láctico, procesos de filtración y generación de grandes cantidades de aguas residuales y baja pureza (entre 22 y 44%). Sin embargo, para aplicaciones específicas se requiere mayores niveles de pureza así como estabilidad térmica. Se han reportado metodologías de acabado final de ácido láctico, como tratamiento con carbón activado, esterificación con metanol o extracción con solventes, destilación, cromatografía de intercambio iónico y separación con membranas. Esto último implica un aumento en los costos de purificación cuando se recupera el ácido láctico por precipitación, ya que se necesitan procesos adicionales de para obtener un producto de alta pureza (14,33,71–73).

La extracción líquido-líquido o extracción con solventes ha sido propuesta como una alternativa a los procesos tradicionales de precipitación. Durante el proceso, se transfieren uno o más solutos de una mezcla líquida a una segunda fase líquida inmiscible, que se forma por la adición de un disolvente. De este modo, la separación se basa principalmente en las

diferencias en la solubilidad de los solutos en las dos fases y en el alto coeficiente de distribución del solvente de extracción (14,33,71–73).

Los solventes de extracción más efectivos para la separación del ácido láctico son las aminas de alto peso molecular (aminas terciarias). Posteriormente el ácido láctico puede ser separado del solvente mediante purificación por destilación o con solvente de extracción. Algunas desventajas de la metodología están relacionadas a la necesidad de grandes áreas de intercambio para lograr una separación eficiente, lo que resulta en costos elevados de equipamiento y recuperación del solvente. Además, los solventes de extracción son altamente tóxicos para los microorganismos, limitando su aplicación en fermentación y purificación en simultáneo (14,33,71–73).

Generalmente, la extracción líquido-líquido no se aplica en procesos industriales de producción de ácido láctico. Los solventes de extracción convencionales presentan coeficientes de distribución desfavorables para los ácidos orgánicos y resulta indispensable que el solvente utilizado presente baja toxicidad y alto nivel de extracción para que el proceso sea eficiente (14,33,71–73).

Los procesos de separación con membranas han sido estudiados ampliamente para la purificación del ácido láctico, particularmente la microfiltración, nanofiltración y electrodiálisis permitiendo el desarrollo de procesos de purificación que no producen sales como residuos. Además, ofrecen una gran flexibilidad en cuanto al escalado del proceso, alta selectividad que garantiza niveles altos de purificación y separación, se pueden integrar a los fermentadores convencionales permitiendo la producción y purificación en simultáneo y eliminando la necesidad de instalar unidades de separación adicionales, lo que disminuye el costo de inversión en equipos (14,33,71–73).

A pesar de las ventajas que ofrecen los procesos de membranas, las principales limitaciones son el elevado costo de las membranas y problemas asociados con la acumulación de residuos, y bajas velocidades de flujo lo que dificulta su aplicación a nivel industrial. Por lo tanto, los esfuerzos deben enfocarse en optimizar las limitaciones técnicas para que el proceso sea rentable (14,33,71–73).

La utilización de microorganismos resistentes a pHs ácidos, actualmente, es una de las alternativas más atractivas involucradas en la purificación de ácido láctico. Cuando la fermentación se realiza a pH cercano al pKa del ácido láctico ($\text{pH} = 3,48$) con microorganismos tolerantes a pHs ácidos, se evita la utilización de agentes neutralizantes y el ácido láctico puede recuperarse directamente del caldo de cultivo mediante extracción con solventes, adsorción y membranas. A nivel industrial estas alternativas no han sido

implementadas hasta la fecha ya que no se ha encontrado tal microorganismo, siendo la precipitación la metodología primaria más utilizada (14,33,71–73).

4. Conclusiones finales

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de las principales estrategias reportadas para la síntesis de ácido láctico a partir de fuentes renovables. Se trata de un área de investigación en auge, debido al aumento de la demanda y usos del ácido láctico principalmente en las industrias cosmética, alimentaria y recientemente en la de biopolímeros para la producción de ácido poliláctico.

