

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



“Efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias ácido lácticas aisladas de tunta”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA:

Bach. Canales Guevara, Ana Lucero

ASESOR:

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo  
ORCID: 0000-0002-5984-0587

CO - ASESORA:

Dra. Zúñiga Dávila, Doris  
ORCID: 0000-0002-4564-6775

**Nuevo Chimbote – Perú**

**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



“Efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias ácido lácticas aisladas de tunta”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA:

Bach. Canales Guevara, Ana Lucero

**Revisado y Aprobado por el Asesor y Co-asesora**

Asesor

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo  
DNI: 06451148  
ORCID: 0000-0002-5984-0587

Co-asesora

Dra. Zúñiga Dávila, Doris  
DNI: 07851510  
ORCID: 0000-0002-4564-6775

**Nuevo Chimbote – Perú**

**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**Revisado y Aprobado Por El Jurado Evaluador:**

Dr. Azañero Díaz, Carlos

PRESIDENTE

DNI: 18093785

ORCID: 0000-0002-5612-4104

Ms. Villanueva Carlos, José  
SECRETARIO  
DNI: 32733772  
ORCID: 0000-0002-5056-0001

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo  
INTEGRANTE  
DNI: 06451148  
ORCID: 0000-0002-5984-0587

# ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS (VIRTUAL)

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, a través del WhatsApp y de manera remota, siendo las **11:00 horas del día viernes 10 de setiembre del 2021**, dando cumplimiento a la Resolución N° 205-2021-UNS-FC Virtual, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. **CARLOS AZAÑERO DÍAZ**, teniendo como miembros a **BLGO. MCBLGO. JOSÉ VILLANUEVA CARLOS** (secretario)(a), y **MSC. ÁNGEL CASTRO ALVARADO** (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Lic. En Biotecnología realizado por la tesista **Ana Lucero Canales Guevara (Cód. 1123038)** de la Escuela Profesional de Biotecnología, quien sustentó la tesis intitulada: "**Efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias ácido lácticas aisladas de tunta**"

Terminada la sustentación, la tesista respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **MUY BUENO** asignándole un calificativo de **18 puntos**. (Art. 24º inc. a, b, c, d, e, f – Directiva N° 003-2020-UNS-VRAC: ADECUACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE GRADOS ACADÉMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES MEDIANTE TRABAJO NO PRESENCIAL VIRTUAL EN LA UNS).

Siendo las **13:00 horas** del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Nombre: CARLOS AZAÑERO DÍAZ

Presidente

José Manuel Villanueva Carlos  
BIOLOGO - MICROBIOLOGO  
CIP 4399

Nombre: JOSE VILLANUEVA CARLOS

Secretario

Nombre: ÁNGEL CASTRO ALVARADO

Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesistas (01) y archivo (02).




## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Ana Lucero Canales Guevara  
Título del ejercicio: Revisión 1  
Título de la entrega: "Efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias ácido lácticas aisladas de tunta"  
Nombre del archivo: TESIS\_-\_LUCERO\_CANALES.docx  
Tamaño del archivo: 5.85M  
Total páginas: 102  
Total de palabras: 24,693  
Total de caracteres: 128,304  
Fecha de entrega: 29-ene.-2024 02:40p. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entrega: 2272716139



# “Efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias ácido lácticas aisladas de tunta”

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="#">hdl.handle.net</a>	3%
2	<a href="#">purl.org</a>	2%
3	<a href="#">ri.conicet.gov.ar</a>	1%
4	<a href="#">nutricionpersonalizada.blog</a>	<1%
5	<a href="#">Submitted to Universidad Nacional Agraria La Molina</a>	<1%
6	<a href="#">repositorio.uns.edu.pe</a>	<1%
7	<a href="#">tesis.ipn.mx</a>	<1%
	<a href="#">orcid.org</a>	

## **DEDICATORIA**

A mi madre Ana, que es una excelente madre por brindarme en todo momento su tiempo, apoyo y amor incondicional e impulsarme a cumplir mis metas.

A mi padre Sergio, por todo su esfuerzo puesto para lograr convertirme en una profesional.

A mi hermosa hija Sophia, que la amo demasiado y fue mi impulso para realizar el presente trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradezco a Jehová, por haberme cuidado y guiado siempre a lo largo de mi vida, por haberme otorgado unos padres muy buenos y responsables, y a mi bella hija.

A la Dra. Doris Zúñiga Dávila, por recibirme con mucha cordialidad primero como practicante, luego como tesista para realizar la presente tesis en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología que dirige, perteneciente al Departamento de Biología, Facultad de Ciencias – Universidad Nacional Agraria La Molina.

Al proyecto INNOVATE N° 223-FINCYT-PIAP-2013: “Valoración de la diversidad de microorganismos importantes en el proceso de fermentación de productos tradicionales derivados de papa para la caracterización de metabolitos con potencial aplicación biotecnológica” por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, que me brindaron su amistad e hicieron que mi estadía en el laboratorio sea más amena, en especial Ricardo Santos por haberme guiado durante mi estadía en el laboratorio.

A mi asesor M. Sc. Ángel Castro Alvarado, gracias por su gran apoyo y su guía durante la realización del presente trabajo y durante mi formación profesional. A todos mis profesores de la universidad en especial al Blgo-Mcblgo. José Villanueva, Dr. Roberto Vega, M. Sc. Willian Capa, M. Sc. Daniel Oré, Blgo-Mcblgo. Dr. Carlos Azañero, M. Sc. Eterio Alva, por sus enseñanzas y sus experiencias compartidas en el salón de clases.

A mi familia, por el continuo esfuerzo, apoyo y amor tanto de mis padres como el que me ha brindado mi hermana Paola. Gracias a toda mi familia por ayudarme con el cuidado de mi hija y así poder culminar con el presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos.....	6
1.1.1. Objetivo General.....	6
1.1.2. Objetivos Específicos .....	6
1.2. Hipótesis .....	6
1.3. Justificación.....	7
1.4. Variables.....	7
II. MARCO TEÓRICO .....	8
2.1. Tunta.....	8
2.2. Melaza de caña de azúcar .....	12
2.2.1. Composición de melaza de caña de azúcar .....	13
2.2.2. Proceso de obtención de melaza de caña de azúcar.....	14
2.2.3. Propiedades fisicoquímicas .....	15
2.2.4. Usos de la melaza de caña de azúcar.....	17
2.2.5. Producción de azúcar en Perú.....	17
2.3. Manitol.....	18
2.3.1. Propiedades fisicoquímicas .....	18
2.3.2. Fuentes naturales de manitol .....	19
2.3.3. Producción de manitol .....	19
2.3.4. Aplicaciones .....	24
2.4. Bacterias ácido lácticas.....	25
2.4.1. Taxonomía de las Bacterias Ácido Lácticas .....	26

2.4.2. Metabolismo de bacterias ácido lácticas .....	27
2.4.3. Producción de manitol por bacterias ácido lácticas .....	32
a.    Producción de manitol en BAL homofermentativas .....	32
b.    Producción de manitol en BAL heterofermentativas .....	33
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
Población .....	34
Muestra .....	34
3.1. Reactivación de bacterias ácido lácticas aisladas de tunta .....	34
3.2. Selección de bacterias ácido lácticas heterofermentativas y aisladas de tunta....	34
3.3. Comparación de bacterias ácido lácticas heterofermentativas aisladas de tunta con respecto a la producción de manitol .....	35
3.4. Producción de manitol a partir de melaza de caña de azúcar mediante bacteria ácido láctica aislada de tunta y la determinación de azúcares en la melaza .....	35
3.4.1. Medición de pH .....	36
3.4.2. Análisis mediante HPLC .....	36
3.5. Análisis estadístico .....	37
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1. Selección de bacterias heterofermentativas en medio MRS para la producción de manitol .....	38
4.2. Comparación de bacterias ácido lácticas heterofermentativas aisladas de tunta con respecto a la producción de manitol .....	40
4.3. Producción de manitol a partir de melaza de caña de azúcar mediante la cepa 1TP10-BL03 .....	42
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>IX. ANEXOS.....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de variables .....	7
<b>Tabla 2.</b> Variedades de papas utilizadas para producir tunta.....	8
<b>Tabla 3.</b> Composición nutricional de 100 g de tunta .....	9
<b>Tabla 4.</b> Composición de la melaza de caña de azúcar.....	13
<b>Tabla 5.</b> Producción de manitol mediante fermentación microbiana .....	22
<b>Tabla 6.</b> Resultado de producción de CO <sub>2</sub> de 41 cepas BAL aisladas de tunta.....	38
<b>Tabla 7.</b> Morfología celular de las 10 cepas BAL heterofermentativas .....	39
<b>Tabla 8.</b> Producción de manitol de 10 cepas BAL aisladas de tunta.....	40
<b>Tabla 9.</b> Velocidad específica de crecimiento de 1TPBL10-BL03 para cada tratamiento desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación. ....	49
<b>Tabla 10.</b> Consumo total de fructosa, producción de manitol, rendimiento de manitol (Y <sub>p/s</sub> ) y productividad volumétrica mediante la cepa 1TP10-BL03 a las 24 h de fermentación a 28 °C .....	50
<b>Tabla 11.</b> Ln UFC/mL desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el control (medio MRS) .....	74
<b>Tabla 12.</b> Ln UFC/mL desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 10% MRSmc .....	75
<b>Tabla 13.</b> Ln UFC/mL desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 15% MRSmc .....	76
<b>Tabla 14.</b> Ln UFC/mL desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 20% MRSmc .....	76
<b>Tabla 15.</b> Resultados de consumo de glucosa y fructosa de las 10 BAL evaluadas en caldo mMRS .....	78
<b>Tabla 16.</b> Producción de manitol de las 10 cepas BAL evaluadas desde las 0 h hasta las 24 h en medio mMRS .....	79
<b>Tabla 17.</b> pH de las 10 cepas BAL evaluadas en caldo mMRS .....	79
<b>Tabla 18.</b> UFC de las 10 cepas BAL evaluadas en medio mMRS .....	80

<b>Tabla 19.</b> Consumo de glucosa libre (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS) .....	80
<b>Tabla 20.</b> Consumo de sacarosa (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS) .....	81
<b>Tabla 21.</b> Consumo de fructosa libre (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS) .....	81
<b>Tabla 22.</b> Producción de manitol (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS) .....	82
<b>Tabla 23.</b> Producción de ácido láctico (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS) .....	83
<b>Tabla 24.</b> Producción de ácido acético (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS) .....	83
<b>Tabla 25.</b> UFC/mL de la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS) .....	84
<b>Tabla 26.</b> pH de las fermentaciones con diferentes medios MRSmc y en control (MRS) mediante la cepa 1TP10-BL03 .....	84

