



PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO (D- AL) A PARTIR DE LA SEMILLA DE AGUACATE TIPO HASS, POR LA CEPA LACTOGÉNICA *Escherichia coli* JU15

***¹Camargo Velandia Laura Valentina, ¹Retrepo Serna Daissy Lorena, ²Castro Montoya
Agustín Jaime, ² Vargas-Tah Alejandra**

¹Universidad de Pamplona. Facultad Ingenierías y Arquitectura. Programa química. Grupo de Investigaciones GIBA.
*Correo electrónico: camargovelandia7@gmail.com, Pamplona, Norte de Santander. Colombia

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán. Posgrado de la
Facultad de Ingeniería Química *Correo electrónico: posgradodepfiq@gmail.com; Morelia, Michoacán. México.

Recibido: febrero 21 de 2023; aceptado: mayo 01 de 2023

RESUMEN

El objetivo principal fue el estudio y caracterización físico química de la semilla de aguacate variedad Hass (residuo a emplear como fuente de carbohidratos) para la producción de ácido láctico (D- Ácido Láctico) junto a la cepa lactogénica *Escherichia coli* JU15, se fijaron condiciones óptimas de tiempo y concentración del ácido sulfúrico (H₂SO₄), como pretratamiento ácido aplicado al almidón extraído de la semilla para la recuperación de azúcares reductores. La caracterización de los materiales lignocelulósicos contempló de cuantificación de humedad, extractivos, carbohidratos estructurales, almidón, lignina y cenizas, con el fin de conocer el potencial de transformación de la semilla. La cuantificación e identificación de los azúcares reductores se realizó mediante HPLC. Posteriormente se realizó la fermentación con la cepa *E. coli* JU15 en el hidrolizado de almidón de las semillas con

21

**Camargo Velandia Laura Valentina, Retrepo Serna Daissy Lorena, Castro Montoya
Agustín Jaime, Vargas-Tah Alejandra**

medio mineral AM1. Obteniendo concentración de azúcares reductores de 72,78g/L en total del pretratamiento ácido, el principal compuesto que se identificó fue la glucosa, por otro lado una mínima cantidad de ácido acético, xilosa y arabinosa el cual conformaron el hidrolizado, finalmente se obtuvo una producción de 70,28gD-AL/L en 72 horas de fermentación con una productividad volumétrica de 0,97 gD-AL/L*h y un rendimiento máximo de 96,37% del producto final.

Correspondencia Autor: * Camargo
Velandia Laura Valentina, *Correo
Electrónico Autor:
camargovelandia7@gmail.com

Palabras clave: Azúcares reductores, hidrólisis ácida, *Escherichia coli* JU15, semilla de aguacate, fermentación.

ABSTRACT

The main objective was the study and physical-chemical characterization of Hass avocado seed (residue to be used as a source of carbohydrates) for the production of lactic acid (D-Lactic Acid) together with the lactogenic strain *Escherichia coli* JU15, optimal conditions of time and concentration of sulfuric acid (H₂SO₄) were set as acid pretreatment applied to the starch extracted from the seed for the recovery of reducing sugars. The characterization of lignocellulosic materials included quantification of moisture, extractives, structural carbohydrates, starch, lignin and ash, in order to know the transformation potential of the seed. The quantification and identification of reducing sugars was carried out by HPLC. Subsequently, fermentation was carried out with the *E. coli* JU15 strain on the starch hydrolysate of the seeds with AM1 mineral medium. The main compound that was identified was glucose, on the other hand a minimum amount of acetic acid, xylose and arabinose which formed the hydrolyzate, finally a

production of 70.28 gD-AL/L was obtained in 72 hours of fermentation with a volumetric productivity of 0.97 gD-AL/L*h and a maximum yield of 96.37% of the final product.

Key words: *Reducing sugar, acid hydrolysis, Escherichia coli JU15, avocado seed, fermentation*

INTRODUCCIÓN

La semilla de aguacate es una materia prima prometedora para brindar alternativas al uso de los residuos generados en el procesamiento de aguacate ya que son reutilizados en otros sistemas, por ejemplo, en el campo de biorefinerías y polímeros biodegradables (El Universal, 2018). Es conocido por su nombre científico, *Persea americana Mill*; es la baya de una semilla, oval, de superficie lisa o rugosa, con rango de peso amplio (entre 120 y 50g), el fruto constituye una baya voluminosa con una semilla grande. Es originaria de México y Centroamérica, y sus variedades Hass, Bacon, Fuerte y Criollo son las más importantes (Cid Pérez et al., 2021). Presenta cuatro formas: alargada, aperada, redondeada y ovalada. El fruto consta de tres partes: corteza, pulpa y semilla es de color verdoso y piel fina o gruesa; cuando está

maduro, la pulpa tiene una consistencia como de mantequilla dura y su sabor recuerda 23 levemente al de la nuez. Es muy rico en proteínas y en grasas con un contenido en aceites de 10 a 20% (Sagarpa, 2017; Almanza et al., 2019).

