

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR FERMENTACIÓN DE ALMIDÓN DE
ÑAME ESPINO MEDIANTE EL *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Y EL
Streptococcus thermophilus PARA SU USO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
POLILÁCTICO**

RONALD EDUARDO TEJADA TOVAR

Ingeniero de Alimentos



**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
CONVENIO UNIVERSIDAD DE CARATGENA – UNIVERSIDAD NACIONAL DE
COLOMBIA SEDE MEDELLIN
CARTAGENA DE INDIAS
OCTUBRE DE 2015**

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR FERMENTACIÓN DE ALMIDÓN DE
ÑAME ESPINO MEDIANTE EL *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Y EL
Streptococcus thermophilus PARA SU USO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
POLILÁCTICO**

RONALD EDUARDO TEJADA TOVAR

Ingeniero de Alimentos

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de Magister en
Ciencia y Tecnología de Alimentos**

LESLY TEJEDA BENITEZ. MSc PhD. Candidata

Directora del proyecto

CANDELARIA TEJADA TOVAR Msc.

Asesora



**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
CONVENIO UNIVERSIDAD DE CARATGENA – UNIVERSIDAD NACIONAL DE
COLOMBIA SEDE MEDELLIN
CARTAGENA DE INDIAS
OCTUBRE DE 2015**

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Medellín 10 de octubre de 2015

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi padre, Eduardo Rodolfo Tejada Mendoza, quien luchó con su trabajo constante para sacar nuestra humilde familia adelante y lograr que sus hijos tuvieran educación y una mejor calidad de vida y sé que desde el cielo aun nos sigue guiando y cuidando.

A mi Madre, Marina quien siempre me indujo a que estudiara y nunca desfalleció con su apoyo y cuidados a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, quienes siempre han estado presentes apoyándome en todas las etapas de mi vida.

A mi amada esposa Silvia, por su apoyo incondicional, paciencia y palabras de aliento y a mis dos tesoros Mariana Nahir y Manuel Eduardo quienes son el motor para seguir adelante.

Ronald Eduardo Tejada Tovar

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y a la Universidad de Cartagena por haber ofrecido esta Maestría en convenio en la Ciudad de Cartagena, Porque de esta manera me dieron la oportunidad de poder capacitarme a nivel de postgrado, lo cual redundará en el mejoramiento continuo de mi ejercicio profesional y me permitirá tener nuevas oportunidades de desempeño como ingeniero de alimentos e investigador.

A la Universidad de Cartagena por su apoyo en permitir el uso de los laboratorios de fisicoquímica y biotecnología de la Facultad de ingeniería y del programa ingeniería de alimentos.

A mi directora de tesis la doctora Lesly Tejeda Benitez, por su acertado apoyo y orientación

A los ingenieros Candelaria Tejada y Diofanor Acevedo por su asesoría permanente.

Al profesor José Hernández por su asesoría en el área de biotecnología

A mi colega Ángel Camacho quien fue un apoyo invaluable en el laboratorio

A la Fundación Juan Felipe Gómez Escobar por los espacios y el tiempo facilitado en el desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

	Pág.
1. OBJETIVOS.....	17
1.1 GENERAL	17
1.2 ESPECIFICOS	17
2. ALCANCE	18
3. MARCO DE REFERENCIA.....	19
3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN: ÁCIDO LACTICO, APLICACIONES Y POLIMERIZACION.	19
3.2 APL: OBTENCIÓN, APLICACIONES E INVESTIGACIONES REALIZADAS.	21
3.3 MARCO TEORICO	25
3.3.1 El ñame	25
3.3.2 Almidón.....	28
3.3.3 Caracterización del almidón	29
3.3.5 Microorganismos utilizados para fermentación láctica	32
3.4 ÁCIDO LÁCTICO	35
3.5 ÁCIDO POLILÁCTICO (APL)	38
3.5.4 Producción de APL.....	42
4. METODOLOGIA.....	43
4.1 TIPO DE INVESTIGACION.....	44
4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	44
4.3.1 Primera etapa: Obtención del almidón a partir de <i>D. rotundata</i>	44
4.3.2 Segunda etapa: Obtención de ácido láctico.	44
Tabla6. Variable respuesta en la obtención de ácido láctico	45
4.4 IMPLEMENTACION DEL MONTAJE EXPERIMENTAL	46
4.4.3 Evaluación de las condiciones de la fermentación láctica del almidón de ñame	47
4.4.5 Concentración del ácido láctico.....	48
4.4.6 Obtención del APL a partir de la polimerización del ácido láctico.....	49
4.4.7 Caracterización de materias primas, productos intermedios y producto final.....	50
5. ANALISIS Y DISCUSIONDE RESULTADOS	52

5.1	Obtención del Almidón	52
5.1.1	Evaluación de la calidad del almidón obtenido	54
5.2	Evaluación de las condiciones de la fermentación láctica del almidón de ñame	56
5.3	Obtención del APL a partir de la polimerización del ácido láctico por condensación al vacío con reflujo.	59
5.4	Resultados de la caracterización fisicoquímica.....	59
6.	CONCLUSIONES	64
7.	RECOMENDACIONES	66
8.	REFERENCIAS	67
	ANEXOS	79

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Ubicación Taxonómica del Ñame.	26
Tabla 2. Clasificación científica del <i>Lactobacillus Delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> .	32
Tabla 3. Clasificación científica del microorganismo <i>Streptococcus thermophilus</i> .	33
Tabla 4. Propiedades físico-químicas del ácido láctico.	36
Tabla 5. Variables independientes en la obtención del ácido láctico	45
Tabla 6. Variables dependientes en la obtención del ácido láctico	46
Tabla 7. Variables intervinientes en la obtención del ácido láctico	46
Tabla 8. Pruebas para la caracterización del almidón, el ácido láctico y el APL.	52
Tabla 9. Rendimiento del almidón obtenido.	53
Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de ñame.	54
Tabla 11. Conteo de Colonias (de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulbaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>).	55
Tabla 12. Análisis cualitativo de bandas presentes en el espectro de polímeros biodegradables.	60
Tabla 13. Longitudes de onda características del producto obtenido experimentalmente.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Tubérculo del ñame espino	27
Figura 2.	Estructura química del ácido láctico D (-) y ácido Láctico L (+)	36
Figura 3.	Estructura del APL basado en su quiralidad	37
Figura 4.	Montaje para la poli-condensación al vacío con reflujo	50
Figura 5.	Balance de materia para la obtención del almidón de ñame espino	52
Figura 6.	Producción de ácido láctico en términos de pH	56
Figura 7.	Porcentaje de producción de ácido láctico.	56
Figura 8.	Producción de ácido láctico para la polimerización.	57
Figura 9.	Seguimiento de la reacción de oligomerización por medio del valor ácido	58
Figura 10.	Producto de la etapa de policondensación al vacío.	59
Figura 11.	Espectro IR del producto obtenido experimentalmente.	60
Figura 12.	Resultados del análisis de calorimetría realizado al APL obtenido.	63

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1.	Ficha técnica del cultivo <i>Lactobacillus delbruecki</i> <i>issp. bulgaricus</i> y el <i>Streptococcus thermophilus</i>	79
Anexo 2.	Maquina procesadora de alimentos, Talleres productivos Fundación Juan Felipe Gómez Escobar.	80
Anexo 3.	Obtención del almidón de Ñame espino (<i>D. rotundata</i>)	81
Anexo 4.	Siembra de <i>Lactobacillus Delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> y el <i>Streptococcus thermophilus</i>	82
Anexo 5.	Condiciones de operación del proceso fermentativo	83
Anexo 6.	Preparación del medio de producción del almidón para la fermentación	83
Anexo 7.	Medición del pH inicial del Almidón de Ñame	84
Anexo 8.	Montaje utilizado para la concentración del ácido láctico por destilación	84
Anexo 9.	Oligomerización del ácido láctico por destilación al vacío	85
Anexo 10.	Prueba de lugol para determinar almidones	85
Anexo 11.	Conteo de colonias	86
Anexo 12.	Calculo del porcentaje de ácido láctico producido	87
Anexo 13A	Cromatograma del ácido láctico Obtenido en la etapa de fermentación	88
Anexo 13B	Cromatograma del ácido láctico concentrado.	89
Anexo 14.	Soportes del análisis de infrarrojo (IR)	90
Anexo 15.	Soportes del análisis de calorimetría	91
Anexo 16.	Certificado de ñame.de análisis fisicoquímicos y funcionales del almidón	92
Anexo 17.	Proceso fermentativo del Almidón.	93
Anexo 18.	Proceso fermentativo utilizado para la producción de ácido áctico e inóculo de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. Bulbaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .	93

LISTA DE ABREVIATURAS

APL	Ácido poliláctico
Da	Dalton
Dp	Policondensación directa
Ea	Energía de activación
Ed	Energía de desactivación
h	Horas
IR	Espectroscopia infrarroja
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KDa	Kilo Dalton
BAL	Bacterias ácido lácticas
mL	Mililitros
MRS	Man Rogosa y Shape
pH	Potencial de hidrogeno
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
ROP	Ruptura del anillo
ssp	Subespecie
Tc	Temperatura de cristalización
Tg	Temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue evaluar la producción de ácido láctico obtenido por la fermentación del almidón de ñame espino *Discorea rotundata* mediante la acción de la mezcla de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*, para su posible uso en la obtención de APL; estableciendo el proceso de obtención y caracterizando el producto obtenido mediante análisis de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales; a este se le realizó un seguimiento mediante la medición de pH como un indicador de la producción de ácido láctico como consecuencia del proceso fermentativo. El ácido láctico obtenido se sometió a polimerización por el método de policondensación al vacío, utilizando como catalizador cloruro de estaño II dihidratado en medio ácido. Seguida de su caracterización mediante análisis de espectroscopia infrarroja (IR). Se considera el ñame espino como una buena fuente de almidón porque en el proceso se obtuvo un rendimiento de 15.48%; comparándolo con otros autores; y apoyados en los resultados de su caracterización fisicoquímica y funcional. En la fermentación de este se obtuvo un ácido láctico de una concentración del 16.26% determinada por HPLC, considerando apropiado el almidón de ñame y los microorganismos utilizados para la obtención del ácido láctico. El tiempo de reacción de la policondensación se completó en 13 horas; al término del cual se le realizó un análisis IR al producto obtenido y en consecuencia de este, dada la ausencia de un pico característico en la longitud de onda del $\text{CH}_3\text{-CH}$ se descarta la posibilidad de considerar que el producto obtenido en la presente investigación fuera APL.

Palabras clave: Ácido láctico, ácido poliláctico, almidón de ñame, fermentación láctica.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the production of lactic acid obtained by fermenting starch yam hawthorn *Discorea rotundata* by the following action, the mixture of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*, for the possibility of obtaining APL; establishing the process of obtaining and characterizing the product obtained by analyzing their physicochemical and functional properties; this process will be tracked by measuring pH as an indicator of the production of lactic acid as a result of fermentation. The lactic acid obtained was subjected to polymerization by the method of polycondensation in vacuo, using as catalyst tin II chloride dihydrate in acidic medium. Followed by characterization using infrared spectroscopy analysis (IR). Yam hawthorn is considered a good source of starch because in the process performance of 15.48% was obtained; compared with other authors; and supported by the results of their physicochemical and functional characterization. In this fermentation of lactic acid a concentration of 16.26% was developed by the HPLC, suitable considering the yam starch and microorganisms used for obtaining lactic acid. The reaction time of polycondensation was completed in 13 hours; after which it underwent an IR analysis, and as a result of the product obtained, given the absence of a key characteristic in the wavelength of the CH₃-CH, the possibility of considering the product to be APL can be eliminated based on this investigation.

Key Words: Lactic Acid, Polylactic acid, starch Yam, Lactic fermentation

INTRODUCCIÓN

En el contexto actual en el que se ubica el planeta en lo relacionado con el medio ambiente y la continua acumulación de los residuos sólidos a medida que aumenta la industrialización y el consumo de polímeros derivados del petróleo, se genera un problema que afecta a todos de una u otra forma. Uno de los materiales remanentes más persistentes son los plásticos, que permanecen en la extensión terrestre prácticamente indestructibles por miles de años. Para contrarrestar esta situación se han desarrollado materiales con características similares a los polímeros, estos son los acreditados como biopolímeros de los cuales uno de los más destacados es el ácido poliláctico (APL) (Téllez, 2012).

La fabricación de ácido poliláctico ha tenido gran acrecentamiento en la última década, sobre todo porque es un polímero biodegradable con diversas aplicaciones industriales y médicas muy importantes. Este biopolímero se obtiene de la polimerización del ácido láctico monómero producido bio-tecnológicamente a partir de sustratos como glucosa, lactosa, almidón, y celulosa, que son de alto costo, lo que coloca el proceso en desventajas frente a otras fuentes de producción de biopolímeros y polímeros derivados del petróleo, sin embargo para disminuir costos de producción se han inducido nuevas investigaciones para encontrar fuentes y sustratos viables y más económicos. (Serna & Albán, 2011).

En esta investigación se muestra el Ñame espino (*Discorea rotundata*), como una opción viable para la producción de APL, ya que, es un tubérculo que está entre las especies de ñame que más concentra los gránulos de almidón (Pérez, 2013), el cual está constituido por la mezcla de dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina (González, 2012) y ambos están constituidos por módulos de glucosa, aspectos propicios para considerarlo como una importante fuente productora de ácido poliláctico a bajo costo.

En la actualidad ha cobrado gran importancia el crecimiento acelerado el uso de materiales biodegradable, ya que, el petróleo es un material limitado y además de difícil

biodegradabilidad, esto se pudo evidenciar en la edición de remar presentada por Guillemon, (2011), donde el consumo de APL fue alrededor de 60 mil toneladas y tan solo el 30% del ácido láctico es utilizado para tal fin. El productor más importante mundialmente es NatureWorks (Nebraska, EEUU) con un aproximado de 140 mil ton/año, este gran incremento es debido a la alta aplicabilidad que ha tenido este biopolímero en diferentes áreas industriales (Madhumala, Satyasri, Sankarshana & Sridhar, 2014).

En Colombia no hay ninguna industria dedicada a la producción de ácido poliláctico a pesar de la gran variedad de biodiversidad agrícola constituida de material amiláceo como papa, yuca, ñame, maíz, caña de azúcar, etc, que pueden servir como materia prima para la fabricación en masa de este producto. Algunos grupos de investigación colombianos han hecho estudios con buenos resultados, por ejemplo: La obtención de ácido poli L-láctico mediante policondensación con catalizadores de Zinc metálico (Estupiñán et al., 2007), pero ninguna de las propuestas ha tenido gran acogida debido a los elevados costos de producción y por los precios altos de la obtención de la materia prima. Sin embargo, existen productos como el ñame espino del cual se conoce que, en la región de la Costa Atlántica, se cultivan alrededor de 29.757 hectáreas, que involucran alrededor de 9.000 familias de pequeños productores, cuyo sistema de comercialización se caracteriza por bajos volúmenes, escasa infraestructura de acopio, transporte y almacenamiento y una reducida transformación, donde el 78% de la producción se dirige al mercado en fresco; en el año 2010, el primer productor de ñame en la costa Caribe Colombiana fue el departamento de Bolívar, con un área sembrada de 9.176 hectáreas y rendimiento promedio de 13.483 kg/ha, seguido por los departamentos de Córdoba y Sucre, con 10.066 y 2.845 ha y rendimientos de 9.672, 9.163 kg/ha respectivamente (Escudero & Higuera, 2010). Colombia posee la mayor tasa mundial de rendimiento en el cultivo de ñame. Características del proceso productivo como la calidad de la semilla, el tipo de siembra, el tipo de suelos y la existencia de variedades o clones, son determinantes para alcanzar un buen rendimiento. En el año 2011 en Colombia, se produjeron 395.374 ton de ñame (0.8% de la producción mundial) con un rendimiento de 28.3 t/ha (Acevedo et al, 2015).

El impacto social de esta investigación se verá reflejado en la propuesta de una alternativa viable de aprovechamiento del ñame espino en la producción de APL, con posibilidad en la industria de biopolímeros; esta alternativa permitiría el fortalecimiento del cultivo de una manera tecnificada. De igual forma, los beneficios generados en cuanto al cuidado del medio ambiente serían representativos, ya que con la producción de APL se disminuye la utilización de derivados del petróleo los cuales son de muy difícil biodegradabilidad.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de microbiología y de físico-química del programa de ingeniería de alimentos, adscritos a la facultad de ingeniería de la Universidad de Cartagena. El principal objetivo consistió en la obtención de ácido láctico producido por la fermentación del almidón de ñame espino, mediante la acción de la mezcla de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*, para su posible uso en la producción de APL; para lograr este propósito se evaluaron las mejores condiciones de la fermentación láctica del almidón de ñame, mediante la medición del pH, como un indicador del ácido producido por la acción de los microorganismos utilizados. Seguidamente se evaluó su conversión a APL por el método de policondensación al vacío, utilizando como catalizador cloruro de estaño II dihidratado en medio ácido. Seguida de su caracterización mediante análisis de espectroscopia infrarroja (IR).

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Evaluar la producción de ácido láctico obtenido por la fermentación del almidón de ñame espino *Discorea rotundata* mediante la acción de la mezcla de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*, para su posible uso en la obtención de APL.

1.2 ESPECIFICOS

- Establecer el proceso de obtención del almidón de ñame espino para su caracterización mediante análisis de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.
- Evaluar las condiciones de la fermentación láctica del almidón de ñame mediante la medición del pH en la solución de almidón, como un indicador del ácido producido por la acción de los microorganismos utilizados.
- Polimerizar el ácido láctico obtenido por el método de policondensación al vacío, utilizando como catalizador cloruro de estaño II dihidratado en medio ácido para la obtención del APL, caracterizandolo mediante análisis de espectroscopia infrarroja (IR) para la identificación sus grupos funcionales.

2. ALCANCE

El alcance de esta investigación se enmarca en cuatro direcciones; la primera es la obtención del almidón de ñame, con su respectiva caracterización físico-química; la segunda, consistió en la fermentación láctica del almidón de ñame obtenido con los microorganismos, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*, activados en un medio de cultivo específico, mediante el control diario de la variación de pH, para monitorear la producción de ácido láctico. En tercera instancia se concentró el ácido láctico producido por destilación y su caracterización por cromatografía líquida de gases de alta resolución y por último se por el método de policondensación al vacío se buscó polimerizar el ácido láctico, el producto obtenido se le realizó su respectiva caracterización por análisis infrarrojo (IR).

3. MARCO DE REFERENCIA

3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN: ÁCIDO LACTICO, APLICACIONES Y POLIMERIZACION.

El ácido láctico fue el primer ácido orgánico en ser producido a escala industrial en el año 1880 y desde entonces su demanda en forma monomérica se ha incrementado dramáticamente para la síntesis de APL (Joan et al., 2012; Mohamed et al., 2010; Harington y Hossain, 2008). El ácido láctico se produce naturalmente como 2 enantiómeros que resultan en 3 tipos de ácido láctico: dos isómeros ópticos, el D (-) ácido láctico, L (+) ácido láctico y su forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas D y L (Cuong et al., 2013).