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Elaboración de tunta en el distrito de Ilave, provincia El Collao - Puno, (A) inmersión en agua de río de papas, (B) secado de la tunta encima de una malla y paja, (C) selección de tunta .....	10
<b>Figura 2.</b> Diagrama de bloques del proceso de elaboración de la tunta .....	11
<b>Figura 3.</b> Proceso de elaboración de melaza de caña de azúcar .....	16
<b>Figura 4.</b> Estructura química de D-manitol .....	19
<b>Figura 5.</b> Producción de manitol mediante manitol 2-deshidrogenasa (MDH).....	20
<b>Figura 6.</b> Regeneración de coenzima NADH, obteniendo manitol y ácido glucónico..	21
<b>Figura 7.</b> Regeneración de coenzima NADH, obteniendo manitol y CO <sub>2</sub> .....	22
<b>Figura 8.</b> Taxonomía de las bacterias ácido lácticas. Solo se colocaron algunas especies como ejemplo .....	27
<b>Figura 9.</b> Ruta metabólica de fermentación para hexosas de BAL homofermentativa .	29
<b>Figura 10.</b> Ruta metabólica de fermentación para hexosas de BAL heterofermentativa .....	31
<b>Figura 11.</b> Formación de CO <sub>2</sub> en campanas Durham producidas por BAL heterofermentativas (lado izquierdo) y BAL homofermentativas que no produjeron CO <sub>2</sub> (lado derecho). ....	39
<b>Figura 12.</b> Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y fructosa, y producción de manitol de la cepa 1TP10-BL03.....	41
<b>Figura 13.</b> Producción de manitol y consumo de fructosa y glucosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio MRS (Control) .....	43
<b>Figura 14.</b> Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio MRS (control) .....	43
<b>Figura 15.</b> Producción de manitol y consumo de fructosa, glucosa y sacarosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio 10% MRSmc .....	44
<b>Figura 16.</b> Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio 10% MRSmc .....	45
<b>Figura 17.</b> Producción de manitol y consumo de fructosa, glucosa y sacarosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio 15% MRSmc. ....	46
<b>Figura 18.</b> Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio 15% MRSmc .....	46

<b>Figura 19.</b> Producción de manitol y consumo de fructosa, glucosa y sacarosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio 20% MRSmc .....	47
<b>Figura 20.</b> Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio 20% MRSmc .....	48
<b>Figura 21.</b> Recuento en placa por diluciones seriadas.....	73
<b>Figura 22.</b> Regresión lineal de las 3 réplicas de tiempo vs Ln UFC/mL, desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar $\mu$ de la cepa 1TP10-BL03 en el control (medio MRS)75	
<b>Figura 23.</b> Regresión lineal de las 3 réplicas tiempo vs Ln UFC/mL, desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar $\mu$ de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 10% MRSmc.....	75
<b>Figura 24.</b> Regresión lineal de las 3 réplicas de tiempo vs Ln UFC/mL, desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar $\mu$ de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 15% MRSmc. 76	
<b>Figura 25.</b> Regresión lineal de las 3 réplicas de tiempo vs Ln UFC/mL, desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar $\mu$ de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 20% MRSmc. 77	

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Composición de medio de cultivo y reactivos usados .....	71
<b>Anexo 2.</b> Metodología de actividades realizadas .....	72
<b>Anexo 3.</b> Datos los resultados obtenidos.....	78
<b>Anexo 4.</b> Análisis estadístico .....	85

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias ácido lácticas aisladas de tunta. Primero se seleccionaron solo bacterias heterofermentativas, luego se seleccionó la cepa 1TP10-BL03 (*Lactobacillus curvatus*) siendo la mejor bacteria productora de manitol a partir de fructosa luego de un screening con 9 cepas más. La producción de manitol se evaluó usando diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar 10%, 15% y 20% en medio MRSmc (melaza en lugar de glucosa) a pH libre, 28 °C y agitado a 100 rpm durante 48 h. La bacteria 1TP10-BL03 en los tres medios evaluados creció y produjo manitol a partir de fructosa. Sin embargo, produjo mayor concentración de manitol en los medios 15% MRSmc ( $16.21 \pm 0.57$  g/L) y 20% MRSmc ( $17.01 \pm 0.40$  g/L) a las 48 h, pero no hubo diferencia significativa con la producción de manitol a las 24 h. Finalmente, se logró mayor producción de manitol en medio 15% MRSmc con un rendimiento de [Y<sub>p/s</sub>= 1 g/g], una productividad volumétrica de 0.68 g/L h y una velocidad específica de crecimiento de 0.39 h<sup>-1</sup> mediante la cepa 1TP10-BL03 (*Lactobacillus curvatus*). No se ha encontrado referencia de algún estudio que utilice *Lactobacillus curvatus* en un medio simplificado o de bajo costo que manipule alguna variable para la producción de manitol.

**Palabras clave:** manitol, tunta, melaza de caña de azúcar, bacteria ácido láctica heterofermentativa, *Lactobacillus curvatus*.

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of the sugarcane molasses concentration on the production of mannitol in batch culture at flask level using lactic acid bacteria isolated from tunta. First, heterofermentative bacteria were selected (10 bacterias), then 1TP10-BL03 strain was selected as a good producer of mannitol from fructose after screening 9 bacterial strains. Mannitol production was evaluated using different concentrations, 10%, 15% and 20% of sugarcane molasses in MRSmc medium (molasses instead of glucose) at free pH, 28 ° C and stirred at 100 rpm for 48 h. The 1TP10-BL03 (*Lactobacillus curvatus*) strain grew well and produced mannitol from fructose in all assayed media. However, 1TP10-BL03 produced a higher concentration of mannitol in the 15% MRSmc ( $16.21 \pm 0.57$  g / L) and 20% MRSmc ( $17.01 \pm 0.40$  g / L) at 48 h, due to low increase of mannitol since 24 h to 48 h did not have a significantly statistic difference with the production of mannitol. Therefore, higher mannitol production was achieved in 15% MRSmc medium with a yield [Y<sub>p/s</sub>= 1 g/g], volumetric productivity of mannitol (0.68 g / L h) and specific growth rate 0.39 h<sup>-1</sup> by the strain 1TP10-BL03 (*Lactobacillus curvatus*). We have not found a reference or any study that uses *Lactobacillus curvatus* in simplified or low-cost medium and manipulates any variable for the production of mannitol.

**Keywords:** mannitol, tunta, sugarcane molasses, heterofermentative lactic acid bacteria, *Lactobacillus curvatus*.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de años el hombre andino ha mejorado y aclimatizado diferentes variedades de papa para su cultivo en condiciones de heladas y alturas elevadas mayores a 3 800 m.s.n.m. condiciones que se encuentran en el altiplano peruano.

Existe una técnica ancestral a base de fermentación de la papa que se sigue realizando hasta la actualidad en la sierra sur de Perú y norte de Bolivia dando como producto final a la “tunta” en zonas de habla aymara y conocido como “moraya” en zonas de habla quechua, esta técnica logra un mayor tiempo de almacenamiento de hasta 1 año de la papa fermentada “tunta” a comparación de lo que duraría la papa normalmente. Se emplea papa dulce *Solanum tuberosum* spp. *andigena* así como variedades de papas no comestibles que poseen glicoalcaloides que son los responsables del sabor amargo de las papas, dentro de las cuales se encuentran las variedades *Solanum juzepczukii* y *Solanum curtilobum*. (Fonseca, et al., 2008; Gianella, 2004)

La tunta se produce a partir de la selección y clasificación de la papa a utilizar luego es congelada al ambiente, se realiza una fermentación natural en el río usando redes para mantener sumergidas las papas, posteriormente se congela, se descascara, se lava y finalmente se realiza un venteo. Durante la fermentación natural de la papa sumergida en el río se encuentran también las bacterias ácido lácticas (BAL) entre otros microorganismos (Ramos, et al., 2018). Por lo tanto, las existencias de las BAL se encuentran en muchos productos fermentados, siendo la tunta uno de ellos, además habitan en ambientes ricos en carbohidratos y proteínas. Durante su fermentación producen ácido láctico que modifica las propiedades organolépticas, reológicas y nutritivas del alimento en el que se encuentren. Las BAL son Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativa, ácido tolerante, anaerobio facultativo. Son consideradas organismos Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS). Las especies más comunes pertenecen al género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*. Existen BAL, homofermentativas que producen principalmente ácido láctico y heterofermentativas que además de producir ácido láctico, también producen una gran variedad de compuestos en la fermentación como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y manitol. (Mozzi, et al., 2010)

El manitol, es el poliol más abundante en la naturaleza, es un alcohol de azúcar con 6 átomos de carbono. Contiene 1.6 calorías por cada gramo, lo que equivale al 40% del valor calórico del azúcar, pero su nivel de dulzura es solamente el 50% en comparación con el azúcar (referencia: 4 cal/g). Posee un índice glucémico notablemente bajo, marcando tan solo un 2, en contraste con el índice glucémico del azúcar que es de 65. Por ello, resulta altamente apropiado para personas con diabetes, también a que solo es metabolizable parcialmente por el humano (Griffin & Lynch, 1972). En la actualidad, la producción industrial de manitol se realiza por hidrogenación catalítica de mezcla de jarabes de 50/50 fructosa/glucosa teniendo como resultado aproximadamente 25/75 de manitol/sorbitol, siendo un rendimiento bajo. Es por ello que se busca mejorar el rendimiento de producción de manitol utilizando fermentaciones con BAL, puesto que estas transforman la fructosa en manitol mediante la enzima manitol deshidrogenasa dependiente de NADPH.

Saha & Nakamura (2003) realizaron un screening a partir de 72 cepas bacterianas, seleccionando a *Lactobacillus intermedius* B-3693 como la cepa de mayor producción de manitol partiendo de fructosa como sustrato. Dicha bacteria produjo manitol, ácido láctico y ácido acético a partir de fructosa en fermentación batch a pH controlado. Los rendimientos de manitol, ácido láctico y ácido acético a partir de 250 g/L de fructosa fueron de 0.70, 0.16 y 0.12 g, respectivamente, por g de fructosa consumida.