La semilla representa un promedio del 15 al 16% del peso de la fruta. La composición de las semillas de aguacate peladas liofilizadas (variedad Hass) consiste principalmente en carbohidratos (48-79.5%) y otros componentes mínimos, entre ellos: lípidos (5.5-15%), proteínas (3.4-19%), fibra cruda (4.0 %), cenizas (0,8–4,2%) y humedad (13,2%). Un análisis final de semillas da como resultado: carbono total (85,9%), hidrógeno (0,55%), nitrógeno (3,17%), oxígeno (9,49%), azufre (0,07%), materia volátil (27,55%) y minerales biológicamente importantes como el potasio, calcio,

magnesio, hierro, zinc, fósforo y silicio (Barbosa et al., 2016).

Pretratamiento ácido.

Este evalúa el efecto de diferentes ácidos en la hidrólisis, obteniendo glucosa en un corto tiempo; en general la hidrólisis ácida es realizada con HCl o H₂SO₄ (en un intervalo de 1-5%), a temperaturas cercanas a los 160°C y presiones de 10atm, siendo estas condiciones factores cruciales en la formación de compuestos tóxicos, temperaturas moderadas (<160°C) proveen una adecuada hidrólisis de hemicelulosa, con poca descomposición de azúcares; por otro lado, temperaturas superiores a 160°C favorecen la hidrólisis de celulosa y productos de descomposición de lignina que toxifican el jarabe azucarado (Monsalve et al., 2006).

Para obtener los azúcares del almidón de la semilla de aguacate se debe realizar mediante hidrólisis ácida, esta consiste en un tratamiento con ácidos realizado al almidón, el cual se encarga de romper en cadenas cortas de dextrina el almidón; a este se le conoce como grado de degradación y el mismo depende de la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de

hidrólisis. A medida que actúa el ácido, el peso molecular y la viscosidad de los productos decrecen y el poder reductor aumenta (García et al., 2016).



Almidón

Glucosa

El mecanismo de reacción de la hidrólisis ácida incluye: a) Difusión de los protones alrededor de la matriz del sustrato b) Protonación del oxígeno en los enlaces manométricos de los azúcares c) Ruptura del enlace. Los subproductos de la degradación son principalmente el hidroximetilfurfural (HMF), el ácido levulínico y el ácido fórmico, que da al jarabe un sabor amargo (García et al., 2016).

Ácido láctico.

El nombre científico del ácido láctico es ácido 2-Hidroxipropanoico o ácido hidroxipropanoico, siendo un sólido de punto de fusión bajo en estado puro o también un líquido incoloro, soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter de petróleo y disulfuro de carbono (Santos Corona, 2020). El ácido láctico tiene un átomo de carbono asimétrico que permite

que existan dos enantiomerismos de ácido láctico conocidos como dextrógiro L (+) o S (+) y levógiro D (-) o R (-).

- **Aplicación**

El uso del ácido láctico en la Industria Alimentaria es una de las aplicaciones más tradicionales y conocidas. Se emplea principalmente como saborizante y conservante de alimentos, al inhibir el crecimiento de microorganismos que podrían alterar las características organolépticas. Con esta finalidad, el ácido láctico se emplea para conservar carnes, o incluso para desinfectar los envases de esos productos cárnicos. También se emplea para la conservación de productos encurtidos o para verduras y frutas en conserva. En panadería y repostería también se usa como emulsionante y aporta estabilidad a las masas fermentadas, además, es el responsable del color de la corteza del pan. En bebidas como zumos, bebidas carbonatadas, cerveza o vino se emplea como acidulante y saborizante. Por último, en los productos lácteos y sus derivados, es donde el ácido láctico tiene una gran importancia para producir quesos, yogures o

requesones entre otros (Alves de Oliveira et al., 2018).

Proceso Biotecnológico

Parte de residuos agroindustriales y renovables o biomasa como materia prima, que tras un pretratamiento y una hidrólisis liberará azúcares fermentables, los cuales pueden ser sometidos a procesos de fermentación para la obtención de ácido láctico. Los microorganismos cumplen el papel de biocatalizadores en estos procesos; bacterias u hongos, han sido empleados para transformar los azúcares fermentables en ácido láctico. El producto final será ácido D-láctico o ácido L-láctico dependiendo del microorganismo empleado, por lo cual, el 90% del ácido láctico producido en el mundo es elaborado por vía biotecnológica (Serna y Rodríguez, 2015).