El ácido láctico puede ser producido comercialmente a través de la fermentación microbiana o mediante síntesis química. La ventaja que radica en la síntesis de ácido láctico de manera biológica sobre el método químico, es que se obtiene un ácido láctico ópticamente puro (D y L), produciéndose por fermentación microbiológica usando bacterias ácido lácticas (BAL) (en condiciones de PH, temperatura y concentración de sustrato controladas), mientras que la síntesis química siempre se produce una mezcla de ácido láctico racémico. Otra ventaja importante sobre el método químico es el uso de materias primas baratas como desechos orgánicos ricos en almidón y polisacáridos sin almidón (pectina, celulosa y hemicelulosa) (Cuong et al., 2013; Wee y Kim, 2013; Abdel-Rahman et al., 2011). Actualmente aproximadamente el 90% del ácido láctico es producido vía fermentación microbiana, con el desarrollo de la bioconversión, la fermentación microbiana con el uso apropiado de microorganismo se ha vuelto el método dominante para la producción de ácido láctico debido a aspectos ambientales, bajas temperaturas de producción, bajos requerimientos de energía y alta pureza (Ying et al., 2015).

El mercado dominante en el consumo de ácido láctico es el de los alimentos y bebidas desde 1982; más del 50% del ácido láctico producido es usado como un agente

emulsificante en productos de panadería, es usado como acidulante, saborizante, inhibidor de deterioro bacteriano en una amplia variedad de alimentos procesados, como dulces, bebidas suaves, panes, sopas cervezas, sorbetes, mermeladas y jaleas, mayonesa, huevos procesados, preservativo natural, regulador de acidez en las comidas (Mirinal et al., 2014; Abdel-Rahman et al., 2013). También se emplea en formulaciones farmacéuticas como lociones, ungüentos, en la preparación de polímeros biodegradables para usos médicos como suturas quirúrgicas, prótesis y sistemas de dosificación controlada de fármacos, entre muchos otros usos. Versátiles aplicaciones en la industria que suscitan un incremento en la demanda de ácido láctico (Gopal et al., 2008; Mazzoli et al., 2014; Abdel-Rahman et al., 2013).

Gracias a las propiedades y amplio campo de aplicación del ácido láctico, y APL, desde su descubrimiento se han desarrollado investigaciones para desarrollar novedosos métodos de obtención, utilizando residuos agrícolas para ser empleados como sustratos en la fermentación láctica y a su vez abaratar costos de producción. A continuación se listan algunas de ellas:

Moon, Lee, Miyamoto y Kimura (2000), Sintetizaron el poli (ácido L-láctico) (PLLA) por policondensación en estado fundido de ácido L-láctico, para la optimización de las condiciones de reacción, analizaron diversos sistemas catalizadores a diferentes temperaturas; se descubrió que el cloruro de estaño (II) di hidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), como catalizador activado por diversos ácidos protónicos pueden producir APL de alto peso molecular en rangos aproximados ≥ 100.000 Da en un tiempo de reacción relativamente corto (≤ 15 h) en comparación con el $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solo, que producen APL con un peso molecular < 30.000 Da después de 20 h.

Pinzón, Martínez, Espinosa, Pérez y Narváez(2006) estudiaron las diferentes etapas que involucra la policondensación (oligomerización y polimerización) para obtener APL, la etapa de oligomerización se trabajó en un estrecho intervalo de temperatura, $100-150^\circ\text{C}$, donde el modelo cinético que describe la reacción es una ley de potencias de orden tres, para la etapa de polimerización, estudiaron la influencia de la temperatura, el porcentaje de catalizador ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y el tiempo de reacción, como variable de respuesta la

temperatura de transición vítrea. Las mejores condiciones para la primera etapa son periodos de reacción entre 6 y 8 h bajo vacío y temperatura de 150°C. La segunda etapa, la de polimerización, la reacción procede más rápido a mayor temperatura, además, se observó una dependencia compleja entre la concentración de catalizador y el tiempo de reacción; los mejores resultados se obtuvieron con 0,4% de catalizador, 12 h de reacción y 170°C, al igual que para 0,86% de catalizador, 16 h de reacción y 170°C.

Estupiñán et al, (2007), obtienen ácido poli L-láctico a partir de la policondensación de ácido láctico en presencia de un catalizador de Zinc metálico; bajo condiciones de vacío y atmósfera inerte. Durante este proceso se varió la concentración de Zn^{++} y el tiempo de polimerización para obtener muestras poliméricas con diferentes propiedades. Achmad, Yamane, Quan y Kokugan(2009), polimerizaron ácido láctico por policondensación en vacío, sin catalizadores, disolventes e iniciadores, el APL fue sintetizado en 3 operaciones: destilación, oligomerización y polimerización, el peso molecular máximo obtenido de APL fue de 90 KDa a 200 °C después de 89 h al vacío. Por encima de 200 °C, el APL es degradado por escisión específica; en cuanto a la energía de activación (E_a) de la policondensación directa (DP) se determinó que debe ser mayor a la requerida para la polimerización catalizada por la apertura del anillo (ROP), por otra parte, la E_a es mayor que la energía de desactivación (E_d), tanto para DP como para ROP. El rendimiento total de APL y lacturo fue de 52-75% en peso. El método DP no catalizado puede tener aplicaciones en plantas de producción donde se requiere compactación y procedimientos de operación simple.

3.2 APL: OBTENCIÓN, APLICACIONES E INVESTIGACIONES REALIZADAS.

El APL surge como una alternativa frente a los inconvenientes que presentan los polímeros sintetizados a base del petróleo gracias a que es un polímero biodegradable de gran versatilidad, el cual puede ser hecho a medida en diferentes grados de resina para su transformación en un amplio espectro de productos (Lasprilla et al., 2012). El APL es producido a partir del ácido láctico, un producto natural, obtenido por fermentación de fuentes renovables. El ácido láctico es un compuesto quiral que dependiendo de su origen puede ser el isómero D, el isómero L o una mezcla DL, por tanto el término "ácido poli-

láctico" se refiere a una familia de polímeros: poli-L-láctico (PLLA), poli-D-láctico (PDLA) y poli-D, L-ácido láctico (PDLLA) (Zuluaga, 2013; Cortes et al., 2014). Siendo el isómero L un metabolito biológico que constituye la fracción principal de APL derivado de fuentes renovables, ya que la mayoría de APL proveniente de recursos biológicos existe en esta forma (Tin, Rahmat & Wan, 2012).

El APL puede ser preparado por diferentes procesos de polimerización a partir de ácido láctico, incluyendo: policondensación, polimerización por apertura de anillo y por métodos directos como deshidratación azeotrópica y polimerización enzimática (Pivsa et al., 2013; Jhnonny et al., 2014), de las cuales la polimerización directa y la polimerización por apertura de anillo son las técnicas de producción más usadas. La polimerización por condensación es la ruta de síntesis de APL menos costosa, esta se lleva a cabo en tres etapas: remoción de agua libre, policondensación de los oligómeros y condensación fundida de APL con alto peso molecular y los solventes y/o catalizadores son usados en vacío para la remoción del agua que se produce, sin embargo en esta ruta de polimerización pueden ocurrir reacciones secundarias como la trans-esterificación, lo que resulta en la formación de estructuras de anillo en forma de lacturo influenciando negativamente sobre las propiedades del polímero final (Lasprilla et al., 2012; Auras et al., 2010). Por otra parte, la polimerización por apertura de anillo (ROP) es la ruta más común para lograr un alto peso molecular (Auras et al., 2010). Este proceso se produce por la apertura del anillo del ácido láctico dímero cíclico (lacturo) en presencia de un catalizador. El proceso consta de tres pasos: policondensación, depolimerización y la polimerización de apertura de anillo. Esta ruta requiere etapas adicionales de purificación que es relativamente complicado y caro (Lasprilla et al., 2012) (Araya, Rojas & Velázquez, 2010).

NatureWorks (Nebraska, United States) es el productor más importante a nivel mundial de APL, con un aproximado de 140 mil ton/año, este gran incremento es debido a la alta aplicabilidad que ha tenido este biopolímero en diferentes áreas industriales (Madhumala et al., 2014). Debido a su bio-compatibilidad, el poli (ácido L-láctico) posee gran importancia en diversas aplicaciones biomédicas, como lo son: sistemas de liberación controlada de fármacos, dispositivos de fijación bio-absorbibles, suturas, material de fijación de huesos y

de regeneración ósea (Nampoothiri, Nair & John, 2010; Bonilla, Ballesterro & Baudrit, 2012). También se emplea en la preparación de bio-plástico, útil para producir envases de relleno suelto, bolsas de compost, envases de alimentos y vajillas desechables. En la forma de fibras y de textiles no tejidos, el APL también tiene muchos usos potenciales, por ejemplo como: tapicería, prendas desechables, toldos, productos de higiene femenina y pañales (Nampoothiri, Nair & John, 2010).

Debido a que el APL posee excelentes propiedades mecánicas y fisicoquímicas, ser biodegradable y amigable con el medio ambiente, hoy día se llevan a cabo numerosas investigaciones en la síntesis de APL de alto peso molecular para diversas aplicaciones, empleando desechos agro industriales como materias primas, con la finalidad de darle uso a materiales que son inaprovechados y en algunos casos repercuten ambientalmente en su disposición al ser desechados. Algunas de estas investigaciones se centralizan en la búsqueda de nuevas fuentes y/o sustratos para la síntesis de APL vía fermentación láctica, otras en los mecanismos de polimerización del ácido láctico en virtud de mejorar sus propiedades mecánicas y peso molecular, a continuación se listan algunas de estas:

Pérez et al, (2013), describe la estructura y propiedades del almidón de ñame, como una fuente apropiada para su utilización en la industria alimenticia y para la elaboración de biopolímeros, ya que, presenta contenidos de amilosa entre 20-30 % y abundante longitud de cadenas de amilosa y amilopectinas, similares a la de otros materiales utilizados para tal fin como es el caso del almidón de yuca, papa y maíz; así como Iñiguez y Castillo (2011), realizaron la obtención de ácido láctico a partir del almidón de papa y lo proponen como materia prima para la fabricación de APL, utilizando el *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* como microorganismo fermentador.

Quintero et al, (2012), muestran la producción de ácido láctico vía fermentativa a partir de hidrolizado de harina de yuca, utilizando como cultivo el *Lactobacillus brevis*, y como sustrato fuentes renovables provenientes del sector agroindustrial, donde se consideran la evaluación de tres medios de cultivo: uno de alto contenido nutricional, uno de medio contenido nutricional, con glucosa como única fuente de carbono y un medio de cultivo de

bajo contenido nutricional, con jarabe de yuca como fuente de carbono. También se han evaluado otras materias primas para la producción de ácido láctico, como el lacto-suero suplementado, utilizando *Lactobacillus casei*, con muy buenos rendimientos (García, Arrazola & Villalba, 2013).

Cañas (2013) muestra la plastificación de APL mediante la mezcla con diferentes aceites obtenidos naturalmente con el fin de modificar las propiedades mecánicas del material y evaluar su rendimiento en probetas inyectadas y productos extruidos. Madhumala et al, (2014) demuestran una nueva forma de separación reactiva de ácido láctico mediante la utilización de una película nativa de zeolita hidrofóbica y H-beta/fluoruro de polivinilideno (PVDF) en membrana de matriz mixta; obteniendo rendimientos de 34%.

Medina et al, (2014), realizaron uno de los estudios más recientes, donde exponen la obtención de ácido láctico por fermentación del mosto del fruto de cují (*Prosopis juliflora*) y su posterior poli-condensación con Zinc metálico a APL. Con la utilización de *Lactobacillus bulgaricus*. Esto produce un rendimiento en ácido láctico de 13,93 %. La policondensación de ácido láctico, se logró en un tiempo de 24 h y con una concentración de catalizador 1% de Zinc metálico, se obtuvo un precipitado blanco que fue caracterizado por espectroscopia infrarrojo y por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Ponce y Guerrero (2014) desarrollaron diferentes materiales compuestos a base de un polímero biodegradable como el APL reforzado con fibras naturales de abacá mediante moldeo por compresión. Como resultado del estudio obtuvieron mejoras de hasta un 165 y 130 % en la resistencia a la tracción y módulo de elasticidad, respectivamente. Además, un incremento del 50 y 100% en la resistencia a la flexión y su módulo, respecto a la matriz de APL. Además, dieron los primeros pasos para desarrollar métodos de fabricación utilizando estos materiales. Arrieta (2014) desarrolló y caracterizó films biodegradables de APL con propiedades mejoradas para su aplicación en envasado de alimentos, evaluando el efecto de APL mediante la adición de dos concentraciones de D-limoneno estudiando las propiedades estructurales, térmicas, mecánicas, de barrera a oxígeno de estos materiales; obteniendo materiales flexibles debido a la reducción en la temperatura de transición vítrea.

La condensación y poli-condensación, llevada a cabo empleando catalizadores metálicos es una de las técnicas más utilizadas en la obtención de APL a partir de ácido láctico. No obstante lo anterior, Brown, Vázquez, Jacques, Alba y García (2012), proponen la obtención de biomateriales derivados de ácido láctico empleando métodos no convencionales; como la irradiación ultrasónica y de microondas. Los resultados alcanzados permitieron disminuir los tiempos de reacción sin el empleo de catalizadores metálicos, con rendimientos entre 85-90 %. Se obtuvieron dos productos cuyas masas moleculares superaron los 6.000 Da, caracterizados por FTIR, RMN y DSC. Se constató un comportamiento típico de la estructura de los poli-lactatos. Este último análisis demostró la correlación entre las temperaturas de fusión y transición vítrea registradas con la proporción de cristalinidad alcanzada para el producto final.

3.3 MARCO TEORICO

Muchos investigadores reportan variedad de materias primas para la obtención de ácido láctico y su posterior conversión a APL; entre estos se encuentran los desechos de piña, derivados de la caña de azúcar, batata fresca, residuos de cáscara de naranja, almidones de tubérculos, el fruto del cují, desechos agroindustriales del banano y fibras de abacá, entre otros. (Araya et al., 2010; Bello, 2007; Cuong et al 2013; Gil 2008; Hernández et al 2015; Bonilla 2012; Ponce2014)

3.3.1 El ñame

El ñame es el tercer tubérculo en importancia en el mundo, después de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz.) y la papa dulce (*Ipomoea batatas* L. Lam.) (Marcos et al., 2009). Pertenece a la familia *Dioscoreácea*, la cual incluye cinco géneros y comprende cerca de 750 especies. Está provisto de tubérculos subterráneos con contenidos de almidón de más del 30% (30 - 32% *Dioscorea alata* y 34- 38% *Dioscorea rotundata*); sus flores son unisexuales, actinomorfas y reunidas en racimos. Es una planta netamente tropical, que se desarrolla mejor con temperaturas entre 25 y 30°C y una precipitación superior a los 1.000 mm/año. Su período vegetativo toma entre 8 y 11 meses; requiere humedad durante los

cinco primeros meses de su desarrollo y necesita abundante luz para su mejor rendimiento en cultivo (Rodríguez, Ruiz, Guyot & Sánchez, 2005).

El ñame es un tubérculo que se ha utilizado en la industria en diversas aplicaciones, como la reportada por Salcedo, Montes, Zapata, Márquez y Díaz, (2010), para la producción de jarabes de fructosa con excelentes resultados, también se ha utilizado como estabilizante en la elaboración de yogur entero tipo batido. (Mendoza, Trujillo & Duran, 2007), en la elaboración de polvos para bebidas instantáneas. (Pacheco, Techeira & Garcia, 2008), entre muchos otros usos.

El ñame por su alto contenido de almidón puede ser una gran fuente para producir ácido láctico, el cual tiene un amplio rango de aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica, química, y cosmética, entre otras. Recientemente se ha acelerado la investigación en L(+) y D(-) ácido láctico por vía biotecnológica, debido a su posibilidad de transformación en APL. Los esfuerzos en la investigación del ácido láctico, están enfocados a disminuir los costes de producción a través de nuevos sustratos, nuevas tecnologías de fermentación y separación y nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades (Serna & Rodríguez, 2005). Según lo reportado por González (2012). Su ubicación taxonómica se muestra en la tabla número 1.

Tabla 1.Ubicación Taxonómica del Ñame.

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	<i>Dioscoreales</i>
Familia:	<i>Dioscoreaceae</i>
Género:	<i>Dioscorea</i>

La *Dioscorea rotundata* o ñame espino es también conocida como “ñame de Guinea”, es originaria de África del Oeste y, sin lugar a dudas, la especie más popular de ñame en África, especialmente en Nigeria y Ghana. Sus rendimientos oscilan entre 3.000 y 15.000 lb/acre. Se trata de una especie de tronco espinoso y redondo en corte transversal y con amplias hojas en forma de corazón. Los tubérculos son relativamente pequeños, de formas cilíndricas y poco numerosas. Su peso varía habitualmente de 2 a 5 kg; su superficie es lisa y marrón y su carne blanca y firme (Onyeka et al., 2006). Como se puede apreciar en la figura 1.



Figura 1. Tubérculo del ñame espino.

Fuente: Fotografía tomada por el autor región de los montes de María.

La planta de ñame tiene un sistema de raíces fibroso, la cual durante el período de almacenamiento, presenta puntos elevados semejantes a pústulas que van a dar origen a raíces. El tubérculo es una estructura del tallo y no de la raíz cuya función es el almacenamiento de gránulos de almidón. Los gránulos de almidón son redondeados o elípticos y algunas especies de ñame (*D. rotundata*) los concentran más que otras especies (*D. alata*). Además de almidones los tubérculos de ñame, dependiendo de la especie, tienen concentraciones de sustancias urticantes, de taninos, fenoles y otras sustancias como esteroides o corticoides (Tejeda et al., 2009).

El tubérculo llega a su madurez luego de 6 a 9 meses de cultivo y entra entonces en un periodo de letargo que demora entre 4 y 18 semanas, según la especie. Es durante este periodo de reposo que se pueden almacenar los ñames. El ñame espino tiene unas características particulares de pérdida durante el almacenamiento lo que limita este proceso

por mucho tiempo por lo que hay que utilizarlo en el menor tiempo posible luego de su recolección (Escudero & Higuera, 2010).

Uno de los mayores componentes de las raíces y tubérculos es el almidón, el cual constituye la mayor fuente energética de las plantas (Pérez, et al 2013), además es uno de los alimentos que más energía le suministran al cuerpo humano, ya sea en su consumo primario o en las diferentes presentaciones que hoy día se consiguen en el mercado, por otro lado los almidones gracias a su estructura han sido objeto de estudios y son utilizado industrialmente en diversos productos (Cortes et al., 2014).

3.3.2 Almidón

Los almidones están formados por gránulos de diferentes tamaños (diámetros entre 10 a 100 μm) y formas (redonda, elíptica, ovalada, lenticular o poligonal) dependiendo de la fuente biológica de donde provengan y son parcialmente semicristalinos e insolubles en agua a temperatura ambiente (Gonzalez, 2012).

Su contenido de amilosa y amilopectina, temperatura de gelatinización, consistencia del gel y textura, comportamiento viscoso y propiedades térmicas, permite su utilización en la industria alimenticia como estabilizante, agente de relleno, adhesivo, ligante, enturbiante, formador de películas, estabilizante de espumas, agente de antienviejamiento de pan, gelificante, glaseante, humectante y espesante (Singh et al., 2005).

El almidón constituye una excelente materia prima para modificar la textura y consistencia de los alimentos (Montes et al., 2008). Su funcionalidad depende del peso molecular promedio de la amilosa y la amilopectina, así como de la organización molecular de estos glucanos dentro del gránulo. Los almidones nativos o naturales se utilizan porque regulan y estabilizan la textura y son espesantes y gelificantes, pero frecuentemente no son los más adecuados para procesamientos específicos, ya que la estructura nativa del almidón puede ser poco eficiente debido a que las condiciones del proceso (por ejemplo: temperatura, pH y presión) limitan su uso en otras aplicaciones industriales, por la baja resistencia a esfuerzos de corte, baja descomposición térmica, alto nivel de retrogradación y sinéresis (Alvis et al., 2008).