La fermentación por lote alimentado disminuyó el tiempo de producción máxima de manitol a partir de fructosa (300 g/L) de 136 a 92 h. Un tercio de la fructosa podría sustituirse por glucosa, maltosa, galactosa, manosa, rafinosa o almidón con glucoamilasa (sacarificación y fermentación simultáneas), y dos tercios de fructosa podrían sustituirse por sacarosa. *L. intermedius* B-3693 no co-utilizó lactosa, cellobiosa, glicerol o xilosa con fructosa. Produjo ácido láctico y etanol, pero no ácido acético de la glucosa. La bacteria mencionada produjo  $21.3 \pm 0.6$  g de ácido láctico,  $10.5 \pm 0.3$  g de ácido acético y  $4.7 \pm 0.0$  g de etanol por litro de caldo de fermentación a partir de fibra de maíz hidrolizada.

Carvalheiro, *et al.* (2010) caracterizaron cinéticamente ocho bacterias lácticas productoras de manitol, entre los géneros de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, se realizó utilizando un medio de cultivo basado en jarabe de algarrobo. Los cultivos fueron cuidadosamente muestreados durante 30 h para evaluar la degradación de azúcares, así

como la producción de biomasa y metabolitos. Todas las cepas produjeron manitol a altos rendimientos ( $>0.70$  g de manitol/g de fructosa) y productividades volumétricas ( $>1,31$  g /L h), consumiendo fructosa y glúcidos simultáneamente, pero la tasa de asimilación de fructosa fue siempre mayor. Los resultados obtenidos permiten dividir las cepas estudiadas principalmente en dos grupos: uno para el cual las tasas de asimilación de glucosa fueron inferiores a 0,78 g / L h y el otro para el cual oscilaron entre 1,41 y 1,89 g / L h. Estos grupos también mostraron diferentes velocidades de producción de manitol y rendimientos, siendo mayor para las cepas con asimilación de glucosa más rápida. Además del manitol, todas las cepas produjeron también ácido láctico y ácido acético. El mejor rendimiento de manitol lo obtuvo la cepa *L. fructosum* NRRL B-2041, con una productividad volumétrica máxima de 2,36 g / L h.

Rodríguez, *et al.* (2012) investigaron la producción de manitol por *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 y *Lactobacillus fermentum* CRL 573 en medio MRS modificado que contenía una mezcla de fructosa y glucosa en una proporción de 6.5:1 en cultivo batch con pH libre y pH constante de 6.0 y 5.0. La producción de manitol y los rendimientos fueron mayores en condiciones de pH constantes en comparación con fermentaciones a pH libre, siendo el aumento más pronunciado para la cepa de *L. fermentum* ( $Y_p/s = 0.55$  mol mol $^{-1}$  en pH libre). La producción máxima de manitol fue de 122 mM y el rendimiento a partir de fructosa fue de 0.757 mol mol $^{-1}$  para *L. reuteri* CRL 1101, mientras que para *L. fermentum* CRL 573, obtuvo una producción máxima de manitol de 312 mM y un rendimiento de 0.935 mol mol $^{-1}$ , se encontraron a pH 5.0. Mientras que, si depende de las condiciones de pH, la fructosa se usó como aceptor de electrones externo alternativo o como aceptor de electrones y fuente de energía en el caso de la cepa *L. reuteri*. Sin embargo, *L. fermentum* CRL 573 usa la fructosa tanto como aceptor de electrones como fuente de carbono simultáneamente, independientemente del valor de pH 5 ó 6. Se basan en el rendimiento de manitol a partir de fructosa ya que si este fuese de 1 mol mol $^{-1}$  se entendería que la fructosa actuó como aceptor de electrones exclusivamente y se reduciría la fructosa en su totalidad a manitol.

Yue, *et al.* (2013) aislaron *Lactobacillus brevis* 3-A5, trabajaron a pH libre y pH constante en dos etapas tanto en cultivo batch como en cultivo por lote alimentado. A pH libre (6.5 a 4.1) obtuvieron un rendimiento de manitol de 0.72 g/g y una productividad volumétrica de 1.49 g/L h.

Durante las 48 h de cultivo batch a pH constante y libre, el pH óptimo para el crecimiento celular y la producción de manitol en las primeras 24 h de incubación fue de 5.5, mientras que para la producción de manitol en las siguientes 24 h de incubación fue de 4.5. Para lograr una alta densidad celular y rendimiento de manitol simultáneamente, se propuso una estrategia de control del pH en dos etapas basada en el análisis cinético de la producción de manitol. El valor de pH se controló a 5.5 durante las primeras 12 h de fermentación y posteriormente se desplazó a 4.5 hasta que se completó la fermentación. Bajo la doble etapa de control de pH durante la fermentación batch, se obtuvo una producción de 103 g/L ( $Y_p/s = 98.9 \text{ mol mol}^{-1}$ ) de manitol con una productividad volumétrica de 3.7 g/L h que se logró después de 28 h. Mientras que, en un cultivo por lote alimentado con control de pH en dos etapas, para mejorar el rendimiento de manitol, donde la producción de manitol aumentó en un 109% a 215 g/L ( $Y_p/s = 88.6 \text{ mol mol}^{-1}$ ) y una productividad volumétrica de 2.2 g/L h después de 98 h de fermentación.

Zakaria & Ahmed (2014) trabajaron con *Lactobacillus brevis* NM 101-1 en cultivo batch a pH libre con melaza de caña de azúcar, como fuente de carbono. La melaza la hidrolizaron con ácido sulfúrico. A las 48 h de fermentación se produjo 74.38 g/L de manitol con un rendimiento de manitol a partir de fructosa de 0.72 g/g y una productividad volumétrica de 1.55 g/L h.

Patra, *et al.* (2011) aislaron 210 cepas productoras de manitol de *Leuconostoc spp.* A partir de leche cruda, leches fermentadas, alimentos de cereales fermentados, frutas, verduras y jarabe de azúcar. Durante la exploración inicial, la mitad de la población de estos aislamientos (105) mostraron capacidad para producir manitol. Sólo el 11.4% de cepas aisladas produjeron un rendimiento de manitol superior al 80% (cuando se usó fructosa a 50 g/L). Se estudiaron dos factores, temperatura y pH, ambos afectaron el crecimiento y la producción de manitol para los cuatro aislamientos productores de manitol. La alta producción de manitol fue favorecida por la temperatura de 35 °C y el pH de 6.5. Los aislamientos tuvieron una alta tolerancia osmótica ya que se usó una concentración de fructosa tan alta como 100 g/L en cultivo batch.

Racine & Saha (2007) desarrollaron procesos de fermentación mejorados para la producción de manitol por una BAL heterofermentativa (*Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693). El cultivo se desarrolló utilizando el licor de maíz macerado y la glucosa

como fuentes de nutrientes industriales de bajo costo, suplementadas con una pequeña cantidad de peptona de soja y manganeso. El proceso por lote alimentado dio como resultado una concentración de  $176 \pm 0.5$  g de manitol de  $184 \pm 0$  g de fructosa y  $92 \pm 0.1$  g de glucosa por L de caldo de fermentación en 30 h con una productividad volumétrica de 5.9 g/L h. Se obtuvieron aumentos adicionales en la productividad volumétrica del manitol en un proceso continuo de fermentación celular-reciclado que alcanzó más de 40 g/L h, a pesar de los niveles reducidos de manitol de 78-98 g/L y sustrato residual de 10-20 g/L. Este es el primer informe de una alta productividad volumétrica de manitol por una bacteria ácido láctica heterofermentativa.

Weymarn, *et al.* (2002) Compararon ocho bacterias ácido lácticas heterofermentativas en cuanto a su capacidad para convertir D-fructosa en D-manitol. Se identificaron cuatro cepas prometedoras y se evaluaron los efectos de la temperatura de crecimiento, pH y nitrógeno sobre la producción de manitol en biorreactores con cultivo tipo batch. Se observó que una alta temperatura de crecimiento mejora el rendimiento de manitol a partir de fructosa con *Lactobacillus fermentum*. Se incubó *Lb. fermentum* a 25, 30 y 35 °C, obteniéndose rendimientos de  $86.4 \pm 0.8$ ,  $88.9 \pm 2.4$  y  $93.6 \pm 0.6$  molmol<sup>-1</sup>, respectivamente. En general, se encontró que el lavado constante con gas nitrógeno del medio de crecimiento mejoraba los rendimientos de manitol, pero no las productividades volumétricas de manitol. La cepa más prometedora fue sometida a un cultivo batch, donde se obtuvieron productividades volumétricas de manitol, promedio alto y máximo 7,6 y 16,0 g / L h, respectivamente.

Visto los antecedentes del presente estudio, la concentración de fuente de carbono y el pH cumple un rol importante en la producción de manitol. Sin embargo, la investigación se centrará en evaluar el efecto de la concentración de fuente de carbono y en estudios posteriores se evaluaría el efecto del pH en la producción de manitol, complementando así los resultados que se obtengan en el presente estudio. Según lo anteriormente expuesto se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es el efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias ácido lácticas aisladas de tunta?

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto de la concentración de melaza de caña de azúcar en la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz mediante bacterias acido lácticas aisladas de tunta.

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- Seleccionar bacterias ácido lácticas heterofermentativas aisladas de tunta en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) para la producción de manitol en cultivo por lote a nivel de matraz.
- Seleccionar la bacteria ácido láctica heterofermentativa que produjo mayor rendimiento de manitol a partir de fructosa ( $Y_p/s$ ) y mayor productividad volumétrica de manitol ( $Q_p$ ) en medio mMRS (medio MRS con 0.5% ( $p/v$ ) de glucosa y 0.5% ( $p/v$ ) de fructosa en lugar de 20 g/L de glucosa).
- Determinar la concentración de melaza de caña de azúcar para una mayor producción de manitol, teniendo en cuenta el  $Y_p/s$  y  $Q_p$ , y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa seleccionada en el medio de cultivo MRSmc (medio MRS con melaza de caña de azúcar en lugar de 20 g/L de glucosa)

## **1.2. Hipótesis**

El cultivo de una bacteria acido láctica aislada de tunta a diferentes concentraciones de melaza de caña de azúcar (20%, 15% y 10%), logra mayor producción de manitol con una concentración del 15% en cultivo por lotes.

### **1.3. Justificación**

Perú cuenta con una amplia variedad de especies de papa, que son fermentadas en el altiplano, siendo el nicho ecológico para hallar este tipo de bacterias con potencial de producción de manitol, cabe resaltar que en tal nicho no solo se encuentran las bacterias acido lácticas, sino un consorcio bacteriano además de levaduras, que desempeñan una función crucial en el proceso de degradación del almidón de la papa durante la fermentación, siendo de esta manera un sustrato metabolizable por bacterias acido lácticas. El aislamiento de bacterias ácido lácticas puede darse también a partir de productos lácteos como el queso, yogur, kéfir, kumis o laban, también de productos fermentados a base de col china como el kimchi o a base de soya como el doenjang y productos cárnicos. La investigación sobre la producción de manitol a partir de bacterias acido lácticas procedente de papa fermentada es importante, ya que en el país son pocos los estudios realizados, siendo este el motivo del presente trabajo.