El interés de la investigación fue realizar un bioproceso para la producción del ácido láctico (D- Ácido Láctico) a escala laboratorio, dando lugar al aprovechamiento a las semillas de aguacate tipo Hass. Así mismo se cuantifico la composición de la semilla de aguacate tipo Hass mediante

caracterización físico química, conforme los estándares internacionales de la NREL, por otra parte, se encontró las condiciones óptimas de tiempo y concentración que favorecieron a la conversión de los carbohidratos de la semilla de aguacate

hacia azúcares fermentables y por último se evaluó el rendimiento máximo final que proporcione los azúcares fermentables hacia ácido láctico utilizando la cepa *Escherichia coli* JU15.

MATERIALES Y MÉTODOS

Disposición y tamizaje de los materiales lignocelulósicos

Material en base seca.

Se cortaron cinco semillas en fracciones pequeñas con la ayuda de un bisturí, dejando secar a temperatura ambiente por 24 h el material fraccionado, al tener el material completamente seco, con un mortero se trituro hasta generar una alta degradación de la semilla (material pulverizado).

Los 10,27 gramos del material con almidón se llevaron a un Tamiz, con mallas de 40 y 60 por un tiempo de 3 minutos, al pasar el material por cada una de las mallas, este quedo en pequeñas porciones en cada una de ellas, denominadas M40, M60 y R(residuo).

Material en base húmeda. El material solido utilizado fue el que se extrajo el almidón de la semilla de aguacate, este material se

denominó en base húmeda, fue recolectado y reservado, se dejó reposar y secar, se esparció sobre una capa de aluminio a temperatura ambiente por 3 días, ya que se encontraba húmedo. Cumplido los días el material quedo completamente seco.

Para el material en base húmeda, se realizó el mismo procedimiento de tamizaje con las mallas M40, M60 y R.

Caracterización de los materiales ligocelólusicos.

Solidos totales y humedad. Se realizaron 6 charolas de aluminio, marcándolas cada una con números e identificando que las tres primeras y tres últimas charolas fueron para añadirle el material lignocelulósico en base húmeda y seca. Las charolas se llevaron a la estufa a 70°C por 24 h. Seguidamente se sacaron de la estufa con pinzas y se pasaron al desecador dejándolas reposar por 5

minutos para luego pesarlas, se pesó 0,5g del material en base húmeda, aproximadamente por triplicado para las tres primeras charolas, de la misma manera se hizo con el material en base seca (Sluiter A. et al., 2008).

Determinación de extractivos en biomasa.

Se estipulo un tiempo de 4 h por cada 190mL de agua y de etanol, es decir el montaje se inició encendiendo la estufa y calentando el matraz para que empezara a condensar el agua dentro del tubo Soxhlet, empezó a caer gota a gota sobre el dedal y la muestra, hasta llenarse el brazo pequeño del tubo con el agua, se recirculaba el agua nuevamente al matraz, el cual se cumplió con un ciclo cada 20 minutos hasta que se completar las 4 horas. Para completar la primera parte de este procedimiento se retiró el condensador y el tubo Soxhlet verificando que dentro del dedal con la muestra no quedara agua.

La segunda parte consistió en realizar el mismo montaje con el tubo Soxhlet y dentro el mismo dedal, pero lo que cambio en este caso fue que al matraz se le adiciono 190mL de etanol, para dar por cumplido el protocolo.

Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa.

Preparación de las muestras para análisis e hidrolizar. Se pesaron 0,3g de las muestras obtenidas y se pasaron en tubos de presión, se etiquetaron los 6 tubos para que se diferenciaron, los tres primeros fueron para el material en base húmeda y seca. El tamaño de lote recomendado es de tres a seis muestras y un estándar de control de calidad, todos ejecutados por triplicado, Se agregó 3 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada tubo de presión (Sluiter A. et al., 2012). La agitación es esencial para asegurar un contacto uniforme entre el ácido y las partículas, obteniendo una hidrólisis uniforme.

Determinación de lignina insoluble en ácido. El procedimiento de filtrado se realizado de la siguiente forma: El papel filtro se adecuo dentro de cada uno de los embudos, en la parte inferior se colocó el erlenmeyer de vacío, seguidamente en la parte del orificio del erlenmeyer se conectó a la bomba para que ayudara a filtrar, el hidrolizado fue adicionándose poco a poco en el filtrado, observando que en el papel filtro quedo el sólido denominado lignina insoluble y la parte

que se pasó por medio del filtrado se denominó lignina soluble.

Determinación de lignina soluble en ácido.

En un espectrofotómetro UV-visible, se puso inicialmente un blanco de agua destilada en un UV-Cuvette semi-micro y junto al blanco se agregaron las 6 muestras en la cual se midió la absorbancia a una longitud de onda de 320 nm apropiada para el espectrofotómetro UV-Visible. Se diluyo las muestras con agua destilada para llevar la absorbancia a un rango de 0,7-1,0 (Sluiter A. et al., 2012).

Análisis y determinación de carbohidratos estructurales. Con la cantidad de lignina soluble que se generó en el procedimiento anterior, se utilizó para determinar la cantidad de concentración de Glucosa, Xilosa, Arabinosa y Ácido Acético (Carbohidratos estructurales), el cual se neutralizaron cada una de las muestras con carbonato de calcio, preparando la muestras para su respetivo análisis en HPLC.