Para obtener un almidón modificado con propiedades deseables para aplicaciones específicas, la modificación de los almidones se puede lograr cambiando una o varias de las siguientes características: temperatura de pasta, relación sólidos/viscosidad, resistencia de las pastas a cambios de viscosidad por ácidos, calor y/o agitación mecánica (cizallamiento), tendencia de retrogradación, carácter iónico e hidrofílico para proporcionarles propiedades especiales de espesamiento, gelificación, adhesión y/o formación de películas (González, 2012).

3.3.3 Caracterización del almidón

- **Identificación cualitativa:** Para realizar la identificación del almidón de ñame, se emplea la prueba de lugol (una disolución de yodo (I_2) y yoduro de potasio (KI), la cual al adicionar unas gotas de esta solución en la biomasa obtenida de cualquiera fuente se sospecha tenga almidón, esta debe tomar un color azul intenso, de modo que aplicar dicha disolución a un alimento es una prueba cualitativa para determinar si contiene almidón o no. A esta determinación se le denomina, habitualmente, prueba del yodo.

Esta reacción es el resultado de la formación de cadenas de poliyoduro generalmente (triyoduro, I_3^-) que se enlazan con el almidón en las hélices del polímero. En concreto, es la amilosa del almidón la que se une a las moléculas de yodo, formando un color azul oscuro, a veces prácticamente negro. La amilopectina reacciona muy poco con el yodo (Múnera, 2008)

- **Caracterización Química:** La composición proximal se determina de acuerdo a los métodos oficiales descritos por la AOAC (1997), comprendiendo los siguientes análisis: humedad (método 925.09), proteína cruda (método 954.01), grasa cruda (método 920.39), fibra cruda (método 962.09), cenizas (método 923.03) y carbohidratos totales como Extracto Libre de Nitrógeno (ELN). La determinación de amilosa y amilopectina se realiza con el método colorimétrico de Morrison y Laignelet (1983). El contenido de amilopectina se calcula por diferencia al 100% del contenido de amilosa mediante colorimetría. (Hernández, Torruco, Chel & Betancur, 2015).

- **Caracterización Funcional**

- **Gelatinización:** La temperatura de gelatinización se determina mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB), utilizando un equipo DSC, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/minuto, desde 30 a 120 °C. La Temperatura Inicial (Ti), Temperatura Pico (Tp), Temperatura Final (Tf) y la entalpía de gelatinización (ΔH) se obtienen del termograma resultante (Ruales & Nair, 1994).
- **Absorción de agua:** La capacidad de absorción de agua se determina por el método de Anderson (1969). Se prepararan 40 mL de una suspensión de almidón al 1% (b.s.), en agua destilada a 30 °C. Se calienta a una velocidad de 1,5 °C/minuto hasta alcanzar 60, 70, 80 ó 90 °C y se mantienen a esas temperaturas durante 30 minutos con agitación. Se dejan enfriar a temperatura ambiente y se centrifugan a 2.500 rpm (2.120 xg), durante 15 minutos, el gel resultante se pesa. La capacidad de absorción de agua para cada temperatura se calcula como el peso (g) del gel por gramos de muestra seca.
- **Solubilidad y poder de hinchamiento:** Los patrones de solubilidad y poder de hinchamiento de los almidones se determinan según una modificación del método original, realizada por Sathe y Salunkhe (1981).
- **Propiedades de pastificación:** Las propiedades de pastificación de los almidones se evalúan por el método de Wiesenborn (1994). En un vaso de precipitado de 500 mL, se preparan 400 mL de una suspensión de almidón al 6% (b.s.). La suspensión se coloca en un viscoamilógrafo Brabender PT-100. El equipo se opera a una velocidad de 1.5 °C/minuto, elevando la temperatura inicial de 30 °C hasta alcanzar 95 °C, y se mantiene esta temperatura durante 15 minutos. Por último, se desciende la temperatura

hasta 50 °C a una velocidad de 1.5 °C/minuto y se mantiene esta temperatura durante 15 minutos.

Existen diversos carbohidratos que pueden ser empleados como materia prima fermentable para la producción de ácido láctico y su posterior polimerización a APL, algunos de los azúcares fermentables que se utilizan son por ejemplo la glucosa, la galactosa, la lactosa, la melibiosa, la fructosa y la sacarosa. A nivel industrial, dichos carbohidratos fermentables son obtenidos a partir de cultivos tales como el maíz, el trigo, la caña de azúcar, el azúcar del betabel o el sorgo, para lograr esta transformación es necesario la utilización de algunas especies de microorganismos que dan lugar a la fermentación ácido láctica.

3.3.4 Fermentación láctica

La fermentación láctica es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. Este proceso lo realizan las bacterias ácido láctica, algunos hongos, algunos protozoos y en los tejidos animales. Las BAL son un grupo de bacterias gram positivas que fermentan hidratos de carbono convirtiéndolos en ácido láctico casi en su totalidad (homofermentativa) o a una mezcla de ácido láctico, dióxido de carbono y ácido acético y/o etanol (heterofermentativo), otros compuestos tales como diacetilo, acetaldehído y peróxido de hidrógeno, también se producen. Estos compuestos contribuyen al sabor y la textura de los alimentos fermentados y también pueden contribuir a la inhibición de BAL (Abdel-Rahman et al., 2011). En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*, sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Parra, 2010).

En la actualidad, muchos tipos de biomasa agrícola, como subproductos o cultivos ricos en hidratos de carbono se han convertido biológicamente en ácido láctico. Materias primas baratas como almidón, melaza y materiales celulósicos han sido utilizados para sustituir los azúcares puros en los procesos de producción de ácido láctico (Abdel-Rahman et al., 2011).

3.3.5 Microorganismos utilizados para fermentación láctica

Los microorganismos que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico, pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus* y *Aerococcus*. *Lactobacillus delbrueckii* es el microorganismo utilizado en la producción industrial, ya que tiene la ventaja de consumir eficientemente glucosa y ser un microorganismo termófilo con temperatura óptima de crecimiento en el rango de 45 a 62°C, lo que reduce costos de enfriamiento y esterilización (Serna & Rodríguez, 2005). El ácido láctico utilizado en la polimerización para la producción de APL debe ser de alta pureza (Araya, Rojas & Velázquez, 2010).

Los microorganismos *Lactobacillus Delbrueckii ssp. Bulgaricus* son homofermentativos anaerobios, facultativos, no móviles, no forman esporas y se pueden observar en forma de bastoncillos, al igual que otras bacterias son tolerantes a la acidez y poseen un metabolismo fermentativo estrictamente con ácido láctico D, como producto metabólico final importante. Crecen en un número restringido de hidratos de carbono, (Serna & Rodríguez, 2005). En la tabla 2 se presenta la clasificación científica del microorganismo

Tabla 2. Clasificación científica del *Lactobacillus Delbrueckii ssp. Bulgaricus*.

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
Reino:	Bacteria
División:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	<i>Lactobacillales</i>
Subespecie:	<i>Bulgaricus</i>
Gerero:	<i>Lactobacillus</i>
Especie:	<i>L. delbrueckii</i>
Familia:	<i>Lactobacilaceae</i>

Fuente:Serna y Rodríguez, 2005.

- **El microorganismo *Streptococcus thermophilus*.**

Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus* (nombre anterior *Streptococcus thermophilus*) es una bacteria gram-positiva y un anaerobio facultativo homofermentativo, del grupo viridans, que da resultados negativos para citocromo, oxidasa y marca catalasa positivo; para la actividad alfa hemolítica es inmóvil y no forma endosporas (Lick et al., 2015)

También se clasifica como una bacteria ácido láctico. *S. thermophilus* se encuentra en productos lácteos fermentados, y se utiliza generalmente en la producción de yogur, junto con *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Las dos especies son sinérgicos, y *S. thermophilus* probablemente proporciona L. *D. bulgaricus* con ácido fólico y ácido fórmico que se utiliza para la síntesis de purina (Serna & Rodríguez 2005), su clasificación se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación científica del microorganismo *Streptococcus thermophilus*.

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
Reino:	Bacteria
División:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	<i>Lactobacillales</i>
Subespecie:	<i>S.thermophilus</i>
Gerero:	<i>Streptococcus</i>
Especie:	<i>Salivarius</i>
Familia:	<i>Streptococcaceae</i>

Fuente:Serna & Rodríguez, 2005.

- **Interacción de los microorganismos *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*.**

Ambos microorganismos cooperan entre sí durante la fermentación y el crecimiento asociado que dan como resultado una acidificación acelerada; pero el mecanismo exacto todavía no está del todo entendido. Estudios moleculares y genómicos indican que el *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* está en proceso de reducción continua impulsada por la evolución humana. La edad de la selección de cepas adaptadas a la proteína en el medio rico de la leche lleva a la creación de cultivos naturales simbióticos como los del *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus* que se estimulan unos a otros para el crecimiento, cooperando y compensándose unos a otros metabólicamente. Hoy en día varios rasgos genéticos y bioquímicos son conocidos por ser responsable de la compleja interacción positiva entre estas dos especies bacterianas: el *S. thermophilus* degrada la urea en la leche y por consiguiente excreta CO₂ para de esta manera estimular el crecimiento del *Lactobacillus*, lo que se ve dificultado por la baja concentración de CO₂ en la leche después del tratamiento térmico, (Ozen & Ozilgen, 1991).

3.3.6 Sembrado y caracterización de los cultivos bacterianos

Para la fermentación de almidones en la producción de ácido láctico se han estudiado distintos tipos de microorganismos con diversas técnicas de crecimiento, mantenimiento y adaptación, en García,(2013) se activó el *Lactobacillus casei* ATCC 393 en 10 mL de caldo de Man, Rogosa y Shape (MRS) incubando a 37°C durante 24 h, periodo después del cual se tomó 1 mL y se agregó a 9 mL de caldo MRS e incubó a 37°C durante 6 h. Del caldo se tomó 1 mL y se realizaron siembras en profundidad en Agar MRS y se incubaron a 37°C durante 48 h. Se realizaron 3 repeticiones en cada etapa, luego se adaptó inoculando con 10 mL de *Lactobacillus casei* activado en 500 mL de lactosuero e incubando a 37°C durante 12 h.

Iñiguez y Castillo, (2011) utilizaron *Lactobacillus Delbrueckii* ssp *Bulgaricus*, la sembraron en agar nutritivo, para obtener el cultivo puro, luego la sembraron en matraces de 250 mL, para el conteo de las cepas, posteriormente evaluaron las condiciones de fermentación a distintas temperaturas e intervalos de tiempo de 3 días, reportan que las mejores condiciones son 19°C por 15 días.

Medina et al, (2014) reportaron que para la preparación del medio de cultivo de la bacteria *Lactobacillus bulgaricus*, se colocaron en matraz de 2.000 mL cantidades adecuadas de los reactivos Mezcla de peptona, extracto de levadura, glucosa, Tween 80, agar, luego se disolvieron en un 1 litro de agua destilada para cada medio (líquido y sólido). Estos medios (MRS: medio de cultivo selectivo) fueron agregados en 20 botellas de 50 mL, las cuales fueron tapadas con algodón y gasa, para su esterilización, en el autoclave Chamberland a una presión de 15 psi y a una temperatura de 121 °C por 15 min, luego se sacaron las botellas y se dejaron reposar para ser utilizadas en el aislamiento de bacterias productoras de ácido láctico. A partir del yogurt comercial (yoka). Se realizaron diluciones sucesivas de 10^{-1} a 10^{-3} sembradas en placas de petri en condiciones de esterilización; bajo campana y mechero Bushne. Se inoculó por agotamiento y se incubó a temperatura de 24 y 26°C en una estufa marca Felisa por 48 h. Luego, se evaluó el crecimiento de las cepas bacterianas en el microscopio de luz marca Zeiss Axioskop. La purificación de las bacterias se realizó repicando en tubos con el medio de cultivo MRS por 48 horas. Se evaluaron las características microscópicas (a través de formas), y las características bioquímicas fueron realizadas en un laboratorio clínico.

Quintero et al, (2012), utilizaron *Lactobacillus brevis* y como medio de cultivo caldo y agar MRS, a 38°C por 24 h, luego realiza inoculaciones sucesivas cada tercer día, en nuevo caldo MRS, posteriormente se utiliza un medio de adaptación y por último pasa al medio de producción y se incuba a 48°C durante 24 horas.

3.4 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico), tiene un carbono asimétrico el cual da lugar a actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D(-) Láctico y L(+) Láctico (Serna & Rodríguez, 2005). Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas, de los que se pueden obtener polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición, los isómeros L(+) son los que representan mejores características en procesos posteriores de obtención de biopolímeros. En la tabla 4 se relacionan las propiedades físico-químicas del ácido láctico, en la figura 2 y figura 3 se muestra la estructura química

del ácido láctico (isómero D y L), y el mecanismo de reacción para obtener APL, respectivamente.

Tabla 4. Propiedades físico-químicas del ácido láctico.

REFERENCIA	DESCRIPCIÓN
Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08
Índice de refracción	1,4414
Punto de fusión	L(+) y D(-): 52.8 a54°C. DL (según composición): 16.8 a33°C
Punto de ebullición	125-140°C
Gravedad especifica	1206
Calor de combustión	3.616cal/g
Viscosidad	40.33mNsm ⁻²
Densidad	1,249
Constante dieléctrica	22ε

Fuente: Tomado de Gil, Domínguez & pachó, 2008.

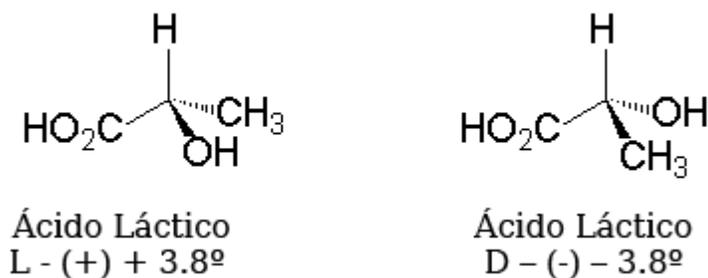


Figura 2. Estructura química del ácido láctico D (-) y ácido Láctico L (+).

Fuente: Del Ángel (2007)

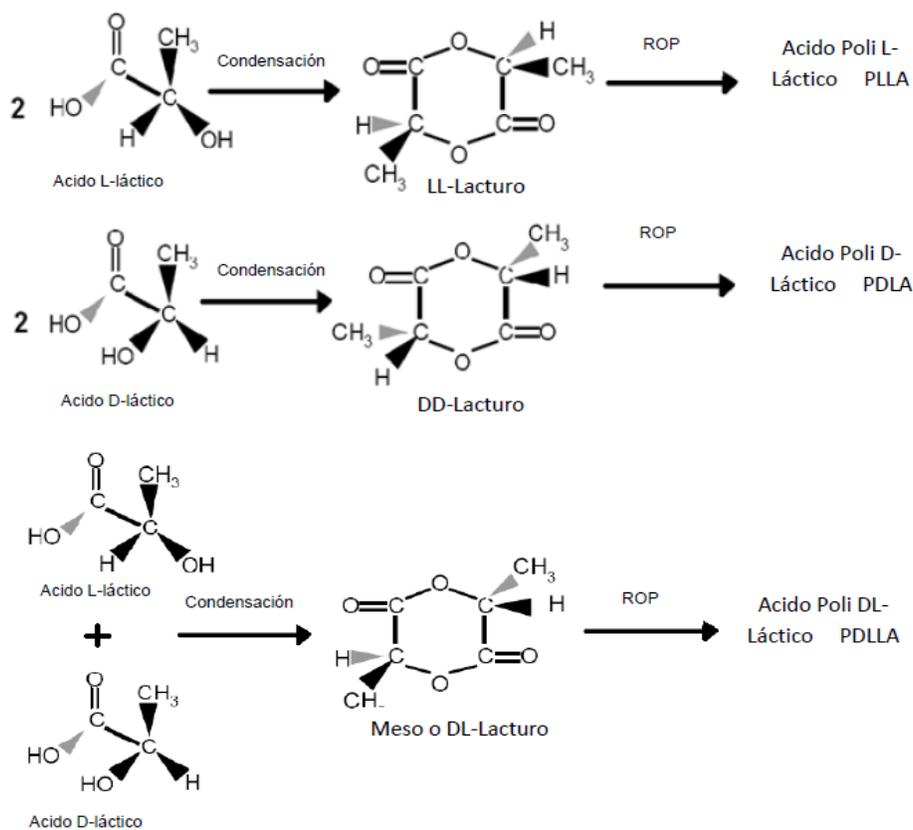


Figura 3. Estructura del APL basado en su quiralidad.

Fuente: Tomado de Castro y Vera (2012)

La reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lacto-nitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico; o la reacción de alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador (Chang, Jung, Rhee & Pan, 1999), son mecanismos para obtener ácido láctico por vía química y su fórmula molecular es $C_3H_6O_3$.

El ácido láctico es ampliamente utilizado en las industrias alimentarias, médicas, farmacéuticas y cosméticas, como materia prima para síntesis orgánica, como purgante en forma de lactato de calcio o lactato de magnesio, como removedor de sales de calcio, en el curtido de pieles, en la producción de plásticos biodegradables, agroquímicos, etc. En soluciones acuosas, el ácido láctico no ionizado existe en equilibrio con los aniones lactato y los iones hidrógeno (Gilet al., 2008). Es fuertemente higroscópico y la

presencia de dos grupos funcionales en su estructura (-OH, -COOH) lo hace formar, espontáneamente, dímeros y polímeros de ácido láctico (Bello, 2007). Es soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter del petróleo y disulfuro de carbono. Sus dos grupos funcionales permiten llevar a cabo diferentes reacciones químicas de oxidación, reducción, condensación y sustitución del grupo alcohol (Vaidya et al., 2005).

El ácido láctico es uno de los compuestos químicos con mayor demanda a nivel mundial (130-150 mil TM/año) por tener gran aplicabilidad en la industria alimentaria, química y farmacéutica (Núñez et al., 2009). El interés en la producción biotecnológica de ácido láctico ha incrementado debido a las nuevas tendencias ambientalistas. Por un lado, ofrece una alternativa a la contaminación causada por las industrias químicas al utilizar recursos renovables para su producción y por otro, puede ser utilizado como materia prima para la producción de plásticos biodegradables (Araya et al., 2010).

Los factores limitantes en la producción de ácido láctico por la vía fermentativa son principalmente, la baja concentración de bacterias lácticas en el sistema y la inhibición del crecimiento por el producto (Prada et al., 2012). Las bacterias lácticas están conformadas por un amplio grupo de bacterias no esporuladas, gram positivas y que metabolizan un amplio rango de azúcares para producir principalmente ácido láctico (Gil et al., 2008).

3.5 ÁCIDO POLILÁCTICO (APL)

El APL es un polímero biodegradable derivado del ácido láctico que se produce a partir de fuentes 100% renovables. Este polímero presenta muchas propiedades iguales o incluso mejores que algunos plásticos tradicionales, por lo que representa una alternativa como material de empaque bastante innovadora y prometedora (Joaqui & Villada, 2013). Debido a su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad, éste biopolímero ha encontrado numerosas aplicaciones ya que presenta un amplio rango inusual de propiedades, desde el estado amorfo hasta el estado cristalino; propiedades que

pueden lograrse manipulando las mezclas entre los isómeros D (-) y L (+), los pesos moleculares, y la copolimerización.