### **1.4. Variables**

- Independiente**

Concentración de melaza de caña de azúcar (10%, 15% y 20%)

- Dependiente**

Producción de manitol (g/L)

**Tabla 1.** Operacionalización de variables

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADORES
Independiente	Concentración de melaza de caña de azúcar.	Proporción peso/volumen de melaza de caña de azúcar con respecto al medio de cultivo.	Porcentaje (%)
Dependiente	Producción de manitol	Concentración de manitol obtenida a partir de la fermentación.	Concentración (g/L)

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Tunta

Desde la era precolombina, la tunta se ha encontrado en los Andes centrales, específicamente alrededor de la altiplanicie del lago Titicaca, en la cultura Tiwanaku. Aunque desapareció en el siglo XII de nuestra era, esta evidencia nos proporciona una perspectiva sobre la persistencia en la elaboración de la tunta hasta el día de hoy en las comunidades indígenas (Sirpa & Mejía, 2004).

El chuño blanco o moraya en quechua y tunta en aymara, consiste en darle un valor agregado a las papas nativas amargas (*Solanum juzepczukii* y *S. curtilobum*) como papas nativas dulces y mejoradas resistentes a climas muy fríos (Tabla 2). Se suelen emplear las variedades *Locka* y *Yana imilla* entre junio y julio. Mientras que en julio y agosto emplean exclusivamente la variedad mejorada *Chaska* (Fonseca, *et al.*, 2008).

**Tabla 2.** Variedades de papas utilizadas para producir tunta.

Tipo de papa	Especie	Nombre común
Nativa amarga	<i>S. juzepczukii</i>	Piñaza, Lucki,
	<i>S. curtilobum</i>	Locka, Choquepito, Parina
Nativa dulce	<i>S. tuberosum</i>	Imilla negra, Imilla
	spp andigena	blanca, Sani imilla, Peruanita, Palita
Mejorada	<i>S. tuberosum</i>	Canchán, Chaska,
	spp andigena	Perricholi, otros.

FUENTE: Fonseca, *et al.*, 2008

La tunta es de color blanco, forma alargada o redonda, la forma de la papa depende de la variedad empleada (Fonseca, *et al.*, 2008). La tunta se obtiene mediante un proceso natural de deshidratación de la papa, hasta obtener un 14 % a 16 % de humedad aprox. aprovechándose las condiciones climáticas del altiplano durante los meses de junio, julio y agosto que presenta una fuerte diferencia de temperatura entre el día y la noche (de 18 °C a -10 °C) (Fonseca, *et al.*, 2011).

Destacándose en su composición nutricional la concentración de almidón, otorgándole un alto valor calórico, y el contenido calcio y el hierro (Tabla 3), que a comparación de la

papa amarga posee 34 mg más de calcio y 0.5 mg más de hierro (Reyes García, *et al.*, 2017).

**Tabla 3.** Composición nutricional de 100 g de tunta

Composición	Cantidad
Energía	323 Kcal
Agua	18.10 g
Proteína	1.90 g
Carbohidratos	77.70 g
Grasa	0.50 g
Cenizas	1.80 g
Calcio	92 mg
Fósforo	54 mg
Hierro	3.30 mg
Tiamina	0.03 mg
Riboflavina	0.04 mg
Niacina	0.38 mg
Vitamina C	1.10 mg

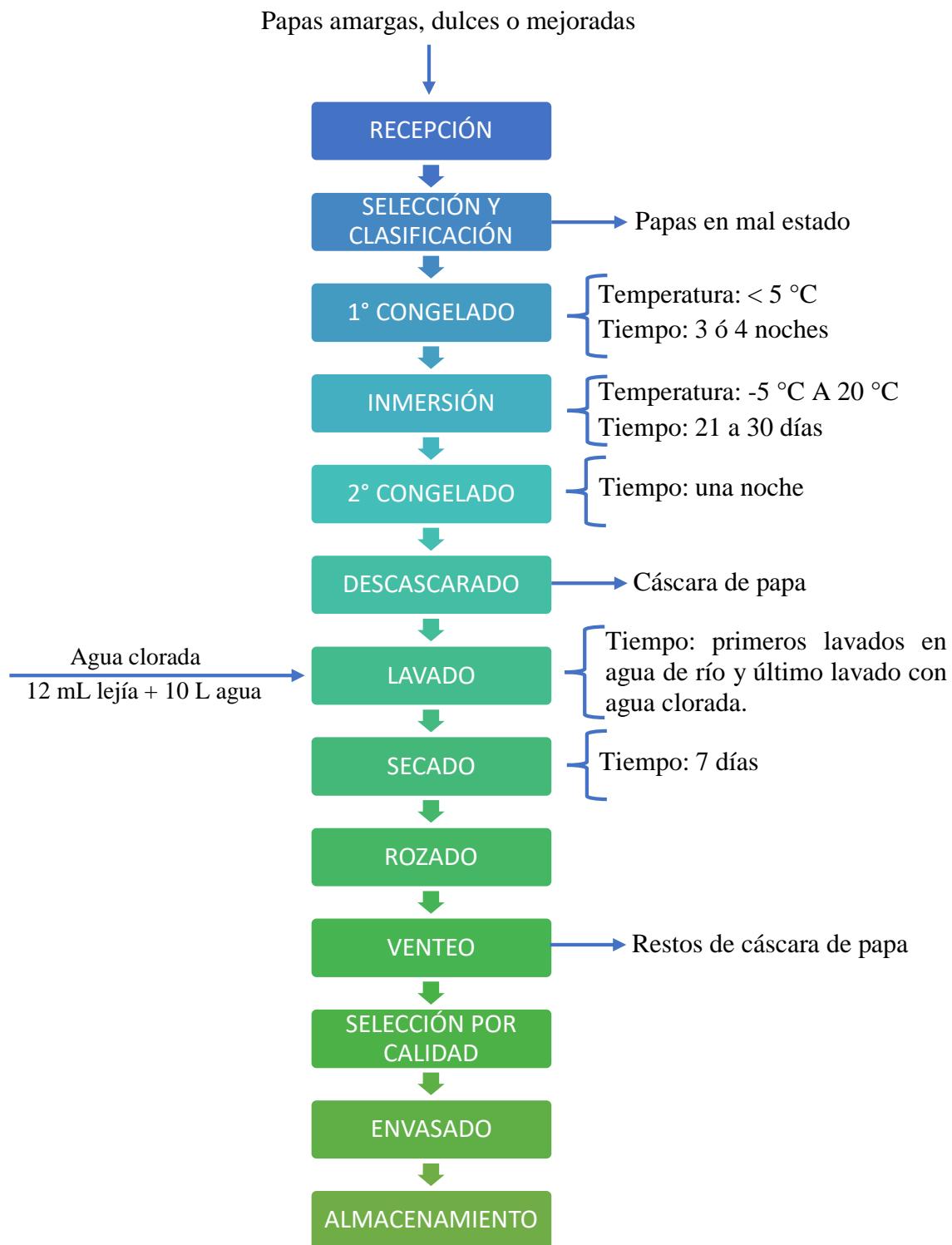
FUENTE: Reyes García, *et al.*, 2017

La transformación de papa a tunta consiste en la recepción de la papa, siendo esta de la propia cosecha de productores de tunta o de lugares aledaños como papa dulce o mejorada, luego se seleccionan las papas sanas de las dañadas, es decir, se separan las papas partidas, podridas o agusanadas luego se clasifican de acuerdo al tamaño y a la variedad de la papa para un congelamiento uniforme durante la helada que se realiza durante 3 a 4 noches seguidas, cubriendolas del sol con mantas durante el día. Después se remojan las papas en agua corriente (ríos o lagunillas) usando una malla para retenerlas entre 21 a 30 días (Figura 1A), donde los glicoalcaloides (responsables del sabor amargo de la *papa nativa amarga*) son eliminados. Posteriormente se congela por segunda vez durante una noche, las papas ya escurridas se colocan encima de una malla que a su vez está encima de paja para que se pueda orear mejor y escurrir los excedentes de agua, a continuación, se descascara pisando las papas usando botas de jebe para luego lavarlo en agua de río y finalmente lavarlo con agua clorada; más tarde se procede al secado (Figura 1B), se extienden las tuntas encima de una malla que a su vez está encima de paja para

que se expongan al sol uniformemente y a las heladas nocturnas durante 7 días, luego se realiza el rozado para terminar de pelar la tunta y el venteo para separar las cáscaras. Finalmente, la tunta es seleccionada de acuerdo a su tamaño y color, siendo la de mejor calidad la más grande y de color blanco sin tonos amarillentos (Figura 1C), por último se envasa en sacos de polipropileno y se almacena encima de parihuelas y en un lugar limpio y cerrado (Fonseca, *et al.*, 2008). El proceso de la elaboración de la tunta se puede observar en la Figura 2.



**Figura 1.** Elaboración de tunta en el distrito de Ilave, provincia El Collao - Puno, (A) inmersión en agua de río de papas, (B) secado de la tunta encima de una malla y paja, (C) selección de tunta.



**Figura 2.** Diagrama de bloques del proceso de elaboración de la tuna.  
FUENTE: Fonseca, *et al.*, 2008; Ramos, *et al.*, 2018

Durante el proceso de inmersión en agua corriente para la elaboración de tunta, se realiza una fermentación natural , se ha reportado la presencia de levaduras y bacterias ácido lácticas presentándose en mayor porcentaje la familia *Lactobacillaceae*, luego la familia *Leuconostocaceae* y por último la familia *Enterococcaceae*, siendo *Lactobacillus curvatus* la bacteria que predomina desde principio a fin durante todo el proceso de la elaboración de la tunta (Ramos, *et al.*, 2018). Adicionalmente, estos microorganismos contribuyen a la transformación de la *papa nativa amarga*, poseedoras de glicoalcaloides totales (TGA) de 12.4 a 24.4 mg TGA 100 g<sup>-1</sup> de papa (Cardenas, 2018) ya que el sabor amargo de la papa es claramente perceptible cuando la cantidad mínima de TGA está en el rango de 14 a 15 mg 100 g<sup>-1</sup> (Osman, 1983), convirtiéndolo en un alimento con sabor agradable al paladar y de larga duración de hasta 20 años (Gil, 2017) lográndose así la seguridad alimentaria en el altiplano peruano.