Dentro de la amplia variedad descrita de tipos de biomasa, las lignocelulósicas que no compiten con el sector alimentario son las más atractivas desde el punto de vista ético y económico. Sin embargo, su conversión en ácido láctico implica en la mayoría de los casos, múltiples etapas de procesamiento que supone costos adicionales. Es por esto que resulta de gran interés el desarrollo de estrategias que aumenten la eficiencia y rentabilidad de dichos procesos. A su vez, se encuentran reportados una gran cantidad de microorganismos capaces de llevar a cabo la conversión de biomasa a ácido láctico. Los esfuerzos en el campo de la ingeniería metabólica han llevado a la construcción de microorganismos robustos modificados genéticamente que presentan ventajas metabólicas superiores a sus antecesores. Estos avances han permitido que la producción de ácido láctico a escala industrial a partir de biomasa de bajo costo, se convierta en un objetivo alcanzable en el corto plazo.

Actualmente, la síntesis de ácido láctico se desarrolla a nivel industrial mediante estrategias químicas a partir de recursos no renovables y biotecnológicas a partir de biomasa. La producción mediante estrategias biotecnológicas, concretamente mediante fermentación microbiana, es un proceso complejo en términos de las variables que pueden introducirse (materia prima, condiciones de operación, microorganismos, enzimas, etc.). Además, los inconvenientes asociados a la fermentación vienen dados principalmente por las características intrínsecas de las distintas biomasa y las capacidades metabólicas de los microorganismos que pueden utilizarse. Sin embargo, en comparación a las estrategias químicas requieren un menor consumo energético, no utilizan compuestos altamente tóxicos y las condiciones de operación son moderadas.

La síntesis de ácido láctico a partir de biomasa mediante estrategias químicas, presentan inconvenientes asociados a la baja selectividad de conversión de la biomasa. La principal alternativa propuesta para mejorar la selectividad de conversión implica el uso de catalizadores metálicos, que por su costo resulta económicamente inviable a nivel industrial. Sin embargo, existe un gran interés en mejorar las estrategias de síntesis químicas a partir de biomasa ya que el ácido láctico racémico forma parte del 13% de la demanda y esta demanda es suplida actualmente por la estrategia de síntesis del lactonitrilo.

El análisis de los reportes presentados en este trabajo demuestra que la elección y combinación de los distintos parámetros de operación son altamente estudiadas para la síntesis del ácido láctico a partir de fuentes renovables. A su vez se encuentra en permanente estudio el desarrollo de metodologías eficientes a un bajo costo, con el menor impacto posible sobre el medio ambiente, que apuntan a cumplir con los paradigmas de las biorrefinerías y la demanda del mercado del ácido láctico.

5. Perspectivas de futuro

La biomasa de microalgas libre de lípidos es considerada una materia prima potencial para la fermentación de ácido láctico. A diferencia de las biomásas lignocelulósicas, las microalgas no contienen lignina lo que simplifica la conversión en sustrato de fermentación. Sin embargo, las metodologías más efectivas y ampliamente utilizadas para la extracción de lípidos y recuperación de azúcares no son adecuadas para grandes escalas ya que utilizan reactivos costosos y tóxicos para el ambiente y la salud. Por otro lado, hay microalgas que acumulan grandes cantidades de glicerol que es considerado una fuente de carbón atractiva para la producción de ácido D o L láctico debido a que presenta un mayor grado de reducción en comparación con los azúcares como glucosa y xilosa. En este contexto, el avance en las investigaciones y metodologías de procesamiento en torno al uso de biomasa de microalgas como fuente de materia prima, se ha propuesto como una alternativa a las estrategias de producción de ácido láctico (10,58,65).

En cuanto a las estrategias para superar los inconvenientes asociados a la generación de compuestos inhibidores de microorganismos durante el pretratamiento de biomásas lignocelulósicas, *Abdel-Rahman y cols. (2011)* han propuesto el enfoque de “biomásas diseñadas”. El enfoque se basa en el diseño y aplicación de estrategias de biotecnología vegetal, para producir biomásas con un contenido de lignina y hemicelulosa reducidos y mayor contenido de celulosa. De este modo la materia prima se podría adecuar a los estrategias de pretratamientos, hidrólisis y fermentación actualmente utilizados (13,33).

Como se describió a lo largo del texto, las estrategias de producción de ácido láctico más ampliamente reportadas y utilizadas, implican numerosas etapas que incrementan el tiempo y el costo global de producción especialmente cuando se utilizan biomásas lignocelulósicas. En este sentido, surge la propuesta de un “bioproceso consolidado” en donde, mediante ingeniería genética se pueda generar un microorganismo capaz de producir enzimas que permitan la despolimerización de la biomasa, hidrólisis y fermentación en una sola etapa. Actualmente, el bioproceso consolidado es reconocido como la configuración más reciente que podría permitir la producción de ácido láctico a un menor costo. Sin embargo, para el caso del ácido láctico, no se han encontrado reportes al respecto y se encuentra en una fase temprana de investigación (35,65,74).