El APL es un biopolímero termoplástico utilizado para la producción de hilo para sutura, implantes, cápsulas para la liberación lenta de fármacos, prótesis, producción de envases y empaques para alimentos y producción de películas para la protección de cultivos en estadios primarios (Serna & Rodríguez, 2007). El APL es un poliéster termoplástico que forma parte de los α -hidroxi-ácidos; su precursor es el ácido láctico, molécula quiral. El láctico monómero del APL es una molécula que existe bajo 4 formas: L, D, meso y racémica, (Cortes, Fernández, Mosquera & Velasco, 2014), Los polímeros basados en ácido láctico, pueden manufacturarse en diferentes rutas de polimerización, la primera ruta incluye una policondensación del ácido láctico, seguido por una despolimerización hacia el dímero diláctido, el cual puede polimerizarse abriendo el anillo, en polímeros de alto peso molecular.

En la segunda ruta, el ácido láctico es policondensado en presencia de un monómero difuncional, por ejemplo diol o diácido, produciendo un polímero telequérico, el cual puede unirse a otro para producir polímeros de alto peso molecular. En la tercera ruta el ácido láctico es policondensado directamente en polímeros de alto peso molecular, manipulando el equilibrio entre: ácido láctico, agua y APL en un solvente orgánico (Araya et al., 2010). Las reacciones de policondesación que se dan en las tres rutas de síntesis, se producen por simple calentamiento o por la acción de catalizadores como alcóxidos metálicos y complejos quirales de aluminio metoxilado (Brown et al., 2012).

3.5.1 Propiedades físicas y mecánicas del APL

Las propiedades físicas y mecánicas, farmacéuticas y de reabsorción dependen de la composición del polímero, de su peso molecular y de su cristalinidad, la cual puede ajustarse desde un valor de 0 a 40% en forma de homopolímeros lineales o ramificados, y como copolímeros al azar o de bloque. (Joaqui & Villada, 2013) Una forma cristalina (en su mayor parte compuesta de forma L-láctido) y de alto peso molecular (> 100.000 Daltons) garantiza una reabsorción larga (aproximadamente de 1 a 2 años). Formulaciones

diferentes y la adición de radicales en las cadenas, permiten controlar o modelar la velocidad de reabsorción.

Utilizando 100% de L-APL, resulta un material con alto punto de fusión y alta cristalinidad; si se usa una mezcla D y L, se obtiene un polímero amorfo con una temperatura de transición vítrea (T_g) de 60°C. Con 90% D y 10% L, se obtiene un material copolimérico, el cual puede polimerizarse en forma orientada, con temperaturas por encima de su temperatura de transición vítrea. La temperatura de procesamiento está entre 60 y 125°C y depende de la proporción de D o L ácido láctico en el polímero. Sin embargo el APL puede ser plastificado con su monómero o alternativamente con ácido láctico oligomérico y esto permite disminuir T_g . (Weber, 2000)

El APL tiene propiedades mecánicas en el mismo rango de los polímeros petroquímicos, a excepción de una baja elongación. Sin embargo esta propiedad puede ser afinada durante la polimerización (por copolimerización) o por modificaciones post polimerización (por ejemplo plastificantes). Otras limitaciones del APL, comparado con otros empaques plásticos, es la baja temperatura de distorsión; esto puede ser un problema en aplicaciones donde el material de empaque es expuesto a picos de calentamiento durante el llenado, transporte o almacenamiento y puede finalmente deformarse. (Fuentes, Díaz & Perilla, 2006).

Cuando el APL está por encima de su temperatura de transición vítrea, $T_g \approx 58$ °C, es elástico, mientras que cuando está por debajo de $T_g \approx 45$ °C, se comporta como un polímero frágil. En comparación con otros termoplásticos, el APL tiene T_g elevada y temperatura de fusión (T_m) baja. La T_g del APL depende tanto del peso molecular como de la pureza óptica del polímero (Castro & Vera, 2012).

3.5.2 Caracterización y análisis del APL

Según lo propuesto por Jiménez et al, (2012) la caracterización del APL se realiza por:

- **Espectroscopia infrarroja:** Se utiliza espectro infrarrojo del producto en un espectrómetro FTIR Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, según la norma ASTM E 1252–98, en fase de bromuro de potasio (KBr), con este análisis se identifica el compuesto a investigar, en función de sus grupos funcionales.
- **Termogravimetría:** Se realiza un análisis termogravimétrico, en un TGA marca TA Instrument, modelo 500 según la norma ASTM E–1131–03, mediante un barrido desde los 25°C hasta los 500°C, con una rapidez de calentamiento de 10°C·min⁻¹ y una atmósfera inerte con un flujo de gas de nitrógeno de 20 mL·min⁻¹, este análisis se usa para estudios de composicionales, descomposición térmica, determinación de humedad, cenizas, entre otros.
- **Calorimetría diferencial de barrido:** La muestra se analiza en un calorímetro Perkin Elmer DSC6, mediante la norma ASTM E–3418–99, en atmósfera de nitrógeno, con una velocidad de calentamiento de 25°C·min⁻¹, en un intervalo de temperaturas de 49 y 250°C, con esta técnica se conoce la temperatura de fusión, la temperatura de cristalización, así como temperaturas de transiciones vítreas.

3.5.3 Biodegradabilidad del APL

La degradación del APL es más lenta si la cristalinidad es elevada, si el contenido de L-APL es fuerte y si el peso molecular es elevado (Velero, Ortegon & Uscategui, 2013). En presencia de APL, los microorganismos (hongos y bacterias) colonizan la superficie del polímero y son capaces de segregar enzimas que rompen en pequeños fragmentos el polímero; la colonización de la superficie depende de factores tales como la tensión superficial, porosidad y textura superficial y accesibilidad a las cadenas de polímeros. Los grupos hidrófilos de las enzimas (-COOH, -OH, -NH) atacan los grupos éster de las dos cadenas de polímeros mediante reacciones de hidrólisis seguida por reacciones de oxidación, de esta forma reducen el polímero a fragmentos de peso molecular inferiores a 500g/mol, los cuales pueden ser digeridos por los microorganismos (Pacheco, Flores & Rodríguez, 2014).

Las reacciones enzimáticas ocurren generalmente en medio acuoso. Las condiciones necesarias para que se pueda producir el proceso de biodegradación son: Presencia de microorganismos, oxígeno, humedad, nutrientes minerales, temperaturas entre 20 a 60°C dependiendo del microorganismo y pH entre 5 y 8 (Leja y Lewandoswics, 2010).

3.5.4 Producción de APL

Estupiñán et al, (2007) demuestran la obtención de ácido poli l-láctico mediante la policondensación con catalizador de Zinc metálico, bajo condiciones de vacío y atmósfera inerte. Durante este proceso se varía la concentración de Zn^{++} y el tiempo de polimerización para obtener muestras poliméricas con diferentes propiedades. El recubrimiento polimérico, se logra a partir de un método de electrodeposición catódica. El material obtenido es APL y su preparación con un iniciador de Zinc metálico, promoviendo la migración y formación de grupos catiónicos que lograron neutralizarse y coagularse sobre la superficie.

Aunque los métodos descritos anteriormente son muy utilizados y además muy eficientes, Brown et al, (2012), muestran nuevos métodos para la síntesis de APL empleando irradiación ultrasónica y de microondas. Los resultados alcanzados permitieron disminuir los tiempos de reacción sin el empleo de catalizadores metálicos, con rendimientos entre 85-90 %, sin embargo estos resultados sugieren la necesidad de perfeccionar el método de separación, concentración y purificación para el ácido láctico(D-) producido por fermentación mediante el uso de fuentes renovables de energía como los carbohidratos.

- **Policondensación.**

Para Medina et al, (2014) la policondensación del ácido láctico se logra en un balón de fondo redondo, con 100 mL de ácido láctico obtenido de la fermentación, conectado a un condensador y un termómetro. Se agrega zinc al ácido láctico y se elimina el agua de la solución mediante calentamiento. Se aumenta la temperatura gradualmente a una velocidad de $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al llegar a esta condición se adecua el montaje para imprimirle vacío. Se reduce gradualmente la presión hasta 100 mmHg y se mantiene la reacción hasta que el agua se presente nuevamente, momento en el cual la presión del sistema se lleva hasta 25 mmHg y se continua con estas condiciones durante el tiempo de reacción de 24 horas. Luego se retira el balón y se envasa el producto para dejarlo enfriar.

En la polimerización por condensación, la reacción toma lugar entre dos moléculas polifuncionales para producir una gran molécula polifuncional con posible eliminación de pequeñas moléculas como el agua (Del Ángel, 2007).

La policondensación de ácido láctico se realiza, por lo general, en masa por destilación del agua de condensación, con o sin catalizador, mientras el vacío y la temperatura aumentan de forma progresiva. Aunque los poliésteres de alto peso molecular y buenas propiedades mecánicas son difíciles de obtener, las propiedades de los oligómeros de ácido láctico pueden ser controladas por el uso de diferentes catalizadores y agentes de funcionalización, o por la variación de las condiciones de polimerización. Este enfoque fue desarrollado por Carothers y es todavía utilizado por Mitsui Chemicals Inc. Toatsu para la fabricación de un polímero de bajo a intermedio peso molecular (Mehta, 2006); la mayor desventaja de esta técnica de síntesis es que no produce APL de alto peso molecular, debido a su complicación en la eliminación de impurezas y agua. Otras desventajas de esta técnica son la necesidad de grandes reactores, evaporación, recuperación de disolventes y el aumento de racemización (Singh, 2008).

4. METODOLOGIA

El componente experimental de la presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones de los laboratorios del programa de ingeniería de alimentos de la Universidad de Cartagena. Este proyecto se desarrolló en tres etapas; la primera consistió en la obtención del almidón a partir de *D rotundata* (ñame espino); en la segunda etapa se llevó a cabo la fermentación del almidón de ñame, para la obtención del ácido láctico mediante el uso de los microorganismos *Lactobacillus Delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*, ver anexo 1 (Ficha técnica del microorganismo), por último y como tercera etapa, se procedió a obtener el APL por el método de condensación, utilizando como catalizador cloruro de estaño di-hidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); con su respectiva caracterización.

4.1 TIPO DE INVESTIGACION

Para el cumplimiento de los objetivos planteados se llevó a cabo una investigación cuantitativa exploratoria de tipo experimental, tanto para la fermentación del almidón, como para la posterior obtención de ácido láctico a partir de *D. rotundata*, igualmente porque se cuantificó la variación de pH a lo largo de todo el proceso de fermentación y se cuantificó la producción de ácido láctico, en mg L⁻¹.

4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Primera etapa: Obtención del almidón a partir de *D. rotundata*.

Para obtener el almidón se utilizó el método descrito en (Salcedo M et al, 2010), se realizó una extracción de forma manual, pesando 5.2 kg el ñame fresco sin procesar, y posteriormente se lavó, se secó y se peló, a los tubérculos se les retiró la epidermis con el fin de dejar la pulpa expuesta para liberar los gránulos de almidón contenidos en las células del parénquima mediante el rallado, el cual se practicó en seco con una máquina ralladora SKYMSEN modelo PA-7LE de metalúrgica Siemens Ltda. De origen Brasileño (Ver Anexo 2) . La masa rallada se suspendió en una solución de amoníaco (0,03M) durante cinco minutos con el objetivo de retirar los mucílago y facilitar la operación de tamizado. Se procedió al tamizado en un lienzo de tela de nylon; la sedimentación se efectuó en un tanque plástico con volumen de 20 litros durante 24 horas y se mantuvo en refrigeración a 5 °C, luego se retiró el sobrenadante y el almidón se volvió a suspender en agua con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de impurezas, el almidón se extendió sobre una lata de aluminio, y se sometió a secado en un horno a 140 °C por 45 min, para obtener un secado adecuado. En el anexo 3 se describe paso a paso este procedimiento.

4.3.2 Segunda etapa: Obtención de ácido láctico.

Para la obtención del ácido láctico, se procedió a realizar la fermentación del almidón de ñame mediante la inoculación del cultivo obtenido previamente (en el apartado 4.5.1 se describe como realizó la inoculación del cultivo) y se realizó el proceso de fermentación, evaluado el pH, a intervalos de tiempo definidos cada 24 h, hasta alcanzar las 144 h; simultáneamente se tomaron muestras para medir la cantidad de ácido láctico producido por

cromatografía de alta resolución (HPLC). Las variables del proceso de fermentación se detallan en las tablas 5, 6 y 7.

Tabla 5. Variable independiente en la obtención de ácido láctico

Variables Independientes	Definición	Unidades	Valores
Tiempo de fermentación	Lapso necesario para que se lleve a cabo la fermentación	h	24 x 6

Fuente: Elaborada en el presente estudio

Tabla6. Variable respuesta en la obtención de ácido láctico

Variables dependientes	Definición	Unidades
Cantidad de ácido láctico	Ácido láctico presente en la solución obtenida después de la fermentación	H ⁺ pH mg L ⁻¹

Fuente: Elaborada en el presente estudio

Tabla 7. Variables intervinientes en la obtención de ácido láctico.

Variables independientes	Definición	Unidades	Valores
Concentración de Almidón	Cantidad de almidón requerido para realizar la fermentación	g L ⁻¹	0,1
Concentración del microorganismo	Cantidad de microorganismo requerido para realizar la fermentación	Ufc g ⁻¹	20x10 ¹⁰

Temperatura	Medida de la energía térmica durante el proceso	°C	37
-------------	---	----	----

Fuente: Elaborada en el presente estudio

4.3.3 Tercera etapa: Obtención del APL

Siguiendo lo propuesto por Estupiñán et al, (2007), Medina et al, (2014) y Moon et al., (2000), para la poli-condensación del ácido láctico se empleó un balón de fondo plano, con 200 mL de ácido láctico obtenido de la fermentación (en el apartado siguiente se explica detalladamente el proceso de fermentación), conectado a un condensador con el fin de eliminar agua del sistema durante las 2 primeras horas, luego se le imprime vacío y se controla la presión gradualmente desde 5 in Hg hasta 25 in Hg, de esta forma se convierte el ácido láctico en oligómero, luego se montó un sistema de destilación al vacío con sistema de reflujo, se agregó cloruro de estaño (II) dihidratado + un ácido protónico (ácido bórico) en una proporción molar 1:1. Se aumentó la temperatura hasta 180 °C, utilizando inmersión del balón aforado en aceite, y se controló la presión en 25 in Hg durante el tiempo de reacción de 15 horas, al finalizar el proceso se retiró el balón y se envaso para dejarlo enfriar y retirar el producto obtenido con la utilización de solventes.

4.4 IMPLEMENTACION DEL MONTAJE EXPERIMENTAL

4.4.1 Siembra, características y especificaciones de los microorganismos utilizados.

Para realizar el proceso fermentativo se utilizó una mezcla de cultivos liofilizados de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, marca SACCO suministrado por una empresa de lácteos de la ciudad de Cartagena, los cuales se mantuvieron congelados a -18 °C para garantizar su calidad.

Para la activación de los microorganismos se tomó el método descrito por García et al, (2013) modificando las cantidades de caldo utilizado y la concentración de inóculo; 0.5 g de cultivo y se activaron en 50 mL de caldo MRS incubando a 37°C durante 24 h, periodo después del cual se tomó 1 mL y se agregó a 49 mL de caldo MRS e incubó a la misma temperatura durante 6 h, del caldo se tomó 1 mL y se realizaron 10 diluciones seriadas por duplicado desde 1 hasta 1×10^{-9} , luego se utilizó el método descrito por López y Torres,

(2006), para el crecimiento de las bacterias en cajas de petri y su posterior conteo, se realizó mediante la utilización de la técnica de extensión en placa, se pipetea la muestra asepticamente sobre el medio MRS agarizado y se esterilizó el asa de Digralsky introduciéndolo en alcohol, flameando y enfriando, el asa estéril se usó para esparcir la suspensión sobre la superficie del medio, se incubaron a 37°C durante 48 h como se muestra en el anexo 4; con el fin de realizar el conteo de las colonias y garantizar un crecimiento adecuado del cultivo durante la etapa de fermentación.

4.4.2 Recuento de colonias en placa

Siguiendo lo descrito por López y Torres, (2006), luego de transcurrido las 48 h se prosiguió a realizar una observación de las placas en busca de efectos de inhibición, posteriormente se realizó el recuento de los microorganismos presentes en la muestra en una cuenta colonias, para contabilizar adecuadamente las colonias, se escogen las placas que muestren entre 30 y 300 colonias, los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo (Ufc g⁻¹), donde:

$$\text{Ufc g}^{-1} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias en placa (entre 30 y 300) } \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

4.4.3 Evaluación de las condiciones de la fermentación láctica del almidón de ñame

Siguiendo lo propuesto por Iñiguez y Castillo (2011), se fijaron los valores de las variables, tal como se muestra en el anexo 5.

Se prepararon 6 medios de producción utilizando las concentraciones empleadas por Feoli, Escobar y Marín (1995). Se tomaron 10 g de almidón de ñame y se diluyeron en 100 mL de agua destilada, para lograr una correcta homogenización se utilizó un equipo Ultra-Turrax (IKA-T10 basic), como se muestra en el anexo 6.

Seguidamente con la ayuda de una pipeta de 10 mL se depositó la solución en frascos microbiológicos, los cuales fueron esterilizados en el autoclave (ALL-AMERICAN 25 X-1) a 15 psi y 121 °C por 15 min, se dejó reposar y se trasladó a la cámara de flujo laminar (Dies, Segura –BS100), para adicionar los 10 mL del cultivo de *Lactobacillus delbrueckii*

ssp bulgaricus y *Streptococcus thermophilus*, a una concentración de 2.5% de inóculo, sin suministrarle un medio nutritivo adicional (Iñiguez y Castillo 2011, Acuña 2012), cada frasco se marcó y dispuso en la incubadora (Esco – Isotherm) a 37°C.

Por último a cada muestra se le realizó medición de pH inicial, el cual se encontraba en un rango de 6 ± 0.1 como se observa en el anexo 7, seguidamente se realizaron mediciones a cada muestra cada 24 h, hasta alcanzar 144 horas. Una vez realizada la medición se calculó el porcentaje de ácido láctico, tomando como guía lo descrito por Medina et al, (2014), donde el porcentaje de ácido láctico se determina a las 6 muestras, mediante la titulación de 1 mL de muestra fermentada con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N, empleando fenolftaleína como indicador hasta obtener un ligero color rosa.

4.4.4 Producción de ácido láctico

Después de conocer las mejores condiciones de fermentación se determinó el tiempo a la que se da la mayor producción de ácido láctico, con lo que se procedió a realizar el proceso de producción, en un matraz se preparó la solución de producción utilizando 1.000 mL de la solución de almidón con 2.5% del cultivo bacteriano, luego se colocó a las mismas condiciones descritas en la evaluación de fermentación, manteniendo la temperatura en 37°C, pH de 6 ± 0.1 , se calculó el contenido de ácido producido mediante la titulación de 10 mL de muestra fermentada con hidróxido de sodio (NaOH)0.1 N, empleando fenolftaleína como indicador hasta obtener un ligero color rosa, finalmente se utilizó un montaje de destilación para concentrar el ácido obtenido y se analizó por cromatografía.

4.4.5 Concentración del ácido láctico.

Para la concentración del ácido láctico producido, se siguió lo propuesto por Iñiguez y Castillo, (2011). Se filtró la solución y luego se centrifugó a 2.500 rpm x 5 min, se realizó un montaje de destilación, con balón aforado y tubo refrigerante, tal como se muestra en el anexo 8, se introdujo en el balón 840 mL de la mezcla almidón de ñame y el cultivo, se controló la temperatura entre 96 y 100 °C, hasta lograr la concentración del ácido láctico.

4.4.6 Obtención del APL a partir de la polimerización del ácido láctico

Para la obtención del APL a partir de la polimerización del ácido láctico se realizó el montaje y los procedimientos propuestos por Estupiñán et al,(2007), Medina et al, (2014) y Moon et al., (2000).