Por otro lado, la producción a nivel nacional de tunta se encuentra en la Región Puna sobre los 3800 m.s.n.m., destacándose Puno, específicamente en la provincia El Collao y su distrito Ilave, comercializándose la tunta de forma constante durante todo el año en toda la región. Se considera que Puno genera el 70% de la tunta a nivel nacional; mientras que el otro 30% se divide entre Cuzco 15%, Junín 8%, Ancash 3%, Huancavelica 2% y Apurímac 2% (Fonseca & Ordinola, 2011).

## **2.2. Melaza de caña de azúcar**

La miel o melaza residual constituye un subproducto, ya sea del proceso de fabricación o refinación del azúcar crudo. Se trata de un líquido espeso o viscoso que se separa de la masa cocida de bajo grado final, y a partir del cual no es posible cristalizar más azúcar mediante los métodos convencionales (Chen, 1991).

La melaza es el residuo líquido resultante del proceso de producción de azúcar mediante cristalización repetida. Este procedimiento de evaporación y cristalización se realiza típicamente en tres ocasiones, alcanzando un punto en el que la presencia de azúcar invertido y la elevada viscosidad de la melaza impiden más cristalización de la sacarosa (Swan & Karalazos, 1990 citado por Fajardo & Sarmiento, 2007).

### **2.2.1. Composición de melaza de caña de azúcar**

La composición de la melaza es abundante en carbohidratos, siendo una destacada fuente de energía. Sin embargo, su contenido proteico es reducido. Además, presenta una naturaleza heterogénea que puede variar de acuerdo a las condiciones del suelo, variedad de caña de azúcar, período de cultivo, clima, madurez, operación de la fábrica en eficiencia, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, así como otros puntos clave. Además, la melaza de caña suele poseer entre 68-75% de grados Brix y su pH oscila entre 5.0 y 6.1. Además, contiene sacarosa, glucosa y fructosa, que son azúcares fermentables (Moreno, 2007; Castro, 1993 citado en Fajardo & Sarmiento, 2007). En la Tabla 4 se muestra de manera más detallada su composición.

**Tabla 4.** Composición de la melaza de caña de azúcar

Nutriente	Componente	Concentración
Carbohidratos	Agua	17 – 25 %
	Azúcares reductores	10 – 25 %
	Sacarosa	30 – 40 %
	Fructosa	5 – 12 %
	Glucosa	4 – 9 %
Proteínas y Aminoácidos	Proteína bruta	4.30 %
	Nitrógeno	1.01 %
	Lisina	200 ppm
	Metionina	200 ppm
	Treonina	500 ppm
	Triptófano	200 ppm
	Isoleucina	400 ppm
Vitaminas	Valina	700 ppm
	Biotina (B8)	3 ppm
	Ácido fólico (B9)	0.04 ppm
	Inositol	6000 ppm
	Pantotenato de calcio	60 ppm
	Piridoxina (B6)	4 ppm
	Riboflavina (B2)	2.5 ppm
	Tiamina (B1)	1.8 ppm

	Niacina (B3)	500 ppm
	Colina	700 ppm
	Calcio	0.80 %
	Fósforo	0.08 %
	Potasio	4.20%
	Cloro	2.10%
	Magnesio	0.27 %
Minerales	Azufre	0.78 %
	Sodio	0.09 %
	Cobre	14 ppm
	Hierro	130 ppm
	Manganoso	5 ppm
	Zinc	8 ppm

FUENTE: García, 2008; Chen, 1991

### 2.2.2. Proceso de obtención de melaza de caña de azúcar

Como se mencionó previamente, la melaza es uno de los productos secundarios generados durante el proceso de fabricación de azúcar de caña, como se ilustra en la Figura 3. Es importante destacar que, como dato adicional, cada tonelada de caña de azúcar produce aproximadamente entre 30 y 40 kg de melaza (Sepúlveda & S., 1998; MINAGRI, 2007), teniendo en cuenta que una tonelada de caña de azúcar produce alrededor de 112 kg de azúcar (Cortés, *et al.*, 2011).

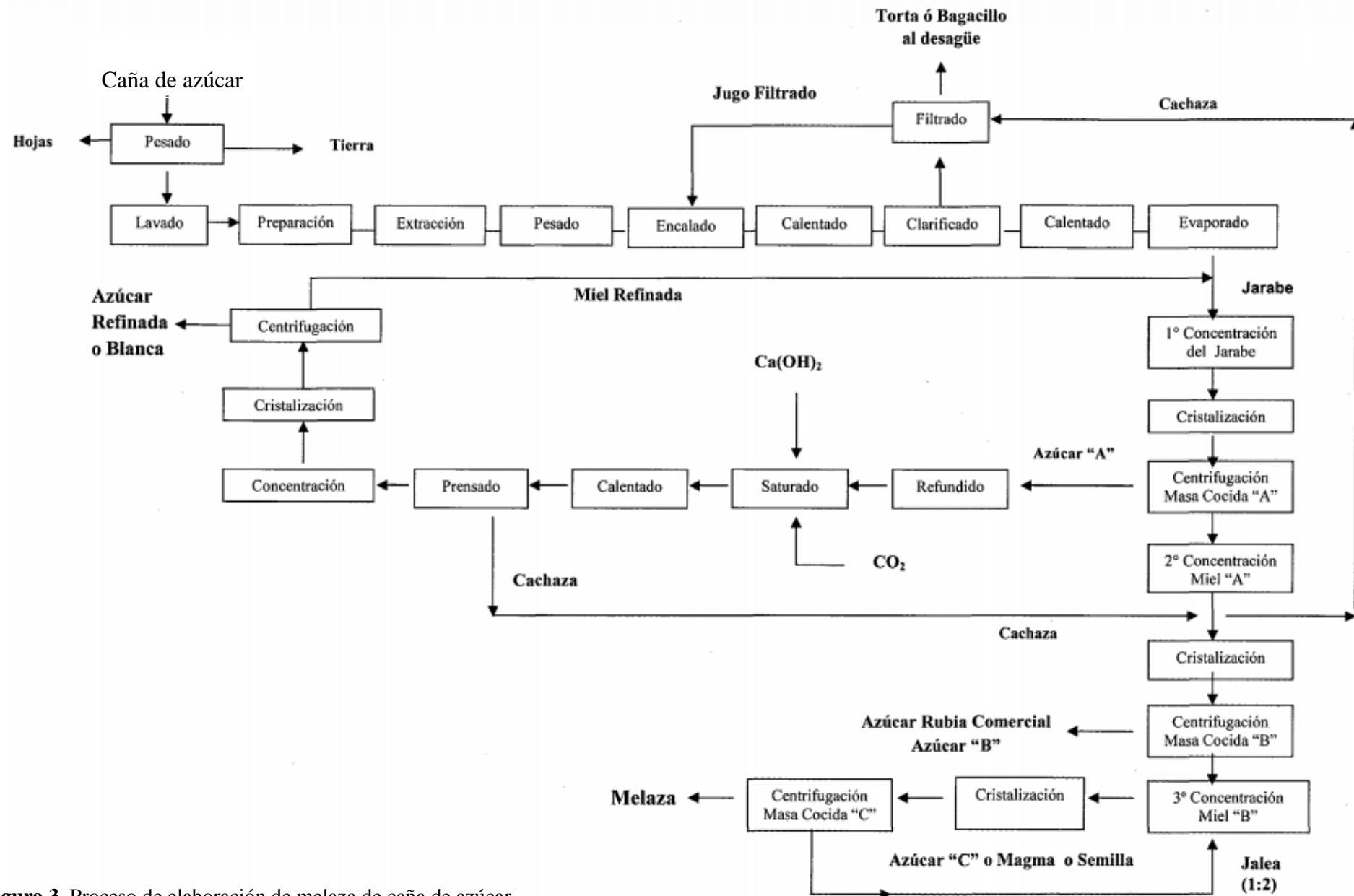
La miel o melaza "A" es un producto intermedio obtenido al centrifugar la masa cocida A. Aproximadamente el 77% del azúcar disponible en el jugo de caña de azúcar clarificado / concentrado se extrae durante este primer proceso de centrifugación. La melaza "A", que se produce simultáneamente con el azúcar "primero" o "A

La melaza o miel "B" también se conoce como melaza "segunda", es un producto intermedio, obtenido de hervir juntos "azúcar semilla" y melaza o miel A para obtener una masa cocida B, que luego se centrifuga para extraer un 12% adicional de azúcar. En este punto, se ha extraído aproximadamente el 89% del azúcar recuperable de la caña procesada.

La última melaza se conoce como melaza "C", "final" o "blackstrap" y en algunos países como "melaza", la melaza C es el producto final en una fábrica de azúcar, todavía contiene cantidades considerables de sacarosa (aproximadamente del 32 al 42%) que hasta la fecha no se ha recuperado mediante un método económico viable. (Perez, s.f.)

### 2.2.3. Propiedades fisicoquímicas

- **pH:** las melazas de caña presentan una ligera acidez, con un rango de pH que oscila entre 5.5 y 6.5. Este pH puede variar con la temperatura y está influenciado por la naturaleza y la cantidad de estabilizador del pH presente. La función estabilizadora del pH contribuye a que la melaza pueda resistir la adición de ácidos o bases sin modificar su pH original.
- **Viscosidad:** la viscosidad se incrementa a medida que aumenta el contenido de impurezas debido al aumento en la concentración de sólidos. Además, la presencia de una mayor cantidad de iones  $\text{Ca}^{2+}$  tiende a aumentar la viscosidad de la melaza, mientras que una mayor cantidad de iones  $\text{K}^+$  tiende a disminuirla.  
La aireación influye directamente proporcional a la viscosidad de la melaza, es decir si una incrementa por ende la otra también.  
Con respecto a la influencia del pH sobre la viscosidad, solo influye de maner significativa si el pH es superior a 11 lo que provocaría un aumento de viscosidad.
- **Densidad:** se establece por equivalencia con respecto a los grados Brix, y también es posible medir la densidad utilizando herramientas como el hidrómetro, la balanza de Wetsphal y el picnómetro (Swan & Karalazos, 1990 citado en Fajardo & Sarmiento, 2007).



**Figura 3.** Proceso de elaboración de melaza de caña de azúcar.  
FUENTE: Moro, 2012

#### **2.2.4. Usos de la melaza de caña de azúcar**

La melaza se emplea como fuente energética en la alimentación de ganado, aves de corral y cerdos, reservando una pequeña cantidad para el consumo humano. Sus características destacadas incluyen un elevado contenido de energía metabolizable (2.7 Mcal), así como la presencia abundante de minerales y azúcares solubles de fácil fermentación. No obstante, su contenido de proteína cruda es reducido (Martinez , 2008 citado en Meza, 2014; Arizaga & Gonzales, 1997 citado en Fajardo & Sarmiento, 2007).