Determinación de cenizas en biomasa. Se rotularon 6 crisoles, los cuales fueron llevados a una mufla a una temperatura de 575°C por 20 horas, para pesarlos a peso constante. Se apagó el equipo dejando bajar

la temperatura a 100°C, se sacaron con unas pinzas y se llevaron al desecador, dejándolos reposar por 1 h, seguidamente se sacaron y pesaron.

Extracción de almidón a partir de la semilla de aguacate.

Se pesó 100g de semilla de aguacate en octavos con 550mL de agua destilada en total, con el fin de realizar una molienda en húmedo para la semilla, quedando una mezcla homogénea para filtrar por medio de una tela filtrante y un colador.

Luego del tiempo estimado, se desechó el líquido que se presentó en la parte superior de cada uno de los recipientes, se dejó la capa blanca y se separó del líquido naranja, se limpió las paredes de los recipientes adicionándole 100mL de agua destilada a cada uno de ellos, seguidamente se traspasó el almidón obtenido, a frascos con sellados, se introdujeron en una centrifuga con un funcionamiento de 1 rotor, velocidad de 4000rpm y tiempo de 5 minutos. Seguidamente los 10 recipientes se metieron a la estufa a una temperatura de 60°C y un tiempo de 24 h, para que se secura por completo el almidón.

Hidrólisis ácida para la recuperación de azúcares reductores.

Concentración y tiempo de hidrolizado.

Inicialmente se preparó una solución de ácido sulfúrico 1%p/p partiendo de 2000g de solución. Se agregó 10 g aproximadamente de almidón junto a 90mL de la solución de 1%p/p de ácido sulfúrico, a un recipiente de 400mL. Se partió del tiempo 0 min, los recipientes se metieron en la autoclave, el equipo llegó a los 121°C de temperatura y presión 20 psi, inmediatamente se apagó. El tiempo y la temperatura se tuvo en cuenta de la siguiente manera; en el momento que la temperatura llegó a los 121°C, se empezó a contabilizar los tiempos restantes de hidrólisis ácida de 10, 20, 30, 45, 60 y 75 minutos (cada uno por separado).

Fermentación de azúcares reductores para la producción de D- Ácido Láctico.

Condiciones de cultivo-macroorganismo. Se realizó por duplicado los cultivos AM1 de la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de la semilla de aguacate.

La cuantificación y evaluación de la semilla en porcentaje de peso húmedo y seco fue

cepa *E. coli* JU15 anteriormente mencionado en matraces de Erlenmeyer de 250mL junto a 200mL de hidrolizado. Manualmente se controlaron las condiciones de pH y temperatura, manteniendo un pH en 7 adicionado KOH a 4N cada 60 minutos y una temperatura a 37°C, la velocidad de agitación se mantuvo en 108rpm. La fermentación fue monitoreada por 72 horas el cual dependió de la cantidad de glucosa que contenía el hidrolizado proveniente de la hidrólisis ácida.

Cuantificación de azúcares y D- Ácido Láctico. Se utilizó una cromatografía isocrática con H₂SO₄, 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min y 85 °C en una columna Rezex ROA-Organic Acid H+ (300 x 7.8 mm 8 micron). Se inyectaron 10µL de cada una de las muestras y fueron filtrados con membranas de nylon de 0,2 µL, inyectándose automáticamente.

basada en los protocolos de la NREL. El resultado del porcentaje de extracción de almidón contemplo 100g de semilla inicial, para los resultados del porcentaje de

humedad y sólidos totales registrados en la Tabla 1, fue medido antes y después de la molienda respectivamente.

Tabla 1. Determinación de cantidad de almidón extraído, humedad y sólidos totales (%).

Almidón extraído (%)	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)
30,24 ± 0,37	7,49 ± 0,07 *	92,59 ± 0,07
	7,35 ± 0,22	92,64 ± 0,25°

*Base húmeda / Base seca

La humedad es un factor importante en la estructura de las semillas ya que el contenido de humedad favorece a la vida útil de estas, clasificándose como ortodoxas y recalcitrantes. Por lo tanto, la semilla de aguacate tipo Hass se clasifica como recalcitrantes porque tienden a ser grandes y son libradas con un alto contenido de humedad que llega a representar más del

Base	Extractivos (%)	Cenizas (%)	CT (%)*
Húmeda	10,99 ± 0,71	0,33 ± 0,02	74,20
Seca	26,17 ± 0,53	0,44 ± 0,01	84,75

*CT: Carbohidratos totales.

50% del peso húmedo de la semilla como tal. Los resultados que se obtuvieron de la

absorbancia medida para hallar la cantidad de lignina soluble para la semilla en base seca y húmeda, de igual forma se registran

los valores obtenidos del porcentaje de lignina insoluble se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Determinación de absorbancia y porcentaje de lignina soluble e insoluble.