Por último, se ha propuesto el desarrollo de una ruta de síntesis de ácido láctico mediante cascada enzimática donde el producto de tratamiento de una enzima sirva de sustrato para el siguiente tratamiento enzimático. De este modo se podrían reducir las etapas y los costos del proceso de producción asociados a la síntesis mediante fermentación y podría simplificar el proceso de purificación. Sin embargo, las enzimas son catalizadores lábiles lo cual dificulta su

utilización a nivel industrial. Esto último, supondría extensas investigaciones que permitan obtener enzimas de utilidad industrial (75).

6. Referencias bibliográficas

1. Dimian AC. BIOREFINERY , THE FUTURE OF CHEMICAL PROCESS INDUSTRIES. 2015;2(2):2–33.
2. Koutinas AA, Vlysidis A, Pleissner D, Kopsahelis N, Lopez Garcia I, Kookos IK, Papanikolaou S, Kwan TH, Lin CSK. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(8):2587.
3. Schwartz TJ, Shanks BH, Dumesic JA. Coupling chemical and biological catalysis: A flexible paradigm for producing biobased chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016;38:54–62.
4. Heux S, Meynial-Salles I, O'Donohue MJ, Dumon C. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology Advances*. 2015;33(8):1653–1670.
5. Huang HJ, Yuan XZ. Recent progress in the direct liquefaction of typical biomass. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2015;49:59–80.
6. Eş I, Mousavi Khaneghah A, Barba FJ, Saraiva JA, Sant'Ana AS, Hashemi SMB. Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International*. 2018;(December 2017):0–1.
7. Castillo Martinez FA, Balciunas EM, Salgado JM, Domínguez González JM, Converti A, Oliveira RP de S. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2013;30(1):70–83.
8. Gezae A, Haigh K, Vaskan P, Görgens JF. Food and Bioproducts Processing Environmental impact assessment of lignocellulosic lactic acid production : Integrated with existing sugar mills. *Food and Bioproducts Processing*. 2016;99:58–70.
9. Juodeikiene G, Vidmantiene D, Basinskiene L, Cernauskas D, Bartkiene E, Cizeikiene D. Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis. *Catalysis Today*. 2015;239:11–16.
10. Komesu A, Allan J, Oliveira R De, Regina M, Maciel W, Filho RM. Lactic Acid Production to Purification: A Review. *BioResources*. 2017;12(2):1–13.
11. Hrnčič MK, Kravanja G, Knez Ž. Hydrothermal treatment of biomass for energy and chemicals. *Energy*. 2016;116:1312–1322.
12. Cao X, Peng X, Sun S, Zhong L, Chen W, Wang S, Sun RC. Hydrothermal conversion of xylose, glucose, and cellulose under the catalysis of transition metal sulfates. *Carbohydrate Polymers*. 2015;118:44–51.
13. Abdel-Rahman MA, Sonomoto K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *Journal of Biotechnology*. 2016;236:176–192.
14. Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, Aqil T, Zulifqar Z, Tariq A, Kamran M, Ehsan N, Mehmood S. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014;7(2):222–229.
15. Bardhan, Soubhik K. Biorenewable chemicals: Feedstocks technologies and the conflict