La polimerización del ácido láctico se realizó en dos etapas, consistentes en oligomerización seguida de la policondensación.

- **Oligomerización**

En esta etapa se tomaron 200 mL del ácido láctico obtenido y concentrado, se deshidrató a 150 °C, las primeras 2 h a presión atmosférica, a continuación, a una presión reducida de 5 y 10 in de Hg durante 2 h respectivamente, y finalmente bajo la presión a 25 in de Hg, durante otras 4 h, para un total de 8 horas; luego transcurrido este tiempo, se formó un líquido viscoso el oligomero de ácido láctico, durante todo el proceso se tomaron muestras cada 2h, con el fin de hacerle un seguimiento al proceso de conversión del oligomero. En el anexo 9 se observa el montaje experimental utilizado para esta etapa.

- **Policondensación**

Para esta etapa se realizó un montaje consistente en un balón de fondo plano de 250 mL se utilizó una plancha de calentamiento con capacidad hasta 300°C y agitación magnética hasta 1400 rpm; se realizó una adaptación de un condensador de reflujo conectado con un sistema de vacío con su respectiva trampa de vacío, tal como se muestra en la figura 4.



Figura 4. Montaje para la policondensación al vacío con reflujo.

Fuente: el autor.

Se tomaron 100mL del producido del paso anterior y se alimentó en el balón de fondo plano, se agregaron las cantidades predeterminadas de cloruro de Estaño (II) dihidratado y un ácido protónico (ácido bórico), teniendo en cuenta que la cantidad del catalizador es al 0.4% en peso y la relación ácido catalizador de 1:1 molar, según lo propuesto por Moon et al., (2000), seguidamente, la mezcla se calentó a 180 °C bajo agitación magnética, la presión se redujo paso a paso para llegar a 25 in de Hg, en el que la presión de la reacción se continuó durante un tiempo de 5 h; al término de este tiempo, el sistema de reacción se volvió viscoso gradualmente, el matraz se enfrió y el producto se disolvió en cloroformo y posteriormente se precipitó en éter-di etílico.

4.4.7 Caracterización de materias primas, productos intermedios y producto final

Siguiendo lo propuesto por Hernández et al, (2015), la caracterización del producto de partida (almidón de ñame) se realizó mediante las pruebas descritas en la tabla 8.

La caracterización del producto intermedio (ácido láctico), se realizó mediante la cuantificación de valor ácido por titulación (ASTM D4662 - 03) y la determinación de la concentración de ácido producido en mg L^{-1} . Simultáneamente se hizo medición de pH vs tiempo cada 24 h. De la misma forma también se identificó mediante análisis de HPLC,

estableciendo el pico característico del ácido láctico y su concentración expresada en porcentaje.

El producto final, el APL se obtuvo en dos etapas: en la etapa de oligomerización el producto obtenido fue analizado por titulación y el producido de la etapa de polimerización por policondensación al vacío, se caracterizó mediante las siguientes pruebas: análisis por espectroscopia infrarroja (IR).

Tabla 8. Pruebas para la caracterización del almidón, el ácido láctico y el APL.

Parámetros	Normas
Producto de partida (almidón de ñame)	
Proteína cruda, %	AOAC 984.13 KJELDAHL
Grasas, %	AOAC 920.39C
Carbohidratos totales, %	Diferencia según FAO y OMS
Amilosa, %	ISO 6647 a 720 nm
Amilopectina, %	
Cenizas, %	AOAC 923.03
Fibra cruda, %	AOAC 962.09
Humedad, %	AOAC 964.22
Absorción de agua, g gel/g de almidón	Método de Anderson et al,(1969)
Solubilidad, g soluble/g de almidón	Método de Anderson et al,(1969)
Poder de hinchamiento, g de agua/g de almidón a 95°C	Método de Anderson et al,(1969)
Producto de intermedio (ácido láctico)	
Titulación	ASTM D4662 - 03

Medición de pH	Método potenciométrico
HPLC	HPCHEMM-1
Producto de final (APL)	
Titulación	ASTM D4662 - 03
IR	ASTM E 1252-98

5. ANALISIS Y DISCUSIONDE RESULTADOS

5.1 Obtención del Almidón

Luego de la aplicación del método descrito por Salcedo et al, (2010), se obtuvieron 805 gramos de almidón, este se depositó en bolsas de polietileno de sello hermético y se mantuvo almacenado a temperatura ambiente, en la figura 5 se describe el balance de materia de este proceso.

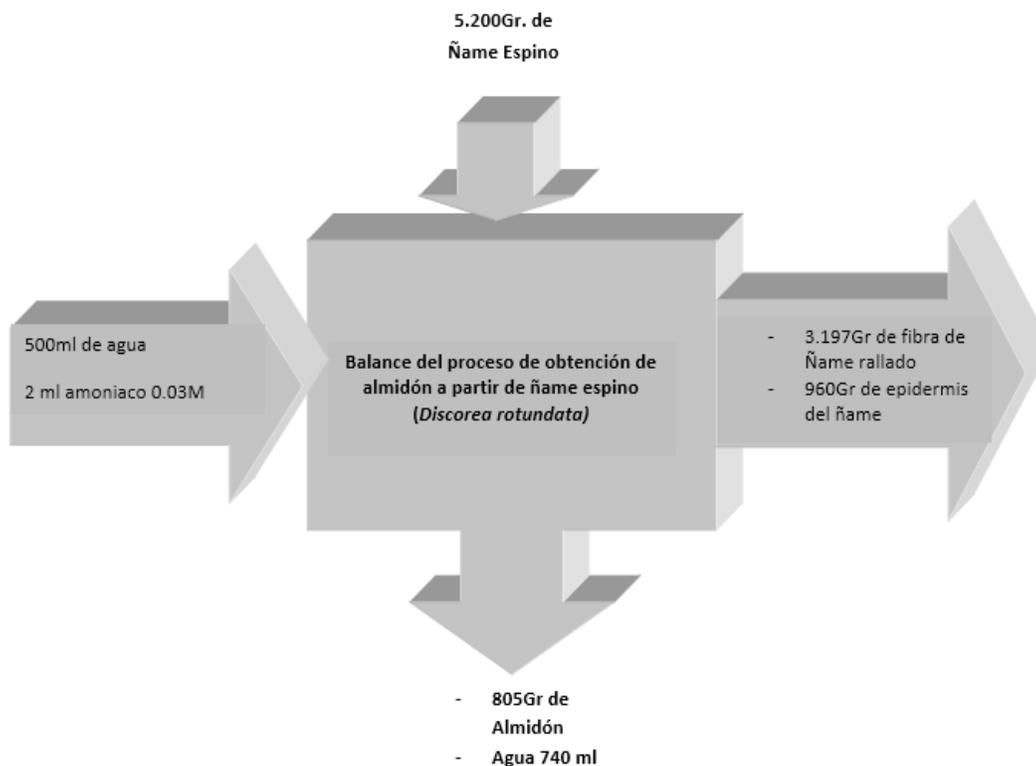


Figura 5. Balance de materia para la obtención del almidón de ñame espino.

Fuente: El Autor.

El porcentaje de rendimiento obtenido fue de 15,48%, (ver tabla 9), valor comparable con el 16.6% reportado en el informe realizado por Corpoica (2003), sin embargo, Meaño, Ciarfella y Dorto, (2014), muestran un rendimiento en la obtención de almidón de 7.44% lo que indica una buena eficiencia en el proceso de obtención de almidón en el presente estudio.

Acuña, (2012), utilizó en la obtención del almidón un método de molienda húmeda reportando rendimientos de 24,8%. Vidal (2010) obtuvo rendimientos de 22.84% utilizando el método propuesto por Corpoica (2003). Esto demuestra que el rendimiento del almidón se encuentra sujeto a distintos factores como: variedad de ñame utilizada, frescura del tubérculo, control de las variables del proceso, entre otras y no depende únicamente del método de extracción.

Tabla 9. Rendimiento del almidón obtenido.

Variedad	Peso inicial en g	Peso sin cáscara. g	Peso Almidón. g.	Merma. g
D. <i>Rotundata</i>	5.200	3.197	805	1.198
% de rendimiento	100	61,48	15,48	23,03

Fuente: El autor.

5.1.1 Evaluación de la calidad del almidón obtenido

- **Evaluación cualitativa**

Los 20 g de almidón de ñame obtenido, al ser impregnados con las gotas de lugol cambiaron a una coloración azul oscura, indicando la presencia de almidón. (Ver anexo 10)

- **Evaluación de las propiedades físico químicas y funcionales**

En la tabla 10 se presentan los resultados de los parámetros evaluados al almidón de ñame referido a sus propiedades fisicoquímicas: en porcentaje de proteína cruda, grasas, carbohidratos totales, amilosa, amilopectina, cenizas, fibra cruda y humedad.

Tabla 10. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de ñame.

Parámetros	Valores para almidón de ñame	Normas
Proteína cruda, %	7.64±0.04	AOAC 984.13 KJELDAHL
Grasas, %	0.28±0.02	AOAC 920.39C
Carbohidratos totales, %	78.46±0.45	Diferencia según FAO y OMS
Amilosa, %	26.78±0.12	ISO 6647 a 720 nm
Amilopectina, %	73.22±0.12	

Cenizas, %	0.48±0.08	AOAC 923.03
Fibra cruda, %	0.88±0.03	AOAC 962.09
Humedad, %	8.26±0.24	AOAC 964.22
Absorción de agua, g gel/g de almidón	4.45±0.13	Método de Anderson et al,(1969)
Solubilidad, g soluble/g de almidón	2.24±0.09	Método de Anderson et al,(1969)
Poder de hinchamiento, g de agua/g de almidón a 95°C	25.42±0.54	Método de Anderson et al,(1969)

Fuente: El Autor.

En la tabla número 10 se reporta el análisis físico químico y funcional del almidón, respecto al análisis físico químico es importante resaltar, que el porcentaje de carbohidratos totales corresponde al contenido de amilosa y amilopectina; lo primero que se determino fue el contenido de amilosa, correspondientes a $26.78 \pm 0.12\%$, por lo tanto al 100% del contenido total de carbohidratos por diferencia con la amilosa se deduce el $73.22 \pm 0.12\%$ de amilopectina, por otro lado, la sumatoria de proteína cruda, grasas, cenizas, fibra cruda, humedad y otros equivalen a 21.52%, en consecuencia de este valor la diferencia respecto al 100% de la muestra analizada equivale a los carbohidratos totales presentes.

Alvis et al, (2008) citado en Miranda, Marrugo y Montero (2013), reportaron que el contenido de amilosa es (25%-27%), lo cual es coherente con el valor encontrado en el almidón de ñame analizado en la presente investigación $26,78 \pm 0,12$, considerándose un almidón con características similares a almidones de otras variedades de ñame.

Pérez et al, (2013), reportan contenidos de amilosa ente 20 y 30%, y carbohidratos totales entre 70 y 80% valores que nos indican que los resultados obtenidos en el análisis hecho al almidón de ñame espino, los cuales están en $78,46\% \pm 0,45$ para carbohidratos totales y $26,78 \pm 0,12$ para amilosa, que es una buena fuente de almidón para utilizarlo en muchos procesos industriales.

En relación al análisis funcional reportado en la tabla 10; respecto al poder de hinchamiento, es importante resaltar que este representa en los almidones una propiedad de su contenido de amilopectina, siendo la amilosa un diluyente e inhibidor del hinchamiento (Cheng et al., 1996) referenciada en (Hernández et al., 2015). Lo anterior denota la importancia que representa este análisis respecto al contenido de carbohidratos totales, ya que, a valores altos de poder de hinchamiento se ve una fuerte inhibición de amilosa, como lo reportado por este mismo autor respecto al almidón de yuca, quien reporta 58,83 g agua. g⁻¹ almidón a 90 °C de poder de hinchamiento y un equivalente de amilosa de 17%, así mismo para el almidón de makal 28,56 g agua. g⁻¹ almidón a 90 °C y 23,6% de amilosa, siendo esto coherente con la caracterización realizada al almidón de ñame en la presente investigación donde se obtuvo un poder de hinchamiento del 25,42 g agua. g⁻¹ almidón a 95 °C para un valor de amilosa del 26,78% lo que puede influir favorablemente en el proceso de fermentación.

5.2 Evaluación de las condiciones de la fermentación láctica del almidón de ñame

En el conteo microbiológico se encontraron valores de 20×10^{10} Ufc.g⁻¹ como se observa en la tabla 11; estos resultados se consideran adecuados, ya que, favorecen la continuidad de crecimiento en el proceso fermentativo (ver anexo 11).

Tabla 11. Conteo de Colonias (de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulbaricus* y *Streptococcus thermophilus*).

Dilución en Placas	1		1 x 10 ⁻¹		1 x 10 ⁻²		1 x 10 ⁻³		1 x 10 ⁻⁴		1 x 10 ⁻⁵		1 x 10 ⁻⁶		1 x 10 ⁻⁷		1 x 10 ⁻⁸		1 x 10 ⁻⁹	
	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂
Conteo	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	102	116	120	92	82	86	76	68
Prom.	---		---		---		---		---		---		109		106		84		72	
Ufc Total	20 x 10¹⁰ Ufc g⁻¹																			

Fuente: el autor.

Los resultados de las muestras evaluadas para determinar el tiempo de producción de ácido láctico del proceso de fermentación se muestra en el anexo 17.

5.2.1 Producción de ácido láctico

De la figura 6 se puede observar que la solución inicial de almidón e inóculo parte con un pH de 6, una disminución del mismo se considera un indicador de producción de ácido, evidenciando que en las primeras 24 h se da la mayor reducción de pH, mas no la mayor producción de ácido láctico (datos que en la figura 7 se pueden contrastar). Las soluciones tendieron a estabilizarse entre las 120 y 144 h; esto pudo deberse al consumo total del sustrato.

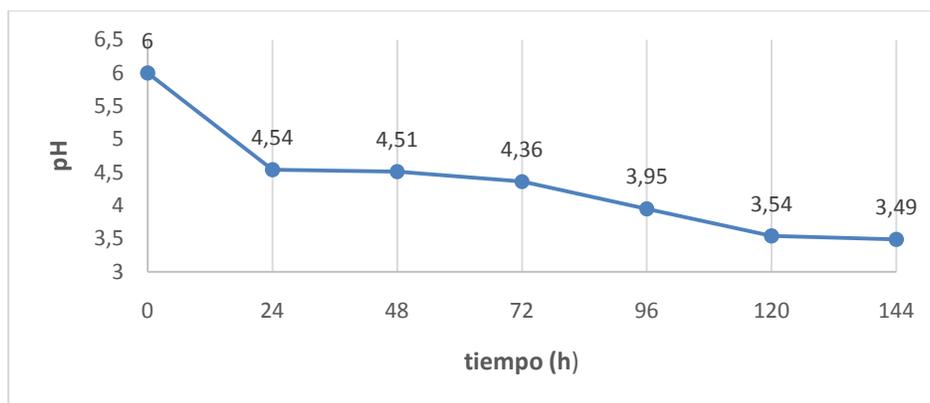


Figura 6. Producción de ácido láctico en términos de pH.

Fuente: El Autor.

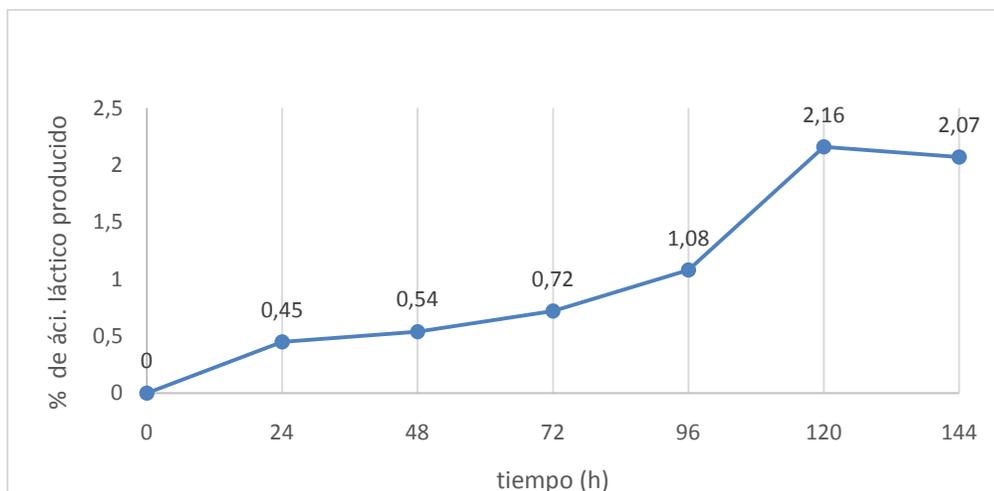


Figura 7. Porcentaje de producción de ácido láctico.

Fuente: El Autor.

El procedimiento anterior se realizó para identificar el tiempo en que se da la mayor producción de ácido láctico en el proceso fermentativo, dándose esto a las 120 h, comparando con lo reportado por (Feoli et al., 1995), se encuentra una correspondencia con los datos reportados por ellos; mostrando que la producción de ácido láctico se da en el mismo periodo de tiempo y teniendo en cuenta que ellos utilizan el mismo microorganismo; con lo que se procedió a realizar el proceso de producción de ácido láctico a escala mayor. En un matraz se preparó la solución de producción utilizando 500 mL de la solución de almidón y 500 mL del cultivo bacteriano, luego se colocó a las condiciones descritas en la metodología. Los resultados de la producción a escala mayor se muestran en el anexo 18 y la figura 8.

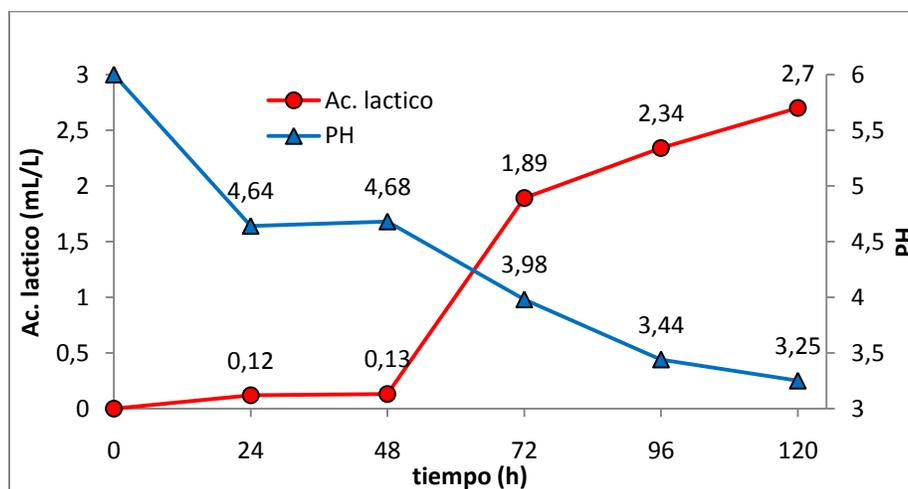


Figura 8. Producción de ácido láctico para la polimerización.

5.2.2 Identificación y cuantificación del ácido láctico obtenido por HPLC

En los anexos 13A y 13B se muestran los cromatogramas realizados al producto obtenido en la etapa de fermentación y la etapa de concentración, observándose en ambos que aparece un pico con una amplitud representativa y destacándose de los demás picos de la gráfica, correspondiendo este al ácido láctico, considerando la amplitud del pico un indicador de la cantidad de ácido láctico producido.