Por otro lado también se ha usado como fertilizante en suelos con la adición de bagazo de caña de azúcar (Arizaga & Gonzales, 1997 citado en Fajardo & Sarmiento, 2007).

El uso de melaza de caña en el área de fermentaciones, a parte de su conocido uso para producción de etanol, según bibliografía se está usando a nivel de laboratorio como medio de cultivo suplementado para la producción de ácido láctico (Dumbrepatil, *et al.*, 2008), para el crecimiento de algunas BAL (Ossa, *et al.*, 2010) o de levaduras (Arizaga & Gonzales, 1997 citado en Fajardo & Sarmiento, 2007), para la producción de algunas enzimas como la invertasa a partir de *Aspergillus niger* (Veana, *et al.*, 2014), así como para la producción de manitol (Ortiz, *et al.*, 2012), entre otros.

#### **2.2.5. Producción de azúcar en Perú**

Debido a que la melaza es un subproducto de la elaboración de azúcar, también es importante conocer cómo se encuentra el sector azucarero actualmente en el Perú, se detallará brevemente.

Nuestro país cuenta con condiciones agroclimáticas óptimas y favorables en comparación con otros países para el cultivo de caña de azúcar. Por esta razón, logramos alcanzar rendimientos superiores a las 120 Tn/ha, superando a Brasil y Colombia, que solo registraron 83 y 98 Tn/ha respectivamente en el 2016. En Perú el 82% de azúcar producido realiza a partir de caña de azúcar, mientras que el 18%, a partir de remolacha azucarera.

Durante los seis primeros meses del año 2019, se registró 4,8 millones de toneladas, experimentando un incremento del 15,4% en contraste con el primer semestre del año 2018. En dicho lapso, los departamentos de Lambayeque, La Libertad, Ancash y Arequipa experimentaron incrementos del 28,7%, 17,9%, 26,2% y 44,1%, respectivamente. Este crecimiento se atribuye a mayores áreas de cultivo y condiciones

climáticas propicias, resultando en un aumento de la productividad, especialmente destacado en Ancash con un 18,4%, Lambayeque con un 15% y La Libertad con un 11,5%. En contraste, Lima experimentó una disminución del 3% en su producción.

En términos de empresas procesadoras, Casa Grande lidera con un 23% siendo la empresa productora más grande de azúcar, luego se continua Laredo con el 14,5%, Cartavio con el 13,5%, Paramonga con el 11,9%, San Jacinto con el 9%, Pomalca con el 7,6%, y Agro Olmos con el 7,45%. Estas empresas son las responsables de aproximadamente el 87% del total nacional (MINAGRI, 2019).

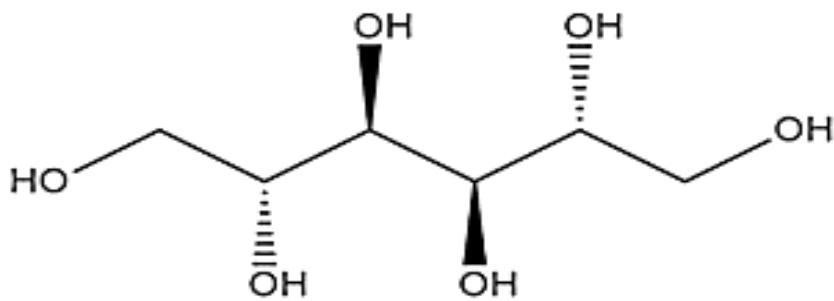
### **2.3. Manitol**

#### **2.3.1. Propiedades fisicoquímicas**

El D- manitol o azúcar maná, es un alcohol de azúcar acíclico de seis carbonos que tiene una estructura muy parecida al D-sorbitol, excepto por la variación en posición del grupo hidroxilo en el C-2 (Figura 4). Su fórmula molecular y masa molecular son  $C_6H_{14}O_6$  y 182.17 g/mol, respectivamente. El manitol posee un nivel de dulzura del 50 a 70% de sacarosa con un sabor dulce y fresco eficiente para enmascarar sabores amargos. Se cristaliza en forma de agujas o rombos incoloros de color blanco, cuya temperatura de fusión es de 165 °C – 168 °C y su temperatura de ebullición es de 290 – 295 °C, los cristales de manitol poseen una muy baja higroscopidad por lo que incrementa su vida útil en anaquel, su solubilidad en agua es de 18 % (*p/v*) a 25 °C, posee un valor calórico de 1.99 kcal/g y una densidad relativa de 1.49 (25 °C) (Mozzi, *et al.*, 2010; Chen, *et al.*, 2020; Dai, *et al.*, 2017).

Además, el manitol se puede disolver en glicerina, piridina y anilina y es ligeramente soluble en etanol y metanol, pero casi insoluble en éteres, cetonas e hidrocarburos, entre otros (Chen, *et al.*, 2020).

Debido a estas propiedades, el manitol se puede utilizar ampliamente alimentos, químicos, medicinas e industrias farmacéuticas (Chen, *et al.*, 2020).



**Figura 4.** Estructura química de D-manitol.  
FUENTE: Dai, *et al.*, 2017

### 2.3.2. Fuentes naturales de manitol

El manitol es uno de los polioles más abundantes en la naturaleza, fundamentalmente en especies hortícolas y agronómicas.

El manitol se encuentra en los exudados secos del árbol de maná, *Fraxinus ornus*, del cual deriva su nombre (Schwarz, 1994), después de calentar su corteza se obtiene del 30 a 50 % de manitol aprox. y este método se utilizó hasta el 1920 para la preparación de manitol comercial, también el manitol se extrajo comercialmente de la savia de *Fraxinus rotundifolia* en Sicilia (Brimacombe & Webber, 1972). Además, (Guicherd, *et al.*, 1997) reportaron que el contenido de manitol en hojas de *Fraxinus excelsior L.* en condiciones de sequía fue el doble que en buenas condiciones de riego, ya que el manitol acumulado se debió al ajuste osmótico y de tolerancia de este árbol como respuesta al estrés hídrico.

También se encuentra en pequeñas cantidades en la mayoría de las frutas y verduras, como calabazas, apio, cebollas, aceitunas, zanahoria, remolachas y piña. Por otro lado, también están las algas marinas que, a través de la fotosíntesis, como las algas pardas, podrían generar entre un 10% y un 20% de manitol.

El manitol está presente en el micelio de diversas especies de hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Penicillium*, y en champiñones (Dai, *et al.*, 2017).

### 2.3.3. Producción de manitol

#### a. Producción por síntesis química

Actualmente, se realiza la producción comercial de manitol principalmente aplicando el método de hidrogenación catalítica a temperaturas elevadas entre 120 y 150 °C, así como presiones elevadas entre 70 y 140 atm con el uso de catalizadores químicos. Para este proceso es fundamental la D-fructosa y D-glucosa, para sintetizar manitol; en este enfoque, la β-fructosa se convierte a manitol, mientras que la α-fructosa y la glucosa se

convierten en sorbitol como subproducto, cuando se usa níquel Raney como catalizador y gas hidrógeno como reactivo reductor.

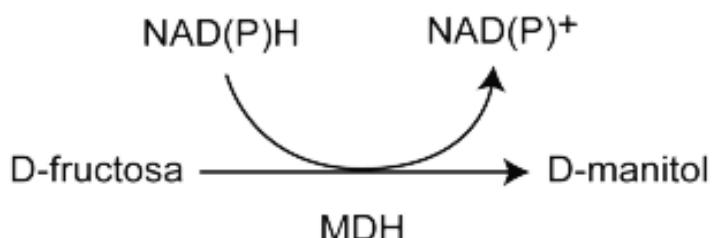
La producción de manitol a partir de fructosa conlleva inevitablemente a la producción de sorbitol. En este proceso, la hidrogenación de una solución equitativa de fructosa/glucosa (50/50) resulta en una proporción de mezcla de manitol/sorbitol de 30/70 (Dai, *et al.*, 2017; Mozzi, *et al.*, 2010).

Por otro lado, (Wang, *et al.*, 2005) realizaron una isomerización dual junto con un método de hidrogenación química para producir manitol cristalino. Primero la glucosa se isomericó primero a manosa con molibdato de amonio al 0,3% a 100 °C, pH 3-4 durante 3 h y luego se isomericó aún más agregando glucosa isomerasa. A continuación, la solución mixta de glucosa-manosa-fructosa se hidrogenó químicamente, usando níquel Raney como el catalizador y los productos de sorbitol y manitol formados luego se separa por recristalización para obtener manitol al 97,5% puro y un rendimiento de manitol del 59%.

El manitol sintetizado químicamente debe ser purificado por cromatografía para eliminar el catalizador metálico, y se requiere una cristalización a baja temperatura para分离 el sorbitol, lo que aumenta los costos totales de separación (Martău, *et al.*, 2020). Las condiciones de alta presión y temperatura, gran cantidad de sorbitol producido, bajo pH, así como el requisito de sustratos puros son las principales desventajas de este método. En consecuencia, este proceso químico sufre mayores costos de producción y bajo rendimiento (Chen, *et al.*, 2020).

### b. Producción enzimática

Se realiza mediante una reducción de D-fructosa a D-manitol a través de la enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH) necesitando la presencia de cofactores como NADH o NADPH.

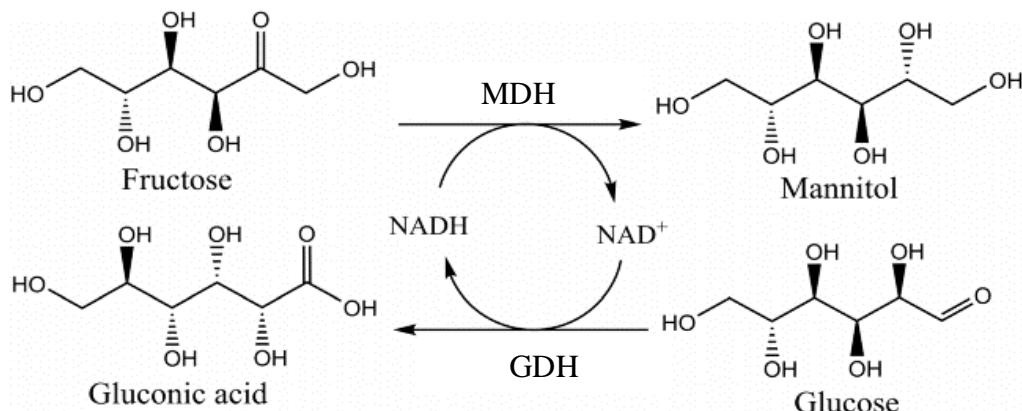


**Figura 5.** Producción de manitol mediante manitol 2-deshidrogenasa (MDH)

La MDH ha sido purificada de varios microorganismos, como *Lb. brevis* (Martínez, et al., 1963), *L. mesenteroides* (Sakai & Yamanaka, 1968), *Lb. sanfranciscensis* (Korakli & Vogel, 2003), *Saccharomyces cerevisiae* (Quain & Boulton, 1987), *Rhodobacter sphaeroides* (Schneider & Giffhorn, 1994), *Torulaspora delbrueckii* (Nidetzky, et al., 1997).