Absorbancia	% Lignina soluble	% Lignina insoluble
*0,813 ± 0,07	*0,42 ± 0,03	*13,66 ± 0,65
0,783 ± 0,04	0,40 ± 0,02	13,46 ± 0,78

*Base húmeda / Base seca

HPLC solo detecto la cantidad de glucosa del material en base seca y húmeda, en la Tabla 3 se registraron los porcentajes obtenidos.

Tabla 3. Determinación de azúcares estructurales.

Base	Glucanos (%)
Húmeda	52,37 ± 0,60
Seca	63,08 ± 0,03

Tabla 4. Caracterización de la semilla de aguacate tipo Hass.

La cantidad de extractivos de la semilla depende de la cantidad de flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas y taninos por el método Soxhlet, pero esto depende de los extractos de agua que contienen materia orgánica como azúcares, materiales nitrogenados, minerales y los extractos de etanol contienen en clorofila, pigmentos naturales. En base a estudio sobre caracterización del procesamiento de *Persea americana mill* tanto para la cascara y la semilla, los resultados oscilan entre 15,33% a 23,11% (Dávila et al., 2017). De igual forma existen compuestos identificados en la semilla tales como perseitol, ácido quínico, ácido clorogénico, 77 derivados de quercetina, ácido cítrico de rutina, glucósido de tirosol, penstemida y glucósido de ácido vanílico (López Cobo et al., 2016). El contenido de ceniza de la semilla es cercana y similar a lo reportado (Dávila et al., 2017) (Aletan, 2018), $1,30 \pm 0,13$ y $0,43 \pm 0,02$ respectivamente. La determinación de las cenizas consiste en compuestos orgánicos y la incineración sirve para destruir toda la materia orgánica cambia su naturaleza y las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierte en oxido o carbonatos o su vez pueden reaccionar durante la incineración para formar fosfatos, fosfatos o haluros;

algunos elementos como el azufre y los halógenos pueden no ser retenidos en las cenizas perdiéndose por volatilización (Triguero Ruiz, 2018). El porcentaje de carbohidratos se estimaron por la suma de (%Humedad+ %lignina soluble+ %lignina insoluble+ %ceniza+ %azúcares estructurales), los resultados fueron similares a lo reportado (Barbosa et al., 2016) entre un 70 a 80%, se presenta carbohidratos donde se encuentra cantidades de glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético (se tuvieron en cuenta para este estudio de igual forma al ser complejos incluyen almidones y fibra). Los resultados que se obtuvieron hacen referencia a que las semillas de aguacate tipo Hass pueden ser procesadas y transformadas para la producción de valiosos biocombustibles, ácidos orgánicos, bioenergía y biomateriales, debido a la composición estructural que posee (Dávila et al., 2017).

Conversión hacia azúcares reductores con Hidrólisis acida

En la Tabla 5, se representa la cantidad de azúcares recuperados con respecto a 1%p/p de concentración de ácido sulfúrico ya que se partió de 10g de almidón con respecto a cada uno de los tiempos, el cual se obtuvo mediante HPLC.

Tabla 5. Cuantificación de azúcares por HPLC de cada uno de los experimentos.

HPLC		
Tiempo (min)	g/L de Recuperación	g de C ₆ H ₁₂ O ₆
0	21,16 ±0,30	1,90
10	48,06 ±0,60	4,32
20	58,56 ±0,14	5,27
30	68,74 ±0,33	6,18

Se esperaba que se recuperara en su totalidad (110g/L) la glucosa al llegar a un tiempo mayor de 60 minutos, los datos se graficaron en la Figura 1, para observar el punto máximo de concentración de azúcares reductores que se recuperó en el pretratamiento ácido. Pero se tiene en cuenta que las condiciones con las que se trabajó en su totalidad no fueron acertadas ya que, en este tipo de pretratamiento, se sugiere que para recuperar entre un 90 a un 100% de azúcares se debe trabajar en

Reactores discontinuos o reactores de flujo estacionario, temperaturas mayores a los 200°C y concentraciones menores a las de 1% p/p de ácido empleado y tiempo de mayor de 60 minutos (Morales de la Rosa, 2015).