El cromatograma del ácido láctico producido en la etapa de fermentación al finalizar las 120 h donde se obtuvo una concentración de 16,26%, como consecuencia de la fermentación del almidón de ñame con *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*. Comparando este resultado con los obtenidos por Medina et al, (2014) donde los porcentajes para ácido láctico fueron de 13.90% y con Quintero et al, (2012) quienes obtuvieron un 17.6%; con el resultado del presente estudio se considera aceptable para esta etapa del proceso. De igual forma en la segunda etapa como resultado de la concentración se obtuvo un cromatograma donde se observa una concentración de ácido láctico del 43.04%.

5.3 Obtención del APL a partir de la polimerización del ácido láctico por condensación al vacío con reflujo.

5.3.1 Etapa de Oligomerización

Esta etapa consistió en realizar un seguimiento de lo que consideramos una posible conversión del ácido láctico a oligomero, mediante el método del cálculo del valor ácido según lo realizado por Pinzón et al, (2006) en su investigación de polimerización del ácido láctico, en este estudio ellos utilizaron KOH. De manera análoga en el presente trabajo se realizó una titulación con NaOH; a muestras tomadas en intervalos de tiempo de 2 h, los resultados obtenidos se muestran en la figura 9, mostrando la tendencia de la reacción como irreversible. También se deduce que la conversión del ácido láctico no fue del 100%, de la gráfica se puede observar que a las 8 h se obtuvo un valor ácido de 7,5 lo que equivale a 62,5% de ácido láctico remanente.

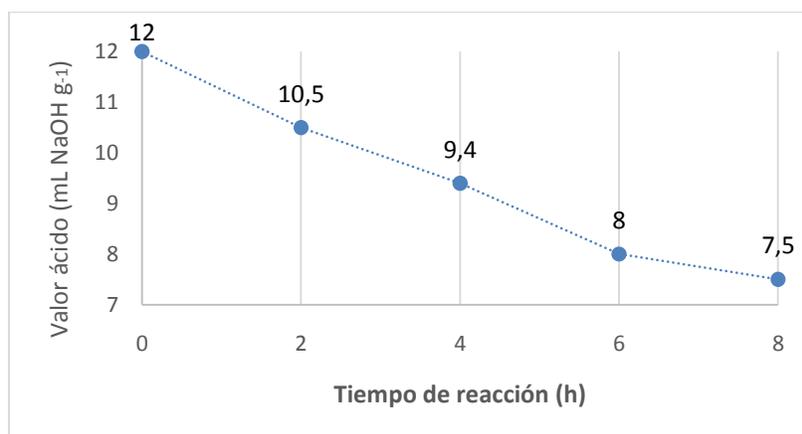


Figura 9. Seguimiento de la reacción de oligomerización por medio del valor ácido.

Fuente: Realizada en el presente estudio.

Lo anterior supone que la baja conversión de ácido láctico en esta etapa podría tener una incidencia directa en la calidad y la cantidad del APL a obtener, afectando probablemente sus propiedades fisicoquímicas.

5.3.2 Etapa de Policondensación y caracterización fisicoquímica del APL.

Transcurridas las 5 h de la etapa de policondensación al vacío con reflujo, se obtuvo un líquido viscoso en la parte superior de la mezcla de la reacción, como se muestra en la figura 10; diversos autores como Medina et al, (2014) y Estupiñán et al, (2007) consideran este parámetro como evidencia cualitativa de la producción del polímero de APL. Para corroborar y poder ser concluyentes se realizó análisis IR. En la figura 11 se observa el IR de una muestra de lo obtenido en la etapa de policondensación y en las tablas 12 y 13 el análisis de los grupos funcionales obtenidos.



Figura 10. Producto de la etapa de policondensación al vacío.

5.4. Resultados de la caracterización fisicoquímica.

El análisis infrarrojo de la muestra obtenida experimentalmente, permitió identificar la presencia de sus grupos funcionales característicos; a través de esta técnica se pudo interpretar el espectro producto de la experimentación, con otros espectros de bases de datos especializadas y de resultados obtenidos por otros autores. En la figura 12 se presenta el espectro IR del producto obtenido (ver anexo 14).

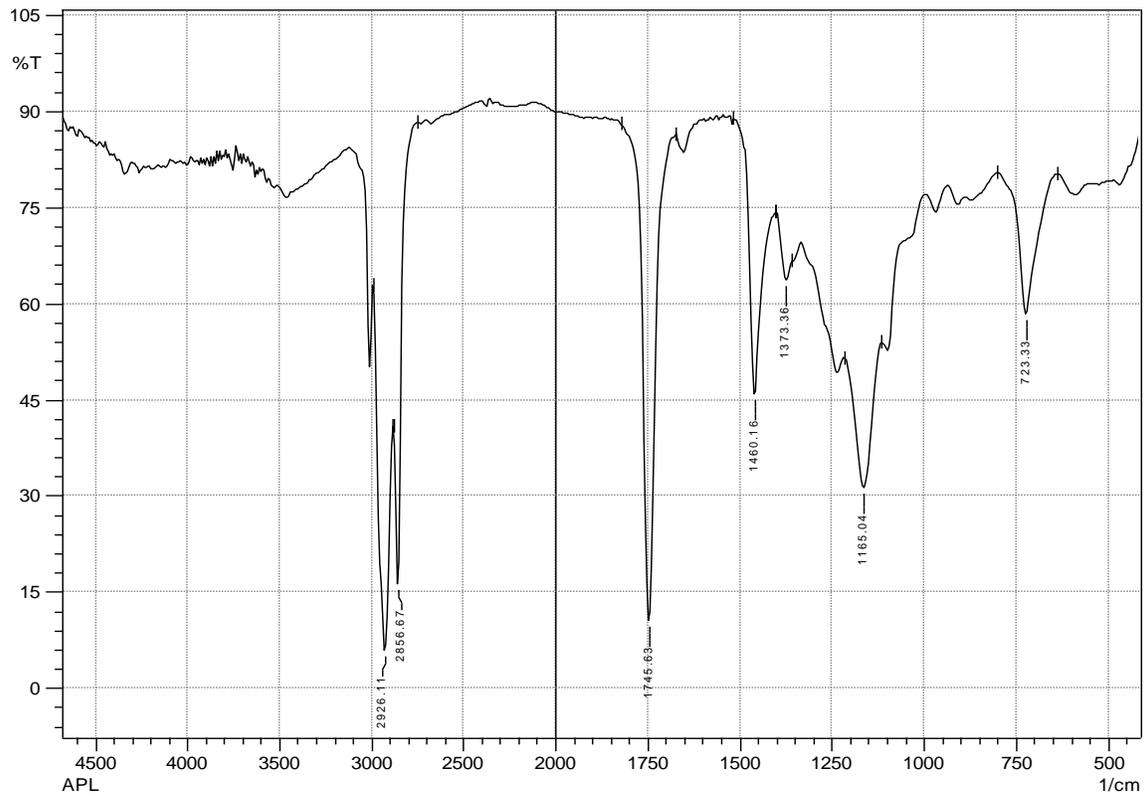


Figura 11. Espectro IR del producto obtenido experimentalmente.

Fuente: Obtenido en la presente investigación.

En la tabla 12 se observan las bandas características del espectro IR para polímeros biodegradables; esta información se contrastó de manera comparativa con los picos característicos del producto obtenido experimentalmente.

Tabla 12. Análisis cualitativo de bandas presentes en el espectro de polímeros biodegradables.

Asignación	λ (cm ⁻¹)	Observación
Grupo OH	3700 - 3020	Estiramiento del grupo OH
Enlace CH	3000 - 2890	Enlace alquilo/metilo
Enlace CH	2890	Enlace alquilo/metino
Grupo carbonilo (C=O)	1800 - 1680	Enlace cetona/aldehído
Enlace CH	1480 - 1420	Enlace alquilo, metileno
Enlace (CH ₃ -CH)	1452,32	Enlace alquilo, metilo
(-CH ₃)	1360 - 1390	Enlace alquilo, metilo
(-CH ₃)	1310	Enlace alquilo, metilo
C-O	1300 - 1050	Enlace éter aromático
(C-CH ₂ -)	720	Enlace alcano

Fuente: Adaptado de (Mendoza & Velilla, 2011; Perales, 2012).

En la tabla 13 se presenta una comparación de los picos característicos y longitudes de ondas del producto obtenido experimentalmente con los del APL puro tomado de Mendoza y Velilla (2012).

Tabla 13. Longitudes de onda características del producto obtenido experimentalmente.

Biopolímero	Longitud de onda cm ⁻¹						
	CH Alquilo- metilo	(C=O)	CH ₃ -CH	C-O	(C-CH ₂ -)	(-CH ₃)	CH Alquilo- metileno
Producto obtenido	2926.11	1745.63		1165.04	723.33	1373.36	1460.16

En la figura 11 se identifican en la muestra obtenida unas las longitudes de onda correspondientes a 2926.11, 1745.63, característicos de los grupos CH, (C=O) respectivamente, que según Mendoza & Velilla, (2011) hacen referencia a poliéster; este mismo autor muestra al APL como un poliéster. De otra parte perales, (2012) considera en sus resultados que la existencia de grupos funcionales como: C=O, CH₃-CH, C-O en las longitudes de ondas alrededor de 1800 a 1300 cm⁻¹ es concluyente de la presencia de APL;

aspecto este que también comparte Mendoza & Velilla, (2011). En consecuencia de esto la ausencia de un pico característico en la longitud de onda del $\text{CH}_3\text{-CH}$ sugiere descartar la posibilidad de considerar que el producto obtenido en la presente investigación sea APL.

Además la presencia del resto de picos puede deberse a impurezas provenientes del proceso fermentativo o de la policondensación, como también a la presencia de otros productos diferentes al APL. Posiblemente esto pudo deberse a las condiciones de la policondensación, relacionado con las variables de operación, como presión de vacío, tiempo de reacción o a la falta de purificación del ácido láctico obtenido, lo que debe ser objeto de futuras investigaciones en la misma línea de trabajo.

Diferentes autores que han realizado el proceso de policondensación al vacío del ácido láctico para la producción de APL reportan análisis DSC para el producto obtenido, con el propósito de identificar la T_g y la T_m como un indicador distintivo de este producto. En este trabajo y como consecuencia del análisis IR se descartó la presencia de APL motivo por el cual no se reporta el análisis DSC.

6. CONCLUSIONES

El rendimiento del 15.48% obtenido en el proceso de extracción del almidón, se considera adecuado, comparado con otros métodos reportados por diferentes autores, así como 16.6% reportado por Corpoica (2003), igualmente Meaño, Ciarfella y Dorto, (2014), obtuvieron un 7.44% de rendimiento; lo que permite considerar como una buena eficiencia en el proceso de obtención de almidón realizado en el presente estudio.

Teniendo en cuenta la caracterización fisicoquímica realizada y lo reportado por otras investigaciones como la de Alvis et al, (2008) citado en Miranda et al, (2013), quienes encontraron que el contenido de amilosa estaba entre el 25% y 27%, lo cual es coherente con el valor encontrado en el almidón de ñame analizado en la presente investigación correspondiente a 26,78%, considerándose un almidón con características similares a almidones de otras variedades de ñame; así mismo Pérez et al, (2013), reportan carbohidratos totales entre 70 y 80%, valores que indican que el 78,46% obtenido es un valor aceptable. Por lo anterior se puede considerar que el ñame es una buena fuente de almidón para utilizarlo en muchos procesos industriales.

La mayor producción de ácido láctico en el proceso fermentativo, se produjo a las 120 h, comparando con lo reportado por (Feoli et al., 1995), se encuentra una correspondencia con los datos obtenidos por ellos; mostrando que la producción de ácido láctico se da en el mismo periodo de tiempo, teniendo en cuenta que ellos también utilizan el mismo microorganismo utilizado en la presente investigación *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*.

El ácido láctico producido en la etapa de fermentación, se obtuvo con una concentración del 16,26%, Comparando este resultado con los obtenidos por Medina et al, (2014) y Quintero et al, (2012) quienes obtuvieron un 13.90% y 17.6% respectivamente, se considera este resultado aceptable.

El proceso de polimerización del ácido láctico se realizó por el método de policondensación al vacío con catalizador de cloruro de estaño (II) dihidratado activado con ácido bórico; método con el cual, el tiempo de reacción se completó en 13 horas; al término del cual se le realizó un análisis IR al producto obtenido y en consecuencia de este, dada la ausencia de un pico característico en la longitud de onda del $\text{CH}_3\text{-CH}$ se sugiere descartar la posibilidad de considerar que el producto obtenido en la presente investigación sea APL. Sin embargo con esto no se puede inferir que el ácido láctico obtenido a partir de ñame espino no sea apropiado para producir APL; por el contrario, queda abierta la posibilidad de experimentar y optimizar las condiciones de operación de esta etapa.

7. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio de evaluación de la incidencia de variables en el proceso de obtención de ácido láctico y la optimización del mismo.

Realizar la cinética de producción de biomasa, en la etapa de siembra del microorganismo, la cinética de producción de ácido láctico y la de consumo de sustrato probando variedad de ecuaciones propuestas en la literatura para tal fin.

Realizar el proceso de obtención de ácido láctico, evaluando diferentes catalizadores a base de estaño, así como su activación con otros ácidos protónicos.

Realizar un estudio que permita optimizar la etapa de oligomerización, para mejorar el porcentaje de conversión de ácido láctico y por consiguiente poder obtener el APL. Así mismo probar otros métodos de seguimiento a la conversión del oligomero, diferentes al del valor ácido.

8. REFERENCIAS

Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnol*, pp. 877 – 902.

Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J. Biotechnol*, pp. 156, 286–301.

Acevedo, M., Alba, N., Sandoval, A., Ismael, S., & Salcedo, J. (2015). Desarrollo y productividad de ñame (*Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*) en diferentes condiciones hídricas *Acta Agronómica* p. 64: Sitio web:<<http://tuxchi.redalyc.org/articulo.oa?id=169932884004>> ISSN 0120-2812

Achmad, F., Yamane, K., Quan, S., & Kokugan, T. (2009). Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators. *Chemical Engineering Journal* 151, pp. 342–350.

Acuña, M. (2012). Extracción, caracterización y aplicación de almidón de ñame variedad blanco (*dioscorea trifida*) originario de la región amazónica colombiana para la elaboración de productos horneados. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de: Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Alvis, A., Vélez, C., Villada, H & Mendoza, M. (2008). Análisis físico-químico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de las pastas *información tecnológica* Vol. 19(1), pp. 19-28.

Anderson, R. (1969). Gelatinization of corn grifts by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today*, v. 14, pp. 4-12.

Araya, C., Rojas, C., & Velázquez, C. (2010). Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (ananas comosus), para su uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico. *Rev. Iberoam. Polím.*, 11(7), pp. 407-416.

Arrieta, M. (2014). “Films de APL y APL-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en. <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39338/Arrieta%20>

Auras, R., Lim, LT., Selke, S., & Tsuji H. (2010). “Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application”, New Jersey: Jhon Wiley & Sons, Inc. pp. 69-82.

Bello, D. 2007. Plásticos biodegradables, una alternativa verde. Departamento de Bioquímica. Subdirección de Biotecnología. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. ECO-SITIO. 03/10/2005. http://www.eco-sitio.com.ar/ea_12_APLsticos_biodegradables.htm.

Bonilla, P., Ballesterero, M., & Baudrit, J. (2012). “síntesis y caracterización de poli (ácido l-láctico) por policondensación directa, obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (musa acuminata aaa variedad cavendish cultivar gran naine) en cana de polímeros, 13(2), pp. 52-59.

Brown, A., Vázquez, H., Jacques, C, Alba, L., & García, J.(2012) Obtención de biomateriales derivados de ácido láctico empleando métodos no convencionales de síntesis. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar [en línea], 46 (Septiembre-Diciembre): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223124988002>> ISSN 0138-6204.

Cañas, W. (2013). Plastificación interna con bioaceites epoxidados del ácido poliláctico (APL), para productos básicos procesados por inyección o extrusión. Tesis de grado.

Escuela colombiana de ingeniería Julio Garavito facultad de ingeniería industrial Bogotá D.C, Colombia.

Castro, J., & Vera, M. (2012). Diseño de reactores de prepolimerización y polimerización para la producción de ácido poli láctico en una planta industrial. Tesis de grado. Universidad de Cartagena.

Chang, D; Jung, H; Rhee. J & Pan.(1999). Producción Homofermentativa de lactatos D o L con *E. coli* RR1. Microbiología medioambiental, 65(4), pp, 1384-1389.

CORPOICA. (2003) Concepción de un modelo de agroindustria rural para la elaboración de harina y almidón a partir de raíces y tubérculos promisorios, con énfasis en los casos de achira (*Canna edulis*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y ñame (*Dioscorea sp.*). Tibaitatá, Colombia.

Cortes, J., Fernandez, A., Mosquera, S., & Velasco, R. (2014). “Evaluación de propiedades mecánicas, ópticas y de barrera en películas activas de almidón de yuca”, Rev. Bio. Agro., 12 (1), pp, 88-97.

Cuong, M., Gyung, J., Yong, H., Kyoung, S., & Jang, J. (2013). Lactic acid production from fresh sweet potato through simultaneous saccharification and fermentation, Biochemical Engineering Journal, 81, pp. 40– 46.

DANE; (2004). Departamento administrativo nacional de estadística, ministerio de agricultura y desarrollo rural, censo de plantas procesadoras de yuca para uso industrial <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/ena/censoyucaindustrial.pdf>.

Del Ángel D. (2007). Estudio y síntesis en la producción de Ácido Poliláctico (APL). [Tesis de Maestría en tecnología avanzada]. México D.F, México: Instituto Politécnico Nacional.

Escudero, O., Higuera, G. (2010). Caracterización de la cadena productiva del ñame en la zona norte de Bolívar y los montes de María. Tesis programa de administración industrial, Universidad de Cartagena.

Estupiñán, H., Parada, D., Laverde, D., Peña, B., Darío, Y., & Vázquez, C. (2007). Obtención de ácido poli l-láctico mediante policondensación con catalizador de Zinc metálico *Scientia Et Technica* [en línea] XIII (septiembre-Sin mes): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903649>> ISSN 0122-1701

Feoli, M., Escobar, C., & Marin, R. (1995). Obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus*. *Revista Colombiana de ciencias farmacéuticas*. N° 23 p. 18 -24.

Fuentes, D., Diaz, M., & Perilla, J. (2006). Método para la obtención de lacturo de alta pureza a partir de la depolimerización de poli(ácido láctico). *rev.colomb.quim.* [Online]. Vol.35, N.2, pp. 115-123. Issn 0120-2804.

García, C., Arrazola, G., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus Casei*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Vol 11 No. 1, pp. 136 - 143.

Gil, R., Domínguez, R., & Pacho, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnología y Ciencia Ed. (IMIQ)*, vol. 23 núm.2.

González, M. (2012) El ñame (*dioscorea spp.*). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales* [en línea] 33 (Octubre-Diciembre): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193224709001>> ISSN 0258-5936.

Gopal, R., Altaf, B., Naveena, M., Venkateshwar, E., & Vijay Kumar. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review, *Biotechnology Advances*, 26, pp. 22–34.

Guillemon, B. (2011). Bioplasticos. Remar, Red de energía y medio ambiente. <http://www.redremar.com/>

Harington, T., & Hossain, M. (2008). Extraction of lactic acid into sunflower oil and its recovery into an aqueous solution, Department of Chemical and Materials Engineering, pp. 218, 287 – 296,.

Hernández, M., Torruco, J., Chel, L., & Betancur, D. (2015). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28(3), pp. 718-726. Sitio web: <http://www.scielo.br/scielo>.