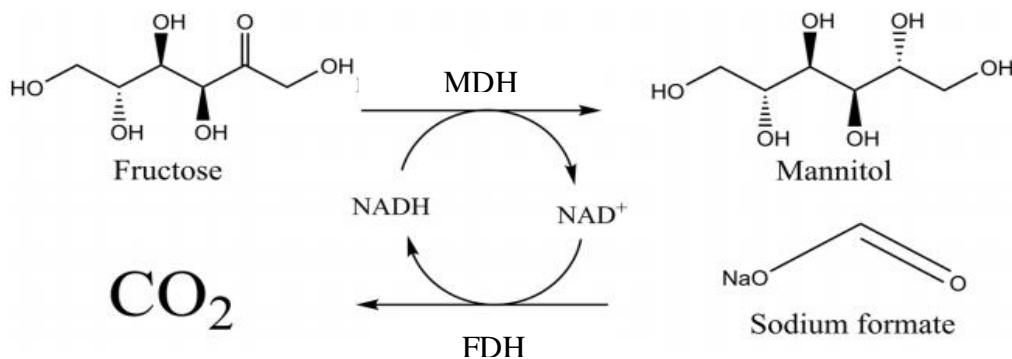
La principal restricción en este proceso enzimático radica en la dependencia del cofactor del MDH, siendo NADH y NADPH costosos, lo que vuelve económicamente inviable dicha actividad enzimática.

Un método para la reproducción de la coenzima NADH, se puede generar mediante la reducción de ácido glucónico a partir de glucosa por glucosa deshidrogenasa (GDH) de *Bacillus megaterium*. Por lo tanto, la coenzima será consumida durante la producción de manitol por MDH de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6). Sin embargo, es difícil separar el subproducto, el ácido glucónico (Kulbe, et al., 1987).



**Figura 6.** Regeneración de coenzima NADH, obteniendo manitol y ácido glucónico.  
FUENTE: Chen, et al., 2020

Otro sistema de dos enzimas fue ideado por (Wichmann, et al., 1981). En este sistema, MDH se acopla la reacción con formiato deshidrogenasa (FDH). La fructosa y el formiato se convierten en manitol y CO<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 7). El sustrato es de bajo costo y el subproducto, CO<sub>2</sub>, se separa fácilmente del manitol.



**Figura 7.** Regeneración de coenzima NADH, obteniendo manitol y CO<sub>2</sub>  
FUENTE: (Chen, *et al.*, 2020)

Sin embargo, la síntesis enzimática de manitol se ve perjudicada por otros factores, tales como la inhibición significativa por el producto de la enzima MDH y el elevado valor de Km de MDH respecto a la fructosa (Soetaert *et al.* 1999 citado en Mozzi, *et al.*, 2010).

### c. Producción microbiana

Algunas levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (*Alternaria alternata* y *nidulans*), y bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium glutamicum*), en especial las BAL, mostraron una producción de manitol libre de sorbitol. Además, la regeneración de los cofactores enzimáticos se da a través del catabolismo de los carbohidratos en sus rutas metabólicas. Las BAL parecen ser las más eficaces para la producción de manitol (Weymarn, *et al.*, 2002).

A continuación, se muestra un breve resumen de cepas microbianas productoras de manitol (Tabla 5).

**Tabla 5.** Producción de manitol mediante fermentación microbiana

Cepa Microbiana	Método de fermentación
Producción de manitol mediante bacterias	
<i>Lactobacillus sp.</i> B001	Batch
<i>Lactobacillus sp.</i> Y-107	Batch
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC-8287	Batch
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Batch
<i>Lactobacillus intermedius</i> B-3693	Batch

---

<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL B-3693	Cultivo continuo con recirculación de células
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC-9135	Batch
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Batch
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Batch
<i>Leuconostoc sp.</i> Y-002	Batch
<i>Escherichia coli</i>	Biotransformación
Producción de manitol mediante levaduras	
<i>Candida magnoliae</i>	Batch-fed-batch
<i>Candida zeylannoides</i>	Batch
<i>Candida magnoliae</i> HH-01	Fed-batch
<i>Torulopsis mannitofaciens</i>	Batch
<i>Torulopsis versalitis</i>	Batch
Producción de manitol mediante hongos	
<i>Aspergillus candidus</i>	Batch
<i>Penicillium scabrosum</i>	Batch

---

FUENTE: Martău, *et al.*, 2020; Saha & Racine, 2011

Si bien es cierto que las levaduras y los hongos filamentosos son productores potenciales de manitol, estos presentan en su metabolismo ciertas desventajas como productividades volumétricas y rendimientos muy reducidos, así como su capacidad para la degradación de manitol, complicando los puntos de control durante la producción, y una mayor dificultad durante el downstream (Ortiz, 2014).

## **2.3.4. Aplicaciones**

### **a. Industria Alimentaria**

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó el uso del manitol (E421 en la Unión Europea) en 1972, clasificándolo como GRAS (generalmente reconocido como seguro), facilitando su aplicación en alimentos procesados.

Este compuesto se emplea para ampliar la vida de anaquel de los alimentos, puesto que tiene la capacidad de disminuir la propensión a la cristalización de los azúcares. (Soetaert, *et al.*, 1999). Aunque los productos que contienen manitol existen en ambientes de alta humedad, serán estables, ya que el manitol cristalino muestra baja higroscopidad (Saha & Racine, 2011). Se utiliza en alimentos dietéticos como dulces de goma de mascar o chicles sin azúcar (no cariogénicos) y helados (Le & Mulderrig, 2001). Además, se puede utilizar como agentes de textura, de antiaglomeración o incluso como humectante (Grembecka, 2015).

El manitol presenta un contenido calórico un 60% menor que la sacarosa. La reducción en el valor calórico de los alcoholes de azúcar se atribuye a su absorción parcial en el intestino delgado, donde el 75% se fermenta y se absorbe a través de la microbiota intestinal, generando por ejemplo butirato, que se ha asociado con una posible protección contra el cáncer de colon (Mozzi, *et al.*, 2010); el 25 % restante se absorbe antes de descargarse en la orina sin haber sido metabolizado para obtener energía (Livesey, 2003). Además, dado que los índices glucémico e insulinémico del manitol son cero, es muy adecuado para personas que hacen dieta y diabéticos como constituyente alimentario (Meng, *et al.*, 2017).

Por otro lado, el consumo excesivo puede provocar molestias gastrointestinales debido a la producción de gases y diarrea (Livesey, 2003). Es por ello que se recomienda que la ingesta diaria no supere los 20 g (Weymarn, *et al.*, 2002).

### **b. Industria química**

El manitol se emplea en la fabricación de condensadores electrolíticos secos al combinarse con ácido bórico, así como en la producción de resinas y agentes tensoactivos (Dapo & Stevens, 1999; Kitamoto, *et al.*, 2002).

En la industria del plástico, utilizando manitol y óxido de propileno como materias primas (primas) con KOH como catalizador bajo presión a 100-150 ° C, se produjo éter de óxido de polimanitolpropileno, que se utiliza para fabricar espuma rígida de

poliuretano, que posee una resistencia mejorada al aceite y a la oxidación. resistencia y estabilidad dimensional, cuya resistencia al calor alcanza los 180 °C (Qianqian, 2010).

### **c. Industria farmacéutica**

El manitol es generalmente estable y exhibe escasas reacciones con otros componentes; su sabor dulce y refrescante tiene la capacidad de disimular los sabores desagradables de ciertos medicamentos. Por ende, el manitol se emplea frecuentemente en la elaboración de medicamentos, particularmente en la formulación de tabletas masticables y polvos granulados (Patra, *et al.*, 2009).

Como poliol, el manitol puede actuar como un carbohidrato de energía reducida que repara y previene la caries (Livesey, 2003).

### **d. Medicina**

Es un potente diurético osmótico que se usa como terapia cuando ocurre una intoxicación. Contrarresta el edema cerebral durante la cirugía cerebral y reduce la presión intraocular (Rabinstein, 2006).

Al ser un agente deshidratante y diurético osmótico altamente eficaz, el manitol puede ayudar a minimizar el riesgo de insuficiencia renal aguda en pacientes después de un trasplante renal (Rockwell, 2015).

## **2.4. Bacterias ácido lácticas**

Las BAL son microorganismos fermentativos que se encuentran naturalmente en ambientes ricos en nutrientes o son introducidas intencionalmente por el ser humano. Estos ambientes suelen ser abundantes en carbohidratos y proteínas. La eficiente utilización de nutrientes y la producción de ácido láctico durante su crecimiento confieren a las BAL notables ventajas selectivas en los diversos hábitats que ocupan. Además de generar ácido láctico, su metabolismo da lugar a una variedad de compuestos como ácido acético, etanol, manitol, entre otros (Mozzi, *et al.*, 2010).

Se encuentran en diversas condiciones biológicas y ocupan naturalmente una amplia variedad de hábitats. Han sido identificadas en alimentos fermentados, incluyendo vegetales, cereales, frutas, así como en productos como cerveza, vino, encurtidos y ensilados. También se encuentran en entornos acuáticos, suelos y en distintas áreas del cuerpo humano y de animales, como los tractos oral, respiratorio, gastrointestinal y urogenital, incluyendo membranas mucosas (Azadnia, *et al.*, 2011; Leroy & De Vuyst,

2004; Tomás, *et al.*, 2003). Debido a su seguridad y a la inocuidad de los productos metabólicos que generan, estas bacterias, así como sus derivados, son clasificadas como "GRAS" (generalmente reconocidas como seguras) o de grado alimentario. Este reconocimiento fortalece su aplicación en diversas industrias mediante la tecnología biotecnológica (Liu, *et al.*, 2011; Mozzi, *et al.*, 2010).

Las BAL son un grupo heterogéneo de morfología bacilar y coco Gram positivos, poseen genomas con baja concentración de guanina y citosina entre 33 y 51%, estas bacterias no presentan movilidad, no forman esporas, no tienen actividad citocromo oxidasa, son anaerobios facultativos por lo que son anaerobios, pero pueden tolerar el oxígeno, son catalasa negativos y Gram (+) (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Thokchom & Joshi, 2012). Pueden desarrollarse entre 5 °C a 45 °C de temperatura, y su pH óptimo para crecimiento es entre 5.5 y 6.5. Poseen necesidades nutricionales complejas que abarcan aminoácidos, péptidos, minerales, bases de nucleótidos, ácidos grasos, vitaminas y carbohidratos (Vodnar, *et al.*, 2010; Mozzi, *et al.*, 2010).