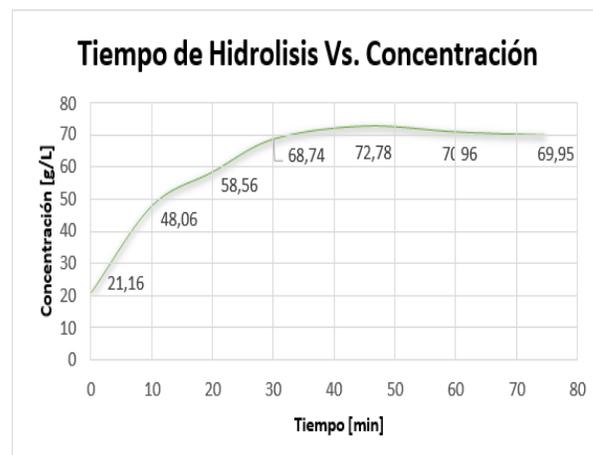


Figura 1. Concentración de recuperación de azúcares reductores Vs. Tiempo de Hidrólisis

Es importante destacar que al no realizarse completa la conversión de almidón a glucosa, es consecuencia de los azúcares originarios en la hidrólisis con ácido sulfúrico, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano como el furfural debido a la degradación de xilosa y arabinosa y la deshidratación hacia 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) formado la

degradación de las hexosas en las cuales son la glucosa, manosa y la galactosa las cuales no se analizaron con HPLC (excepto la glucosa), clasificados como oligómeros, a su vez el 5-HMF se puede descomponer en dos moléculas, como lo es el ácido levulínico y en ácido fórmico en medios acuosos o de la misma forma los azúcares reductores pueden reaccionar formando polímeros indefinidos los cuales son llamados húmicos (Morales de la Rosa, 2015). La hidrólisis en las cadenas de oligosacáridos/polisacáridos presentes en el almidón recuperado de la semilla se lleva a cabo como se observa en la Figura 2 para obtener monosacáridos. El hidrógeno del ácido protona al oxígeno del carbono anomérico de la molécula del azúcar (glucosa). El grupo hidroxilo queda con una carga positiva que puede dejar a la molécula de la azúcar separada del resto, es decir, se rompe el enlace glucosídico y finalmente se reemplaza el grupo hidroxilo de la molécula del agua liberando un ión de H⁺ (Santos Corona, 2020).

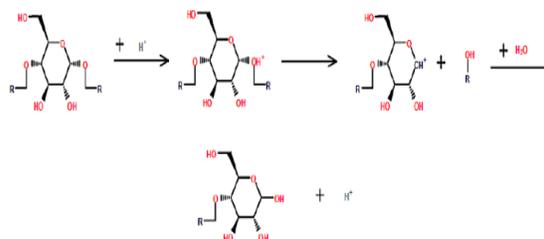


Figura 2. Reacción de una hidrólisis ácida en azúcares.

Según los resultados el punto máximo de recuperación de azúcares reductores fue a una concentración de 72,78±0,05 g/L a un tiempo de 45 minutos, estas condiciones se tuvieron en cuenta para la etapa de fermentación hacia la producción de D-Ácido Láctico.

Producción de D- Ácido Láctico.

La ventaja de utilizar *E. coli* es que consume varias fuentes de carbono siendo una alternativa para aprovechar y utilizar azúcares de fuente de biomasa como lo son los hidrolizados lignocelulósicos ya que son ricos en hexosas y pentosas. Los principales azúcares que se pueden metabolizar con la *E. coli* es la glucosa y la xilosa principalmente, por otro lado, también contienen arabinosa, manosa, galactosa y galacturonato, estos azúcares están

presentes en los jarabes de hidrolizados (Martínez et al., 2017). JU15 produce D-Ácido Láctico con rendimientos de conversión superiores al 90% del rendimiento teórico máximo utilizando medios minerales suplementados con glucosa (40 g / L) (Utrilla, VargasTah, y Trujillo, 2016). Es importante destacar que la *E. coli* depende del medio mineral AM1 para favorecer su crecimiento bacteriano en condiciones de 37°C y pH 7 (Martínez et al., 2017).

Etapas final de fermentación del Hidrolizado del almidón extraído de la semilla de aguacate tipo Hass con *E. coli* JU15.

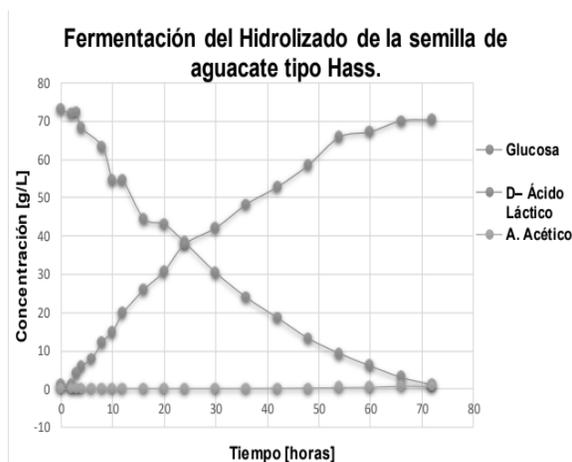
Recientemente la cepa *E. coli* JU15 se ha probado en otro estudio semejante, pero en diferentes condiciones de obtención de azúcares reductores (pretratamiento enzimático) y equipos empleados (biorreactor de tanque agitado controlado), esto sirve como punto de comparación entre los dos procesos (Palmerín et al., 2019). Para observar el consumo y producción de glucosa y D-Ácido Láctico se realizó un promedio entre las dos fermentaciones, cuantificando la concentración inicial de