Iñiguez, A., & Castillo, A. (2011). Obtención de ácido láctico a partir de almidón de papa (*Solanum Tuberosum L*), como materia prima para la fabricación de material descartable. Tesis para la obtención del título de Ingeniero Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca.

Jiménez, P., Sibaja M., & Vega J. (2012). Síntesis y caracterización de poli (ácido l-láctico) por policondensación directa, obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (musa acuminata variedad cavendish cultivar gran naine) en Costa Rica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 13(2).

Joan, E., Quintero, M., Acosta, C., Mejía, C., Ríos, R., & Torres, A. (2012). Lactic Acid Production Via Cassava-Flourhydrolysate Fermentation, revista de la facultad de química farmacéutica, Vol. 19 #3, pp. 287 – 293.

Joaqui, D., & Villada, H. (2013). Propiedades ópticas y permeabilidad de vapor de agua en películas producidas a partir de almidón. *rev.bio.agro [online]*, vol.11, n.spe, pp. 59-68.

Lasprilla, A., Martinez, A., Lunelli, B., Jardini, A., & Filho, M . (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices. *Biotechnology Advances — A review*”, 30, 321 – 328.

Tin, L., Rahmat, A., & Wan, A. (2012). “Overview of Poly(lactic Acid)”, en *Handbook of Biopolymers and Biodegradable plastics*, Elsevier Inc. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00002-1>

Leja, K & Lewandowics, G. (2010). Polymer biodegradation and biodegradable. polymers– a Review. *Polish J. Environ. Stud.* 19:255-266.

Lick, S., Keller, M., Bockelmann, W., & Heller, J. (2015). Rapid Identification of *Streptococcus thermophilus* by Primer-specific PCR Amplification Based on its *lacZ* Gene. Volume 19, Issue 1, March, pp. 74–77.

Lopez, L., Torres, C. (2006). Estudio cuantitativo de bacterias. Facultad de agroindustrias. Universidad Nacional del Nordeste. Trabajo Practico N°5.

Madhumala, M., Satyasri, D., Sankarshana, T & Sridhar, S. (2014). Selective Extraction of Lactic Acid from Aqueous Media through a Hydrophobic H-Beta Zeolite/PVDF Mixed Matrix Membrane Contactor. [Dx.doi.org/10.1021/ie502566b](http://dx.doi.org/10.1021/ie502566b) | *Ind. Eng. Chem. Res.* 2014, 53, 17770–17781.

Marcos, J., Lacointe, A., Tournebize, R., Bonhomme, R., & Sierra, J. (2009). Water yam (*Dioscorea alata L.*) development as affected by photoperiod and temperature: Experiment and modeling. *Field Crop Res.* Apr 3; 111 (3): pp. 262–268.

Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I. (2014). Bayer and Pessione, E., Towards lactic acid bacteria-based biorefineries, *Biotechnol. Advances*, 32, pp. 1216–1236.

Meaño, N., Ciarfella, A., & Dorta, A. (2014). Evaluación de las propiedades químicas y funcionales del almidón nativo de Ñame Congo (*Dioscorea bulbifera* L.) para predecir sus posibles usos tecnológicos. Saber [online], vol.26 (2), pp. 182-188. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131501622014000200011&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1315-0162.

Medina, J., García, F., Paricaguán, B., Rojas, J., Castro, X., & Lugo, F. (2014) Obtención de ácido láctico por fermentación del mosto del fruto de cují (*prosopis juliflora*) y su posterior poli-condensación con zinc metálico a poli (ácido láctico) (APL) Revista INGENIERÍA UC [en línea], 21 (Mayo-Agosto): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=70732656007>> ISSN 1316-6832.

Mehta R. (2006). Modeling and simulation of Poly (lactic acid) polymerization. [Tesis Doctoral en Ingeniería Química]. Patiala, India: Universidad de Deemed.

Mendoza, R., Trujillo, Y., & Duran, D. (2007). Evaluación del almidón de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) como estabilizante en la elaboración de yogur entero tipo batido. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas [en línea], 5 (julio-diciembre): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90350209>> ISSN 0120-4211.

Mendoza, R., Velilla, W. (2011). Metodología para la caracterización termo-mecánica de películas plásticas biodegradables. Prospect. Vol. 9, No 1 pp. 46-51.

Miranda, P., Marrugo, Y y Montero, P. (2013). Caracterización Funcional del Almidón de Fríjol Zaragoza (*Phaseolus Lunatus* L.) y Cuantificación de su Almidón Resistente. Tecno. Lógicas., ISSN 0123-7799, No. 30, enero-junio de 2013, pp. 17-32.

Mohamed, A., Yukihiro, T., & Kenji, S. (2010). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits, J Biotechnol, 156 (4), pp. 286 – 301.

Montes, E., Salcedo, M., Zapata, J., Carmona, J., & Paternina, S. (2008). Evaluación de las propiedades modificadas por vía enzimático del almidón de ñame (*d. trifida*) utilizando α -amilasa (termamyl[®] 120 I, tipo I). Vitae vol.15 no.1 Medellín Jan./June.

Moon, S., Lee, C., Miyamoto, M., & Kimura, Y. (2000), Melt polycondensation of L-lactic acid with Sn(II) catalysts activated by various proton acids: A direct manufacturing route to high molecular weight Poly(L-lactic acid). J. Polym. Sci. A Polym. Chem., 38: 1673–1679.

Morrison, W., & Laignelet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and waxy maize. J. Am. Oil Chem. 47: 411.

Mirinal, K., Ioanna, A., Bernard, J., Kandyliis, P., Bekatorou, A., & Koutinas, M. (2014). Lactic acid fermentation by cells immobilised on various porous cellulosic materials and their alginate/poly-lactic acid composites, Bioresource Technology, pp. 165, 332 – 335.

Múnera, R. (2008). Guía práctica de laboratorio de bioquímica. Universidad nacional abierta y a distancia UNAD, escuela de ciencias básicas tecnología e ingeniería Palmira.

Nampoothiri, K., Nair, R., & John, R. (2010). “An overview of the recent developments in polylactide (APL) research”, Bioresource Technology, pp. 101, 8493–8501.

Núñez, A., Michelena, G., Carrera, E., & Alvarez, X. (2009). Estudios sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea], XLIII (Mayo-Agosto): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120662004>> ISSN 0138-6204

Onyeka, T., Petro, D., Ano, G., Etienne, S., Rubens, S. (2006). Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the French West Indies to anthracnose disease based on tissue culture-derived whole-APLnt assay. APLnt Pathol. 3; 55 (5): pp. 671–678.

Pacheco, E., Techeira, N & Garcia, A. (2008). Elaboración y evaluación de polvos para bebidas instantáneas a base de harina extrudida de ñame (*Dioscorea alata*). Rev. chil. nutr. [online], vol.35 (4), 452-459.

<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182008000500008&lng=es&nrm=iso>.ISSN0717-7518.

Pacheco, G., Flores, N., Rodríguez, R. Bioplásticos. (2014). Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F. 04510,

Parra, A. (2010). Bacterias ácido lácticas papel funcional en los alimentos. Facultad de ciencias agropecuarias. Vol. 8 pp. 102.

Perales, M. (2012). Modificación Estructural del Polietiléntereftalato con Ácido Poliláctico. Síntesis de Polímeros Biodegradables. Tesis de maestría. Instituto politécnico nacional. Mexico.

Pérez, E., Sabaté, A., Dufour, D., Guzmán, R., Tapia, M., Raymunde, M., Ricci, J., Guilois S., Pontoire, P., Reynes, M., Gibert, O. (2013). Isolated starches from yams (*Dioscorea sp*) grown at the Venezuelan Amazons: Structure and functional properties. Carbohydrate Polymers, 98, 650– 658.

Pinzón, J., Martínez, J., Espinosa, A., Pérez, A., Narváez, P. (2006). Polimerización de ácido (dl) láctico mediante policondensación por fusión directa. Estudio cinético de la etapa de oligomerización. Revista colombiana de química [en línea], 35. <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309026669009>> ISSN 0120-2804

Pivsa, T., Tong-ngok, S., Junngam, R., Wongpajan, W. (2013). “Synthesis of Poly(D-lactic acid) Using a 2-Steps Direct Polycondensation Process”, Energy Procedia, 34, pp. 604 – 609.

Ponce, J. (2014). Estudio de propiedades y compatibilidad de mezclas polipropileno (PP), ácido poliláctico (APL) y nano partículas de óxido de silicio (SiO₂), mediante extrusión y mezclado físico. Tesis de maestría. Instituto politécnico nacional. Altamira México.

Ponce, S., & Guerrero, V. (2014). Propiedades mecánicas de compuestos biodegradables elaborados a base de ácido poliláctico reforzados con fibras de abacá. Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Mecánica Quito, Ecuador. Revista epn, vol. 33 (2).

Prada, p., Romero, Y., Vanegas, M., Díaz, P., Molina, D., & Guzman, C. (2012). Lactic acid production by lactobacillus sp. from biodiesel derived raw glycerol. *Ciencia, Tecnología Y Futuro* [En línea], : <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46526430005>> ISSN 0122-5383

Quintero, M., Joan, E., Acosta, A., Mejía, G, Ríos, R., & Torres L.(2012). Lactic acid production via cassava-flour hydrolysate fermentation. *vitae* [En Línea], 19 (Sin Mes): <<http://Www.Redalyc.Org/Articulo.Oa?Id=169825291007>> Issn 0121-4004

Rodríguez, R., Ruiz, B., Guyot, J., & Sánchez, S. (2005) Starch binding domain affects catalysis in two lactobacillus α - amylases. *Appl Environ Microbiol.* Jan; 71 (1), 297–302.

Ruales, J., & Nair, B. (1994) Properties of starch and dietary fiber in raw and processed quinoa (*Chenopodium quinoa*, Wild) seeds. *plants Foods for Human Nutrition*, v. 45(3), 223-246.

Salcedo, J., Montes, E., Zapata, E., Didier, A. Márquez, H., & Diaz A. (2010). Obtención de jarabes de fructosa a partir de hidrolizados enzimáticos de almidón de ñame (*Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*). *Revista Vitae*, Vol. 17(3), pp. 243-251.

Sathe, S., & Salunkhe, D. (1981). Isolation, partial characterization and modification of the Great North bean (*Phaseolus vulgaris*) starch. *Journal of Food Science*, v. 46, n. 4, pp. 617-621.

Serna, L., & Albán, F. (2011). Ácido poliláctico (PLA): Propiedades y aplicaciones. *Revista Ingeniería y Competitividad*, 5(1), pp. 16-26.

Serna, L., & Rodríguez, A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, pp. 54-65.

Serna, L.; Rodríguez, A. (2007). Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar. *Agricultura técnica chile*, 67 (1):29-38.

Serna, L.; Rodríguez, A., (2005). Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius*. *Revista Colombiana De Biotecnología* Vol. VII (1), 32-38.

Singh, V. (2008). Synthesis of Polylactide with Varying Molecular Weight and Aliphatic Content: Effect on Moisture Sorption. [Tesis de Maestría de Ciencia en Ingeniería Química]. Filadelfia, USA: Universidad de Drexel.

Singh, L., Kaur, N., Sodhi & Sekhon, k. (2005). Physicochemical, cooking and textural properties of milled rice from different Indian rice cultivars, *Food Chem*: 89(2), 253–259, 2005.

Tejeda, L, Tejada, C, Villabona, A. (2007). Aprovechamiento del ñame espino (*Dioscorea rotundata*) en la producción de bioplásticos, *Revista Universidad Autónoma del Caribe, Prospectiva*: Vol. 6 (2), pp. 68.

Téllez, A. (2012). La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).

Valero, M., Ortegón, Y & Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: avances y perspectivas. *Dyna*, 181: 171-180.

Vidal, C. (2010). El ñame espino (*Dioscorea rotundata Poir.*): una opción en la producción de jarabes edulcorantes intermedios para la industria alimentaria. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental RIAA* 1 (2), 19-28.

Weber, C. (2000). “Biobased packaging materials for the food industry”. KVL: Dinamarca. p. 136.

Wiesenborn, D. (1994). Potato starch paste behavior as related to some physical/chemical properties. *Journal of Food Science*, Vol. 59 (3), 644-648.

Wee, Y., Kim, J., & Ryu, K. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications, *Food Technol. Biotechnol*, 44, pp. 163–172.

Ying, W., Yukihiro, T., & Kenji, S. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 119 No. 1, pp. 10 – 18.

Zuluaga, F. “Algunas aplicaciones del ácido poli-l-láctico”, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 37 (142), 125-142, 2013.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica del cultivo *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*



Technical sheet

Lyofast Y 4.50 B



Description Freeze-dried starter for direct vat use.
Defined strains culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Application

Use Add culture to process milk under aseptic conditions; make sure that all the culture is well dissolved by gentle stirring.

Packaging The pouches are printed with the starter name, the dosage in UC, the preparation number, the expiry date.

Storage If kept at least -18°C the starter shelf life is 18 months.

Features:

Temperature 34-45 °C

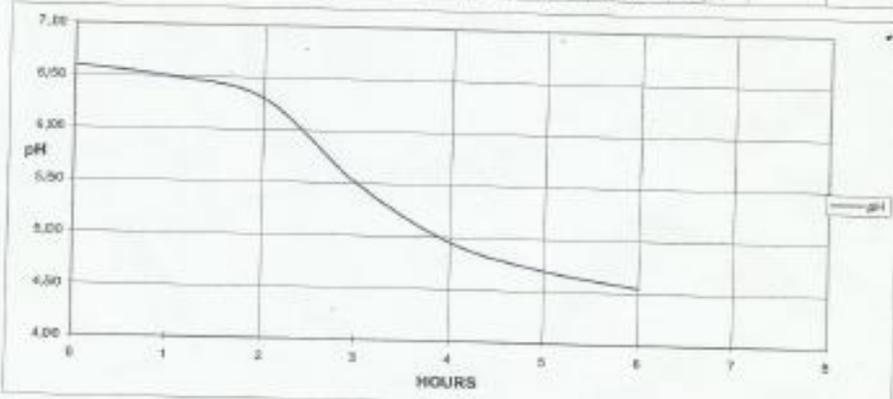
Gas production Absent

Microbiological features:		Methods	
Coliforms	< 10 CFU/g	FIL-IDF 73B:1998	
Enterobacteriaceae	< 10 CFU/g	VRBG (37°C - 48 h)	
Yeasts and molds	< 10 CFU/g	FIL-IDF 84B:1998	
<i>S. aureus</i>	< 10 CFU/g	FIL-IDF 80C:1997	
Salmonellae	Absence in 25 grams	FIL-IDF 93B:1995	
<i>L. monocytogenes</i>	Absence in 1 gram	FIL-IDF 143A:1995	

Acidification curve in UHT skim milk

Temperature	43°C	pH ± 0,15
Medium	UHT skim milk	

HOURS	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	6,60	6,55	6,30	5,50	4,95	4,70	4,55		



All these data are obtained by standardized laboratory tests and they are intended only as guidelines; the data could change depending on the conditions of the customer.

Issued on January 15th 2003; Rev. 1 on July 29th 2005

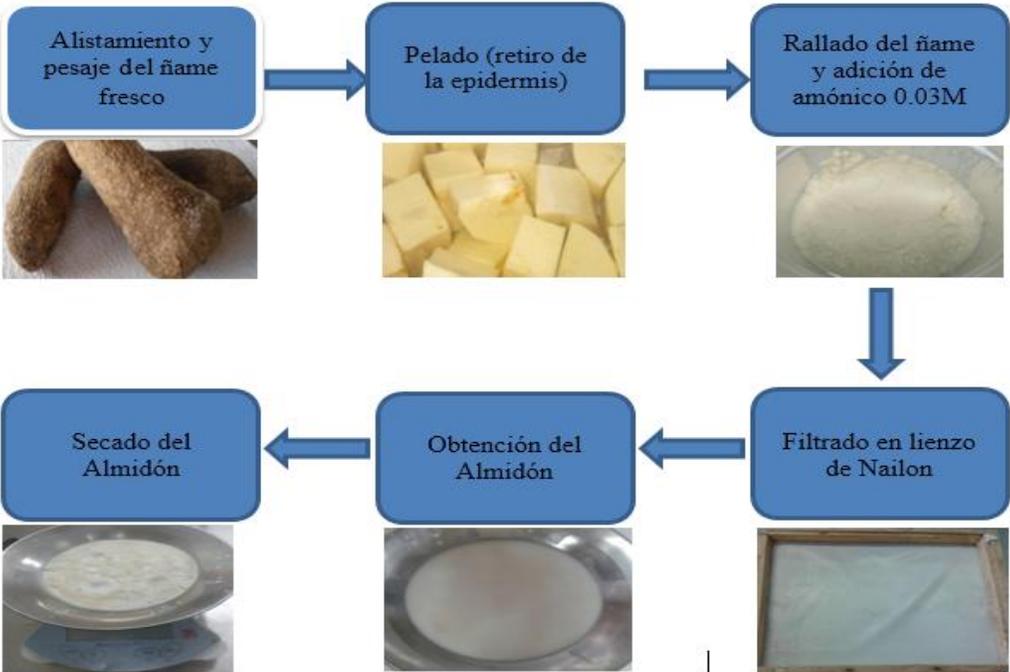
Anexo 2. Maquina procesadora de alimentos, Talleres productivos Fundación Juan Felipe Gómez Escobar.



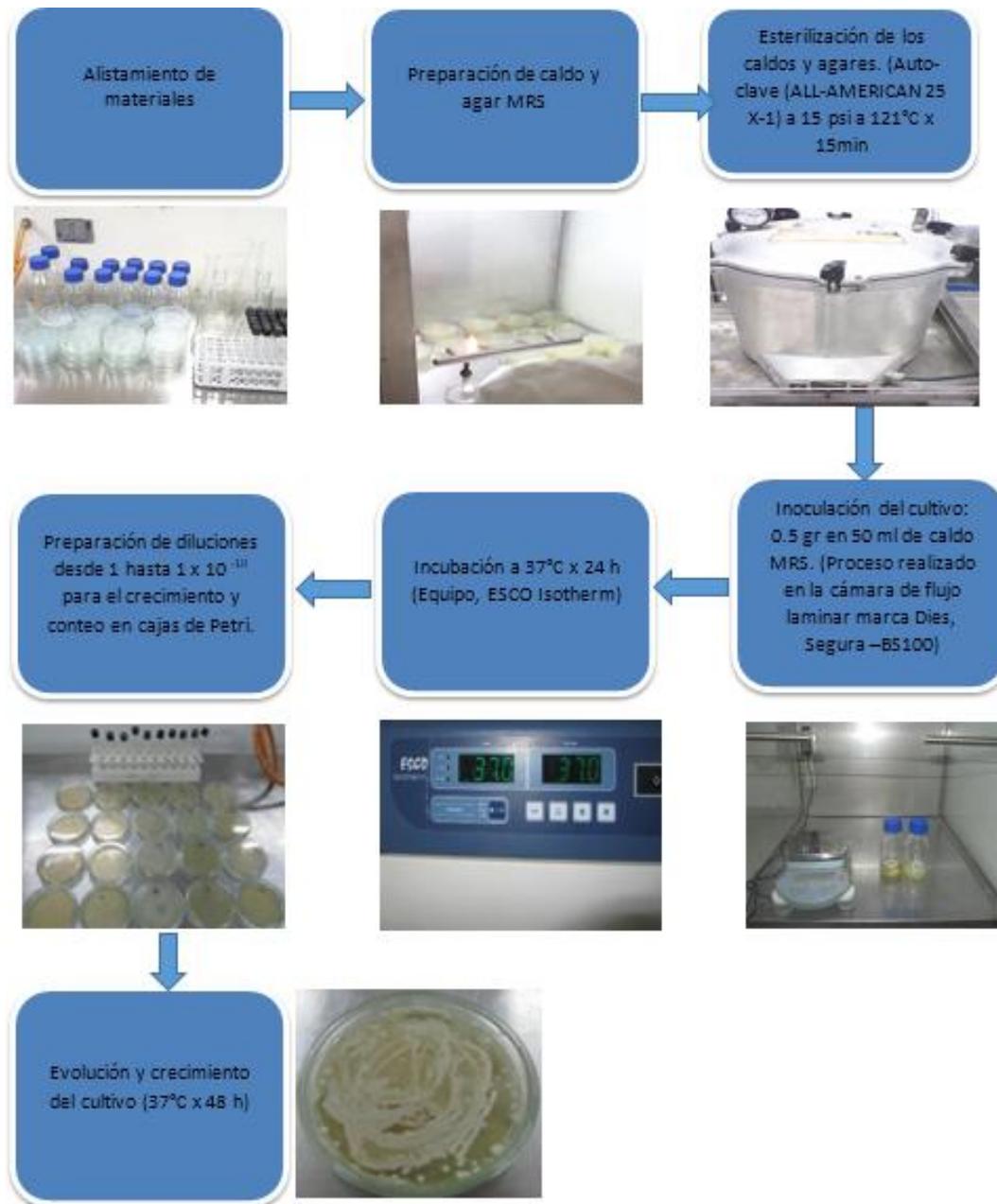
Disco rallador #2 utilizada para el rallado del Ñame.