- with food production, Gupta S, Gorman ME, Haider MA. Biorenewable chemicals: Feedstocks, technologies and the conflict with food production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015;51:506–520.
16. Kumar A, Gautam A, Dutt D. Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2016;7(3):149–168.
 17. Singh Nee Nigam P, Pandey A. Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. 2009.
 18. Khaldi-hansen B El, Schulze M, Kamm B. *Analytical Techniques and Methods for Biomass*. 2016.
 19. Kaushika ND, Reddy KS, Kaushik K. *Sustainable Energy and the Environment: A Clean Technology Approach*. 2016.
 20. Lim CH, Lam HL. Biomass Demand-Resources Value Targeting. *Energy Conversion and Management*. 2014;87:1202–1209.
 21. Northwest P. Catalytic Hydrogenation of Glutamic Acid J OHNATHAN E . H OLLADAY , * T ODD A . W ERPY ., 2004;113.
 22. Gao P, Li G, Yang F, Lv XN, Fan H, Meng L, Yu XQ. Preparation of lactic acid, formic acid and acetic acid from cotton cellulose by the alkaline pre-treatment and hydrothermal degradation. *Industrial Crops and Products*. 2013;48:61–67.
 23. Chin SX, Chook SW, Chia H, Lau KS. Graphene Oxide as Support and Regenerative Substrate for Lead Ions in Catalytic Conversion of Lactic Acid. 2017;12:7133–7144.
 24. Technology S. Application of Hydrothermal Reactions to Biomass Conversion. 2014.
 25. Marcel Schlaf, Z. Conrad Zhang. *Reaction Pathways and Mechanisms in Thermocatalytic Biomass Conversion I*. 2016.
 26. Razali N, Abdullah AZ. Production of lactic acid from glycerol via chemical conversion using solid catalyst: A review. *Applied Catalysis A: General*. 2017;543(December 2016):234–246.
 27. Wang Y, Deng W, Wang B, Zhang Q, Wan X, Tang Z, Wang Y, Zhu C, Cao Z, Wang G, et al. Chemical synthesis of lactic acid from cellulose catalysed by lead(II) ions in water. *Nature Communications*. 2013;4(Ii):1–7.
 28. Wattanapaphawong P, Sato O, Sato K, Mimura N, Reubroycharoen P, Yamaguchi A. Conversion of Cellulose to Lactic Acid by Using ZrO₂–Al₂O₃ Catalysts. *Catalysts*. 2017;7(7):221.
 29. Boonpan A, Pivsa-Art S, Pongswat S, Areesirisuk A, Sirisangsawang P. Separation of D, L-lactic acid by filtration process. *Energy Procedia*. 2013;34(662):898–904.
 30. Hadik P, Szabó LP, Nagy E, Farkas Z. Enantioseparation of D,L-lactic acid by membrane techniques. *Journal of Membrane Science*. 2005;251(1–2):223–232.
 31. Gao C, Ma C, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):930–939.
 32. Yadav AK, Chaudhari AB, Kothari RM. Bioconversion of renewable resources into lactic acid: an industrial view. *Critical reviews in biotechnology*. 2011;31(1):1–19.
 33. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2010;156(4):286–301.

34. Upadhyaya BP, DeVeaux LC, Christopher LP. Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends in Biotechnology*. 2014;32(12):637–644.
35. Rabemanantsoa H, Saka S. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology*. 2016;199:83–91.
36. Idler C, Venus J, Kamm B. *Microorganisms in Biorefineries*. 2015.
37. Mathias TR dos S, de Aguiar PF, Silva JB de A, de Mello PPM, Sérvulo EFC. Brewery Wastes Reuse for Protease Production by Lactic Acid Bacteria Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. 2017;55(2):218–224.
38. Pot B, Felis GE, Bruyne K De, Tsakalidou E, Papadimitriou K, Leisner J, Vandamme P. *The genus Lactobacillus*. 2014.
39. Singh O V., Harvey SP. Sustainable biotechnology: Sources of renewable energy. *Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy*. 2010;(November 2009):1–323.
40. Lee JW, In JH, Park JB, Shin J, Park JH, Sung BH, Sohn JH, Seo JH, Park JB, Kim SR, et al. Co-expression of two heterologous lactate dehydrogenases genes in *Kluyveromyces marxianus* for L-lactic acid production. *Journal of Biotechnology*. 2017;241:81–86.
41. Sauer M, Russmayer H, Grabherr R, Peterbauer CK, Marx H. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends in Biotechnology*. 2017;35(8):756–769.
42. Thapa LP, Lee SJ, Park C, Kim SW. Production of L-lactic acid from metabolically engineered strain of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. *Enzyme and Microbial Technology*. 2017;102:1–8.
43. Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;85(3):413–423.
44. Ma K, Hu G, Pan L, Wang Z, Zhou Y, Wang Y, Ruan Z, He M. Highly efficient production of optically pure L-lactic acid from corn stover hydrolysate by thermophilic *Bacillus coagulans*. *Bioresource Technology*. 2016;219:114–122.
45. Meussen BJ, De Graaff LH, Sanders JPM, Weusthuis RA. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;94(4):875–886.
46. Thitprasert S, Sooksai S, Thongchul N. In vivo regulation of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in *Rhizopus Oryzae* to improve L-lactic acid fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011;164(8):1305–1322.
47. Wee Y, Kim J, Ryu H. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44(2):163–172.
48. Dave KK, Punekar NS. Expression of Lactate Dehydrogenase in *Aspergillus niger* for L-Lactic Acid Production. 2015:1–17.
49. Turner TL, Zhang GC, Kim SR, Subramaniam V, Steffen D, Skory CD, Jang JY, Yu BJ, Jin YS. Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(19):8023–8033.
50. Chen Y, Nielsen J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016;37:165–172.
51. Gong J, Zheng H, Wu Z, Chen T, Zhao X. Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnology Advances*. 2009;27(6):996–1005.