glucosa suministrada para la fermentación en el tiempo de 72 horas, iniciando con 72,88 g/L y consumiéndose hasta 1,17g/L, de igual forma se cuantifico la xilosa partiendo de 71,67g/L, respectivamente. Como se observa en la Figura 3, se realizó una gráfica súper puesta representando la cinética de D-Ácido Láctico con respecto a la glucosa, xilosa y ácido acético. La producción de D-Ácido Láctico a las 72 h terminada la fermentación fue de 70,28g/L, observándose que en el tiempo de 30 h va incrementando la producción hasta llegar al punto donde es estable la concentración a 70g/L d. Se tuvo en cuenta el tiempo de fermentación debido a la cantidad inicial de concentración de glucosa suministrada, si se hubiera dejado otras 2 horas de fermentación a lo mejor se hubiera generado 1:1 de glucosa a D-Ácido Láctico, de igual forma esto quiere decir que la cepa tuvo un comportamiento eficaz continuamente a pesar de que no inicio con un alto crecimiento bacteriano, mediante la producción D-Ácido Láctico la *E. coli* JU15 consumió la cantidad de azúcares reductores desde la primera hora hasta el final de proceso, obteniendo un rendimiento máximo de 96,37% (0,96gD-AL/gGLU), realizando una comparación con respecto a la investigación reciente (Palmerín et al.,

2019), el que rendimiento que obtuvieron oscilo entre un 30 a 40%, mostrando una menor producción de D- Ácido Láctico ya que ellos llegaron a la conclusión de que la producción no dependió de la concentración de células en el reactor si no de la falta de nutrientes importantes en el hidrolizado de la semilla de aguacate o alternativamente algunos de sus componentes podrían ser inhibidores del metabolimos de *E. coli* en el medio experimental. De igual forma otras investigaciones, con diferente materia prima como el rastrojo de maíz (Utrilla et al., 2016) obtuvieron rendimientos cercanos a 0,95gD-AL/g de azúcares reductores, pero utilizando cepas de *Escherichia coli* modificadas metabólicamente. Cabe destacar que los hidrolizados de la semilla de aguacate empleados en la fermentación se cuantifico xilosa y arabinosa, pero no hubo presencia de estos dos compuestos desde el inicio al final de la fermentación, debido a que la mayor cantidad fue glucosa. Se observa en el tiempo de 42 h, que empieza a aparecer una concentración mínima de 0,07g/L de ácido acético incrementando hasta 1,95g/L en el tiempo final de la fermentación, se considera que esto no afecta la producción de D- Ácido Láctico debido a que la JU15 tolera concentraciones de D- Ácido Láctico

mayores a los 0,9g/L en medios experimentales (Utrilla et al., 2016).

Figura 3. Concentración Vs tiempo de la fermentación en el hidrolizado de la semilla de aguacate tipo Hass junto al medio AM1.



La productividad volumétrica es la cantidad del producto formado por litro y el tiempo final de fermentación, el cual fue de 0,97 gD-AL/L*h, este resultado va acorde a las investigaciones con la producción de Ácido láctico a diferencia de un sistema Fed-Batch 3 y empleado como biomasa suero de leche, dado que sus productividades volumétricas fueron de 0,81 gAL/L*h y 0,9 gAL/L*h (Vuan, 2018). Es correcto afirmar que al reducir los tiempos a 24 o 48h de fermentación se podría alcanzar mejores productividades en base a lo que reporta la literatura (Orozco

Olivarez, 2016), pero en este caso la productividad volumétrica que se obtuvo fue

de acuerdo a la concentración final que se produjo de D- Ácido Láctico.

CONCLUSIONES

La posibilidad de producir ácido láctico a partir de desechos agroindustriales como lo son la semilla de aguacate es una alternativa prometedora, dado que llega a ser una opción sustentable, aprovechable y prometedora, aportando en la industria biotecnológica y química también.

La composición físico químico de la semilla de aguacate en base seca tiene mayor composición en comparación a la de base húmeda, en lo que respecta a la cantidad de extractivos, cenizas y azúcares totales debido a que se trabajó completamente con la semilla sin alterar ninguna de sus propiedades, de igual forma la comparación que se realizó en base a investigaciones coincidió, el cual significa que puede ser un

material lignocelulósico eficiente para nuevos estudios.

Las condiciones óptimas para recuperar la mayor cantidad de azúcares reductores en el pretratamiento ácido, se encontraron utilizando una autoclave a 121°C y presión 20psi, utilizando Ácido sulfúrico a una concentración de 1%p/p y un tiempo de 45 minutos respectivamente.