Anexo 3. Obtención del almidón de Ñame espino (*D. rotundata*)



Anexo 4. Siembra de *Lactobacillus Delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*.



Anexo 5. Condiciones de operación del proceso fermentativo.

Muestras	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	pH inicial
1	24	37	6
2	48	37	6
3	72	37	6
4	96	37	6
5	120	37	6
6	144	37	6

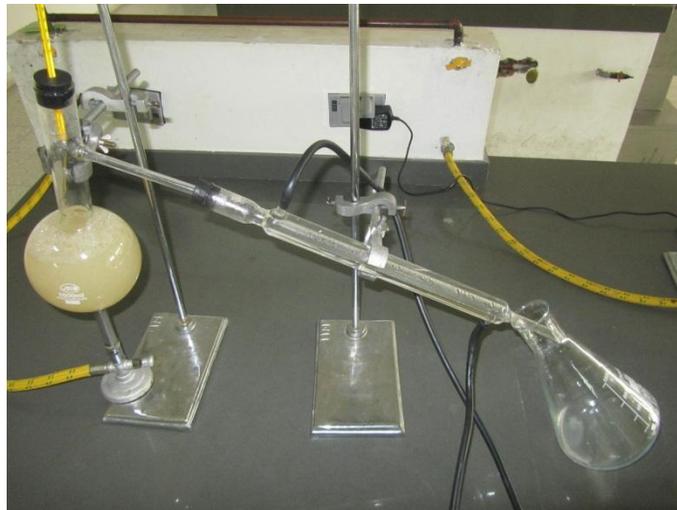
Anexo 6. Preparación del medio de producción del almidón para la fermentación.



Anexo 7. Medición del pH inicial del Almidón de Ñame.



Anexo 8. Montaje utilizado para la concentración del ácido láctico por destilación.



Anexo 9. Oligomerización del ácido láctico por destilación al vacío.



Anexo 10. Prueba de lugol para determinar almidones.



Anexo 11. Conteo de colonias.

Dilución en APLcas	1		1×10^{-1}		1×10^{-2}		1×10^{-3}		1×10^{-4}		1×10^{-5}		1×10^{-6}		1×10^{-7}		1×10^{-8}		1×10^{-9}	
	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂
Conteo	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	102	116	120	92	82	86	76	68
Prom-	---		---		---		---		---		---		109		106		84		72	
Ufc Total	20×10^{10} Ufc g⁻¹																			

C = Muestra

--- = No se distinguió por sobre población bacteriana.

Ufc = Unidades Formadoras de colonias

Ufc g⁻¹ = N° de colonias en placa (entre 30 y 300) x inverso de la dilución x 10

$$\text{Ufc g}^{-1} = 109 \text{ Ufc} \times (1 \times 10^6) \times 10 = 109 \times 10^7 \text{ Ufc g}^{-1}$$

$$\text{Ufc g}^{-1} = 106 \text{ Ufc} \times (1 \times 10^7) \times 10 = 106 \times 10^8 \text{ Ufc g}^{-1}$$

$$\text{Ufc g}^{-1} = 84 \text{ Ufc} \times (1 \times 10^8) \times 10 = 84 \times 10^9 \text{ Ufc g}^{-1}$$

$$\text{Ufc g}^{-1} = 72 \text{ Ufc} \times (1 \times 10^9) \times 10 = 72 \times 10^{10} \text{ Ufc g}^{-1}$$

$$\text{Media} = 20 \times 10^{10} \text{ Ufc g}^{-1}$$

Anexo 12. Calculo del porcentaje de ácido láctico producido.

Tiempo de lectura (horas)	Volumen de NaOH (mL)	% p/v de ácido láctico
24	0.5	0.45
48	0.6	0.54
72	0.8	0.72
96	1.2	1.08
120	2.4	2.16
144	2.3	2.07

$$V_{C_3H_6O_3} * C_{C_3H_6O_3} = V_{NaOH} * C_{NaOH}$$

$$V_{C_3H_6O_3} = 1 \text{ mL}$$

$$V_{NaOH} = 0.5 \text{ mL}$$

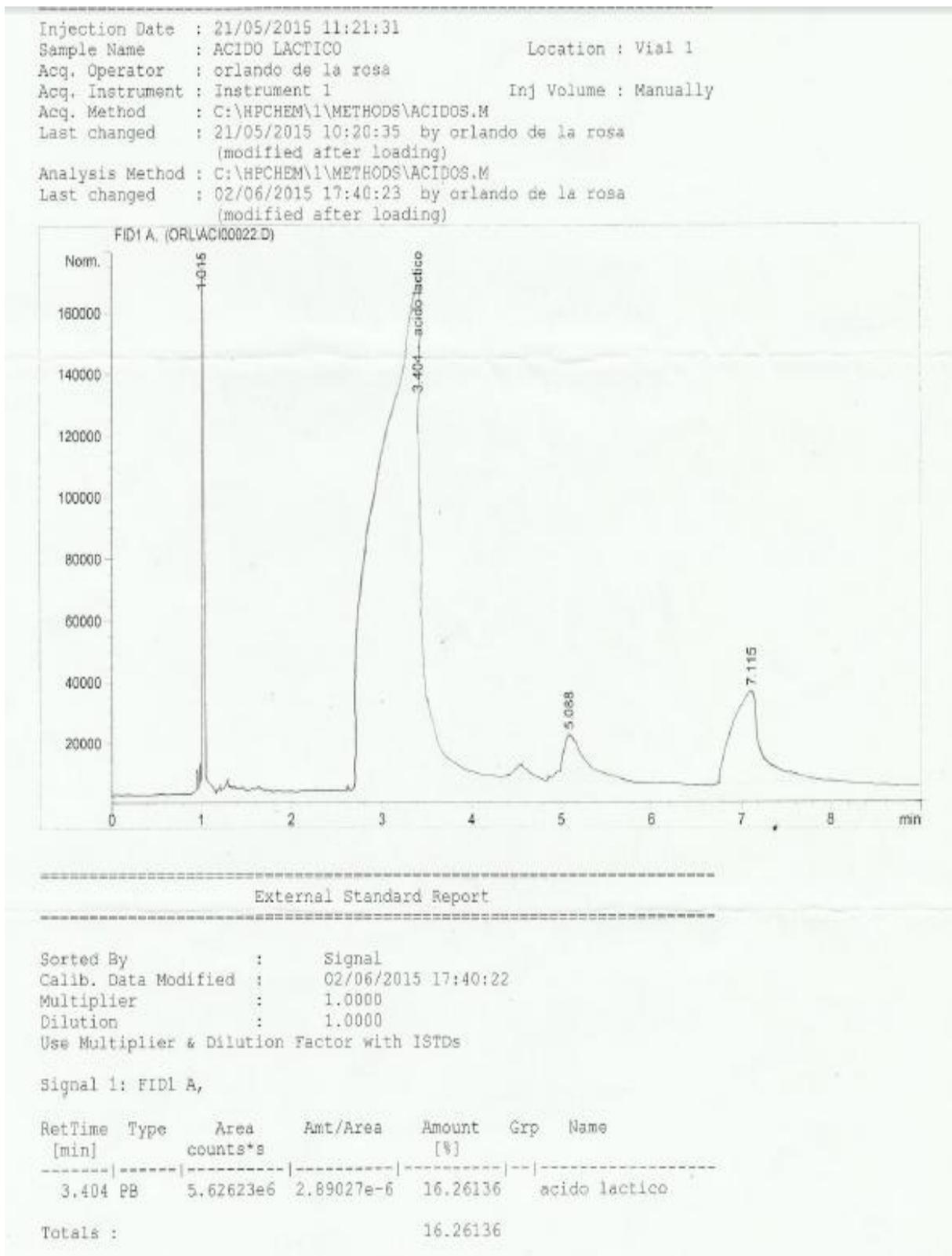
$$C_{NaOH} = 0.1 \text{ N}$$

$$C_{C_3H_6O_3} = \frac{0.5 \times 0.1}{1} = 0.05 \text{ N}$$

$$N = \frac{\% \frac{P}{V} \cdot 10}{Pm} = \quad \% \frac{p}{v} = \frac{N \cdot Pm}{10} = \frac{0.05 \times 90.08}{10} = 0.45\% p/v$$

Los demás valores se calcularon con el mismo procedimiento.

Anexo 13 A. Cromatograma del ácido láctico Obtenido en la etapa de fermentación.



Anexo 13 B. Cromatograma del ácido láctico concentrado.

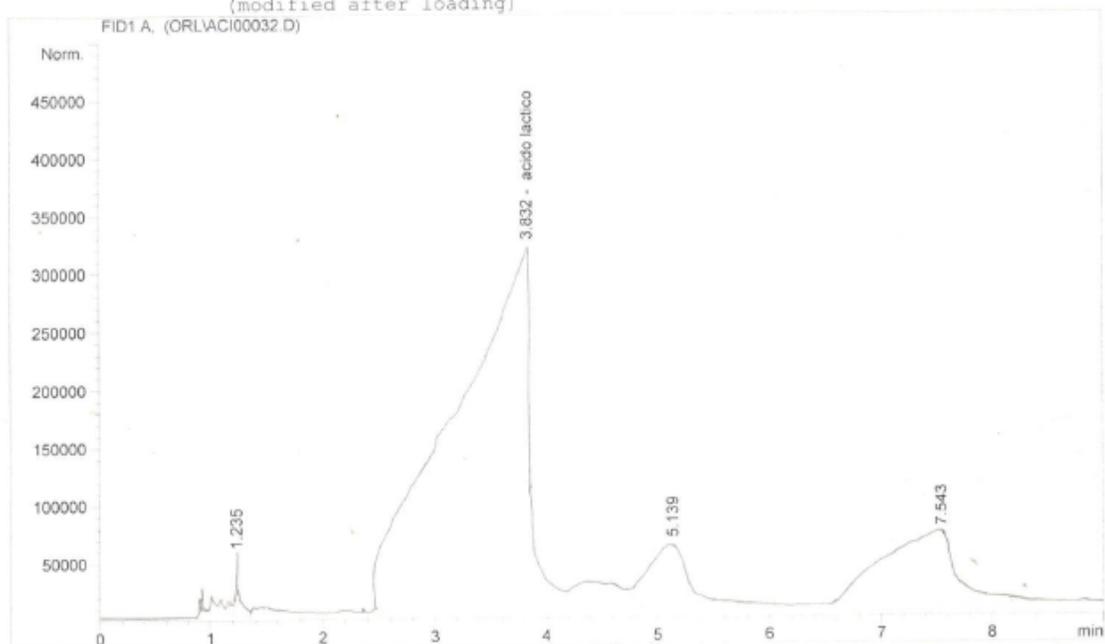
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ORL\ACI00032.D

Sample Name: acido lactico

ronald AL

```

=====
Injection Date   : 09/06/2015 17:17:47
Sample Name     : acido lactico
Location       : Vial 1
Acq. Operator  : grupo 3
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\ACIDOS.M
Last changed   : 09/06/2015 17:24:21 by grupo 3
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ACIDOS.M
Last changed   : 09/06/2015 17:45:53 by grupo 3
                (modified after loading)
=====
    
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 09/06/2015 17:47:09
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 A,

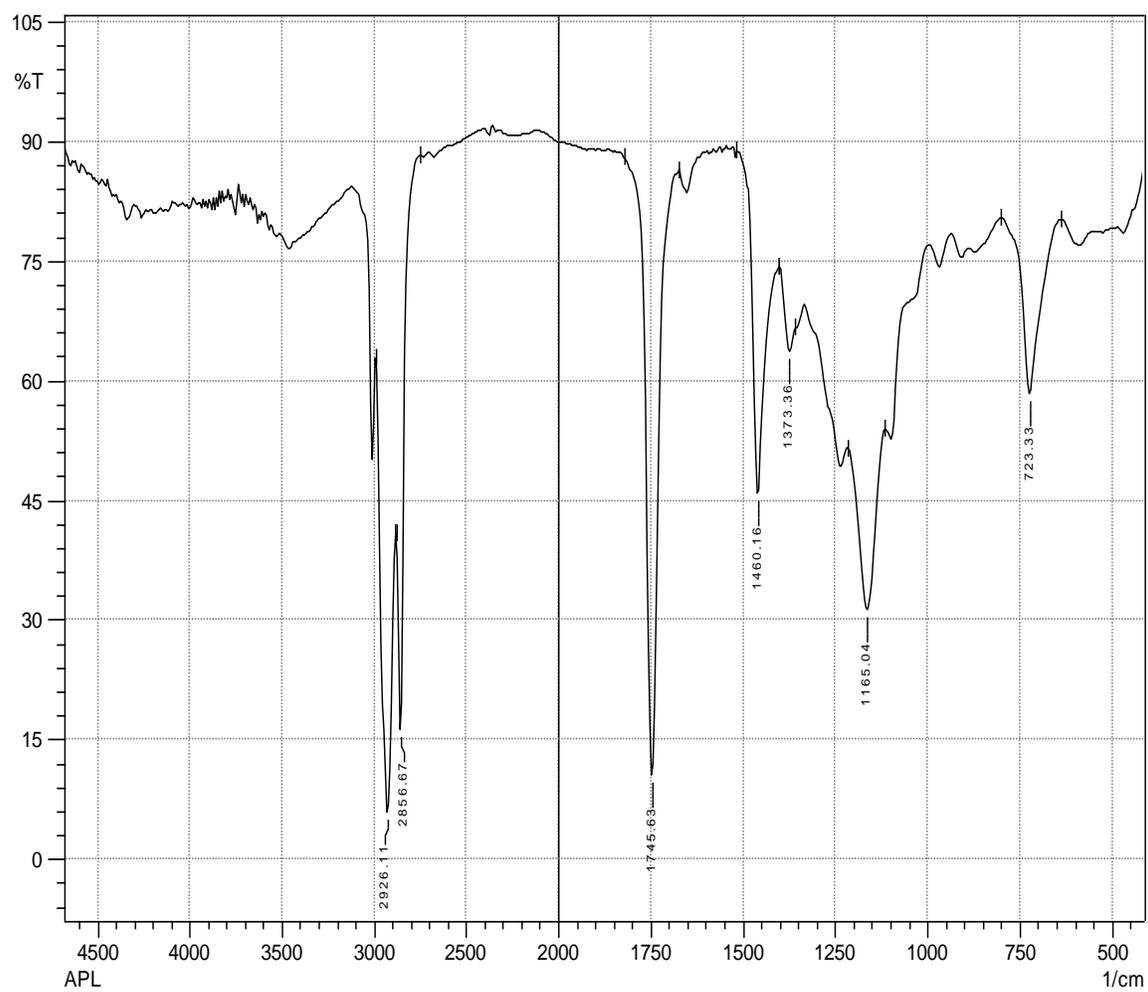
RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [%]	Grp	Name
3.832	VV	1.48943e7	2.89027e-6	43.04858		acido lactico

Totals : 43.04858

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Anexo 14. Soportes del análisis de infrarrojo (IR)



Anexo 15. Soportes del análisis de calorimetría



SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE
LABORATORIO DE ANALISIS DE HIDRO CARBUROS Y DERIVADOS
INFORME DE RESULTADOS

ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO DSC

Las muestras se recibieron en un recipiente vidrio con un aproximado de 3 mL para cada una. Para el análisis se tomaron aproximadamente ± 40 mg de muestra

1. Muestra de Ácido Polilactico.

Las muestras mencionadas se realizaron en un ANALIZADOR TERMOGRAVIMETRICO TA INSTRUMENT, MODELO: SDT Q 600, la temperatura del laboratorio fue de 23°C, el tiempo aproximado del análisis fue de 40 minutos. Las muestras se colocaron en crisoles de platino calcinando en un programa de temperatura, iniciando en 50°C hasta 600 °C/min; a una rata de 10°C, en una atmosfera de Aire al 99.999% de pureza con un flujo de 100mL/min.

En las gráficas obtenidas se muestran el comportamiento del peso expresado en porcentaje con respecto a la temperatura expresada en grados centígrados.

IRIS TATIANA OROZCO GIRALDO

Analista de Laboratorio del LAHD-CIP

Anexo 16. Certificado de análisis fisicoquímicos y funcionales del almidón de ñame.

Cartagena, 25 de mayo de 2015

Señor(es)
RONALD TEJADA
Ciudad

Cordial saludo.

A continuación informamos el resultado del análisis practicado a una (1) muestra de almidón de ñame.

PARAMETROS		Normas
Muestra	Almidón de ñame	
Proteína cruda, %	7,64±0,04	AOAC 984.13 KJELDAHL
Grasas, %	0,28±0,02	AOAC 920.39C
Carbohidratos totales, %	78,46±0,45	Diferencia según FAO y OMS
Amilosa, %	26,78±0,12	ISO 6647 a 720 nm
Amilopectina, %	73,22±0,12	
Cenizas, %	0,48±0,08	AOAC 923.03
Fibra cruda, %	0,88±0,03	AOAC 962.09
Humedad, %	8,26±0,24	AOAC 964.22
Absorción de agua, g gel/g de almidón	4,45±0,13	Método de Anderson et al.. 1969
Solubilidad, g soluble/g de almidón	2,24±0,09	Método de Anderson et al.. 1969
Poder de hinchamiento, g de agua/g de almidón a 95°C	25,42±0,54	Método de Anderson et al.. 1969

Cordialmente

Vo. Bo.



ORLANDO DE LA ROSA MERCADO, Q. F.
ANALISTA PROFESIONAL

Anexo 17. Proceso fermentativo del Almidón.

Muestras	Tiempo (horas)	pH inicial	pH final	Cantidad de ácido láctico Producido (mL/L)
0	0	6	6.00	0
1	24	6	4.54	0.45
2	48	6	4.51	0.44
3	72	6	4.36	0.72
4	96	6	3.95	1.08
5	120	6	3.54	2.16
6	144	6	3.49	2.07

Anexo 18. Proceso fermentativo utilizado para la producción de ácido áctico e inculo de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulbaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

Tiempo (horas)	pH final	Cantidad de ácido láctico Producido mL/L
0	6	0
24	4.64	0.12
48	4.68	0.13
72	3.98	1.89
96	3.44	2.34
120	3.25	2.70