52. Turner TL, Kim E, Hwang C, Zhang G-C, Liu J-J, Jin Y-S. Short communication: Conversion of lactose and whey into lactic acid by engineered yeast. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(1):124–128.
53. Zou H, Liu Z ying, Shi Y, Su Z qiang, Liu J guo. Isolation of lignocellulose-derived sugars, co-fermentation of lactic acid bacteria strains, and evaluation of L-lactic acid productivity. *BioResources*. 2017;12(4):7859–7872.
54. Mazzoli R, Bosco F, Mizrahi I, Bayer EA, Pessione E. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*. 2014;32(7):1216–1236.
55. Rouches E, Herpoël-Gimbert I, Steyer JP, Carrere H. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;59:179–198.
56. Loow YL, Wu TY, Jahim JM, Mohammad AW, Teoh WH. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*. 2016;23(3):1491–1520.
57. Hama S, Mizuno S, Kihara M, Tanaka T, Ogino C, Noda H, Kondo A. Production of d-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Bioresource Technology*. 2015;187:167–172.
58. Talukder MMR, Das P, Wu JC. Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid. *Biochemical Engineering Journal*. 2012;68:109–113.
59. Wan C, Li Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*. 2012;30(6):1447–1457.
60. Wakai S, Yoshie T, Asai-Nakashima N, Yamada R, Ogino C, Tsutsumi H, Hata Y, Kondo A. L-lactic acid production from starch by simultaneous saccharification and fermentation in a genetically engineered *Aspergillus oryzae* pure culture. *Bioresource Technology*. 2014;173:376–383.
61. Dreschke G, Probst M, Walter A, Pümpel T, Walde J, Insam H. Lactic acid and methane: Improved exploitation of biowaste potential. *Bioresource Technology*. 2015;176:47–55.
62. Mussatto S, Teixeira J. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *applied Microbiology an Microbial Biotechnology*. 2010;2:897–907.
63. Stanbury, PF. Whitaker, A. Hall SJ. Principles of fermentation technology. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013;53(9):1689–1699.
64. Phruksawan P, Kulpreecha S, Sooksai S, Thongchul N. Direct fermentation of L(+)-lactic acid from cassava pulp by solid state culture of *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012;35(8):1429–1436.
65. Gosset G. *Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources*. 2017.
66. Beitel SM, Coelho LF, Sass DC, Contiero J. Environmentally Friendly Production of D (–) Lactic Acid by *Sporolactobacillus nakayamae* : Investigation of Fermentation Parameters and Fed-Batch Strategies. 2017;2017.
67. Reddy LV, Kim YM, Yun JS, Ryu HW, Wee YJ. L-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Bioresource Technology*. 2016;209:187–194.

68. Wang Y, Meng H, Cai D, Wang B, Qin P, Wang Z, Tan T. Improvement of L-lactic acid productivity from sweet sorghum juice by repeated batch fermentation coupled with membrane separation. *Bioresource Technology*. 2016;211:291–297.
69. Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013;31(6):877–902.
70. Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015;119(1):10–18.
71. Oonkhanond B, Jonglertjunya W, Srimarut N, Bunpachart P, Tantinukul S, Nasongkla N, Sakdaronnarong C. Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocellulose fractionation, saccharification, fermentation, and ex-situ nanofiltration. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2017;5(3):2533–2541.
72. Klotz S, Kaufmann N, Kuenz A, Prüße U. Biotechnological production of enantiomerically pure d-lactic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(22):9423–9437.
73. Komesu A, Maciel MRW, Maciel Filho R. Separation and Purification Technologies for Lactic Acid—A Brief Review. *BioResources*. 2017;12(3):6885–6901.
74. Olson DG, McBride JE, Joe Shaw A, Lynd LR. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23(3):396–405.
75. Jackson E, López-Gallego F, Guisan JM, Betancor L. Enhanced stability of L-lactate dehydrogenase through immobilization engineering. *Process Biochemistry*. 2016;51(9):1248–1255.