El rendimiento máximo que se obtuvo en la fermentación fue de 96,37% (0,96gD-AL/gGLU), en un tiempo de 72 horas donde la cepa lactogénica *Escherichia coli* JU15 proporciono una productividad volumétrica de 0,97gDAL/L*h. La cepa demostró un buen consumo en base a la fuente de carbono suministrada que fue glucosa.

AGRADECIMIENTOS

1. Los autores agradecen al Dr. Alfredo Martínez Jiménez del Instituto de Biotecnología de la UNAM por facilitar la cepa *E. coli* JU15 para la realización de la presente investigación.

2. A las instalaciones del laboratorio de posgrado de ingeniería química de la Universidad Michoacana De San Nicolas De Hidalgo, por suministrar los reactivos y

equipos del laboratorio para el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aletan, U. (1 de diciembre de 2018). Proximate and Physicochemical Analysis of the Fruit and Oil Avocado Pear. *Communication in Physical Sciences*, 7, 18-26.

Almanza H. Kevin, Navarro U. Miguel, Ruiz C. Javier (2019). Extracción de colorante en polvo a partir de la semilla de aguacate en variedades *hass* y *fuerte*. *Revista @limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*. ISSN 1692-7125. Volumen 17 N° 1. Pp: 5 – 14.

Alves de Oliveira, R., Komesu, A., Vaz Rossel, C. E., & Maciel Filho, R. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 219-239. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>

Cid-Pérez Teresa Soleda, T. S., Hernández Carranza, P., Ochoa Velasco, C. E., Ruiz López, I. I., Nevárez Moorillón, G. V., & Ávila Raúl, R. (Junio de 2021). Avocado

seeds (*Persea americana* cv. Criollo sp.): Lipophilic compounds profile and biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 3384-3390. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.087>.

García Martínez, C. A., & Salmerón Vanegas, L. A. (2016). Estudio comparativo de la producción a escala de laboratorio de jarabe de glucosa por medio de la hidrólisis ácida de almidón de yuca y almidón de papa. (Tesis de Licenciatura).

Grand View Research. (2020). Grand View Research. doi:<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>.

Hernández, A. (15 de Marzo de 2018). El Dictamen. doi:<https://www.eldictamen.mx/girando-en-verde/residuos-de-aguacate-podrianconvertirse-en-biocombustible-gracias-a-cientificos-mexicanos/>

- Juarez Escobar, J., Guerrero Analco, J. A., & Zamora Briseño, J. A. (2021). Tissuespecific proteome characterization of avocado seed during postharvest shelf life. *Journal of Proteomics*, 235, 104-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104112>
- Karthikeyan, O., Trably, E., & Mharya, S. (2018). Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Tecnología de fuentes biológicas*, 1025-1039.
- Komesu, A., Roch de Oliveira, J. A., & Silva Martins, L. (2017). Lactic Acid Production to Purification: A Review. *Luiza Helena*, 4364-4383. doi:https://bioresources.cnr.ncsu.edu/wp-content/uploads/2017/04/BioRes_12_2_4364_REVIEW_Komesu_OMF_Lactic-Acid_Production_Purification_10509.pdf
- Lech, M. (6 de Febrero de 2020). Optimisation of protein-free waste whey supplementation used for the industrial microbiological production of lactic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107531>
- Mantilla Roldan, J. M., & Zavala Agreda, J. M. (2018). Extracción y Caracterización de almión de las semillas de Persea americana Mill. (Palta). Fuerte , Hass y Criolla. (Tesis de Maestria)). Universidad Nacional de Trujillo, Perú. doi:<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNI TRU/11329>
- Martínez, A., Rodríguez Alegría, M., Conceição Fernande, M., & Vargas-Tah, A. (2017). Metabolic Engineering of Escherichia coli for Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources*, 125-145. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-51729-2_5
- Morales de la Rosa, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. doi:https://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.
- Palmerín Carreño, D. M., Hernández Orihuela, A. L., & Martínez Antonio , A.



- (2019). Production of d-Lactate from Avocado Seed Hydrolysates by Metabolically Engineered Escherichia coli JU15. *Fermentation*, 5, 26. doi:<https://doi.org/10.3390/fermentation5010026>
- Santos Corona, A. M. (2020). Caracterización de Desperdicios de Alimentos de su Reúso en la Obtención de Ácido Láctico. (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México
- Sagarpa. (2017). Gobierno de México. doi:<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257067/PotencialAguacate.pdf>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, C., & Wolfe, J. (2012). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. Technical Report, National Renewable Energy Laboratory, Colorado. doi:<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42621.pdf>
- Sluiter, A., Hames, B., & Templeton, D. (2015). Determination of Ash in Biomass. Technical Report, National Renewable Energy Laboratory, Colorado. doi:<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>
- Utrilla, J., Vargas-Tah, A., & Trujillo, B. (Noviembre de 2016). Production of dlactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered Escherichia coli strains. *Bioresource Technology*, 220, 208-214. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.067>