#### **2.4.1. Taxonomía de las Bacterias Ácido Lácticas**

Originalmente, la clasificación taxonómica de las bacterias ácido lácticas (BAL) se llevaba a cabo considerando sus características fenotípicas, tales como su capacidad para fermentar carbohidratos, su resistencia al crecimiento en diversas concentraciones de sales, su desarrollo a distintas temperaturas o dentro de rangos específicos de pH en varios medios de cultivo, así como su resistencia a antibióticos y su tolerancia ácido-base (González, 2018).

Los géneros que pertenecen a las BAL fueron motivo de debate; no obstante, se considera a los siguientes *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* tradicionalmente son considerados como fundamentales dentro de este grupo (Thokchom & Joshi, 2012). Las bacterias ácido lácticas están compuestas de seis familias (*Aerococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*) dentro del Filo Firmicutes, donde se incluye alrededor de 44 géneros y 500 especies diferentes (Ortiz, 2014; Bleckwedel, 2017). Se presentan únicamente las familias con sus géneros más reconocidos, y se mencionan solo algunas de las especies como ejemplo (Figura 8).

<b>Reino:</b>	<u>Bacteria</u>
<b>Filo:</b>	<u>Firmicutes</u>
<b>Clase:</b>	<u>Bacilli</u>
<b>Orden:</b>	<u>Lactobacillales</u>
<b>Familia:</b>	<u>Carnobacteriaceae</u>
<b>Familia:</b>	<u>Aerococcaceae</u>
<b>Familia:</b>	<u>Enterococcaceae</u>
<b>Género:</b>	<u>Enterococcus</u>
<b>Especie:</b>	<u>Enterococcus faecalis</u>
<b>Familia:</b>	<u>Streptococcaceae</u>
<b>Género:</b>	<u>Lactococcus</u>
<b>Especie:</b>	<u>Lactococcus lactis</u>
<b>Género:</b>	<u>Streptococcus</u>
<b>Especie:</b>	<u>Streptococcus thermophilus</u>
<b>Familia:</b>	<u>Lactobacillaceae</u>
<b>Género:</b>	<u>Lactobacillus</u>
	<u>Lactobacillus diolivorans</u>
	<u>Lactobacillus curvatus</u>
	<u>Lactobacillus reuteri</u>
	<u>Lactobacillus plantarum</u>
	<u>Lactobacillus buchneri</u>
<b>Género:</b>	<u>Pediococcus</u>
<b>Especie:</b>	<u>Pediococcus pentosaceus</u>
<b>Familia:</b>	<u>Leuconostocaceae</u>
<b>Género:</b>	<u>Oenococcus</u>
<b>Especie:</b>	<u>Oenococcus oeni</u>
<b>Género:</b>	<u>Leuconostoc</u>

**Figura 8.** Taxonomía de las bacterias ácido lácticas. Solo se colocaron algunas especies como ejemplo.

FUENTE: Modificado Sauer, et al., 2017 usando

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi>

#### 2.4.2. Metabolismo de bacterias ácido lácticas

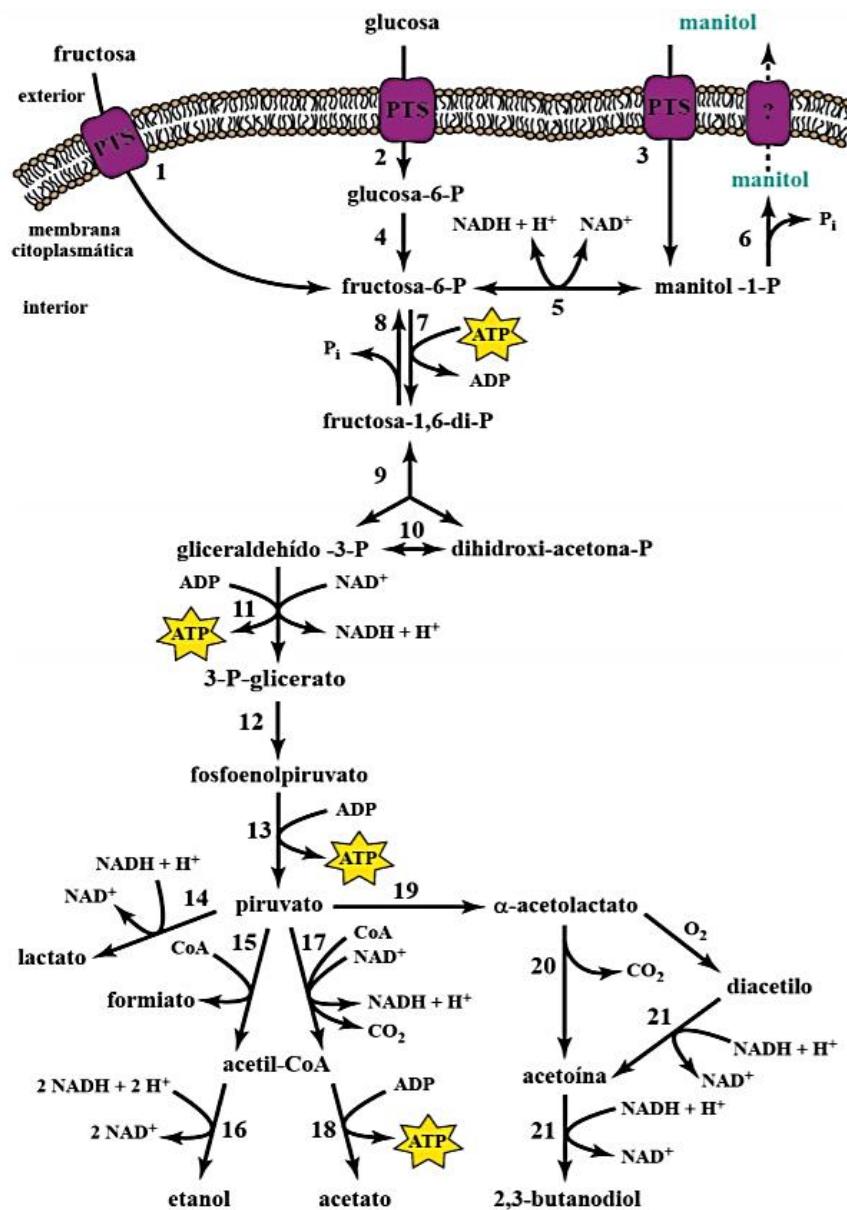
Las BAL generan energía a partir de fuentes de carbono que suelen ser principalmente azúcares, ya que utilizan la fosforilación a nivel de estos sustratos. Según la vía de fermentación de azúcares que emplean, las BAL pueden clasificarse en dos grupos fisiológicos principales que son las homofermentativas y heterofermentativas (Mozzi, et al., 2010). Las homofermentativas descomponen las hexosas mediante la glucólisis, generando ácido láctico siendo este su principal metabolito final (80 - 90%). En cambio, las BAL heterofermentativas emplean la vía fosfocetolasa, produciendo concentraciones

similares de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), ácido acético, ácido láctico y/o etanol como sus principales productos (Mozzi, et al., 2010; Abdel-Rahman, et al., 2013).

#### a. Homofermentativas

También denominadas homolácticas, dentro de las cuales se encuentran los *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, así como parte del género *Lactobacillus*, cuentan con enzimas como la fructosa 1,6-difosfato aldolasa y fosfoglucosa isomerasa. Las enzimas antes mencionadas les permiten llevar a cabo la fermentación de azúcares mediante la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), siendo el piruvato resultante se convierte principalmente en ácido láctico por medio de la lactato deshidrogenasa (LDH) (Mozzi, et al., 2010). Las hexosas son internalizadas mediante transportadores de membrana (simportadores y permeasas). Después, se someten a una isomerización de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. Más adelante, la aldolasa corta la fructosa-1,6-difosfato en gliceraldehído-3-P y dihidroxi-acetona-P. En la fase final de la vía, gracias al lactato deshidrogenasa y al NADH el piruvato se transforma en ácido láctico. Este proceso produce 2 mol ATP/ 1 mol de hexosa, además el NADH es utilizado para convertir el piruvato en lactato (Mozzi, et al., 2010; Ortiz, 2014).

Algunas BAL pueden cambiar su metabolismo homoláctico a un metabolismo ácido-mixto y producir ácido fórmico, formiato, acetato,  $\text{CO}_2$ , y etanol además de ácido láctico (Mozzi, et al., 2010). El acetato suele mantenerse en el medio de cultivo, sin embargo, dependiendo del pH así como la presencia de NAD(P)H puede transformarse en etanol. Su transformación a etanol se realiza mediante las enzimas formiato piruvato liasa así como la lactato deshidrogenasa, siendo reguladas por los cambios en las proporciones de  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  (Figura 9). Obteniéndose 1 mol adicional de ATP y una menor concentración para el ácido láctico producido. Al mismo tiempo, el formiato podría sufrir descarboxilación, que generase 1 mol extra de dióxido de carbono, siendo esta una característica de las bacterias que producen (Bleckwedel, 2017). La elección entre la vía alternativa o la vía simultánea depende de las condiciones de cultivo, como la limitación de la fuente de carbono, la presencia de diversas fuentes de carbono distintas a la glucosa, un pH elevado o una baja temperatura (Castillo, et al., 2013; Gänzle, 2015).



**Figura 9.** Ruta metabólica de fermentación para hexosas de BAL homofermentativa

1. Sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PTS) de fructosa; 2. PTS de glucosa; 3. PTS de manitol; 4. Fosfoglucosa isomerasa; 5. Manitol 1-fosfato deshidrogenasa; 6. Manitol 1-fosfatasa; 7. 6-Fosfofructoquinasa; 8. Fructosadifosfatasa; 9. Fructosa 1,6-difosfato aldolasa; 10. Triosafosfato isomerasa; 11. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; 12. Fosfogliceromutasa y enolasa; 13. Piruvato quinasa; 14. Lactato deshidrogenasa; 15. Piruvato-formiato liasa; 16. Acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa; 17. Piruvato deshidrogenasa; 18. Acetato quinasa; 19.  $\alpha$ -acetolactato sintasa; 20.  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa; 21. 2,3-butanediol deshidrogenasa. (?) Sistema de transporte de manitol desconocido.

FUENTE: Bleckwedel, 2017

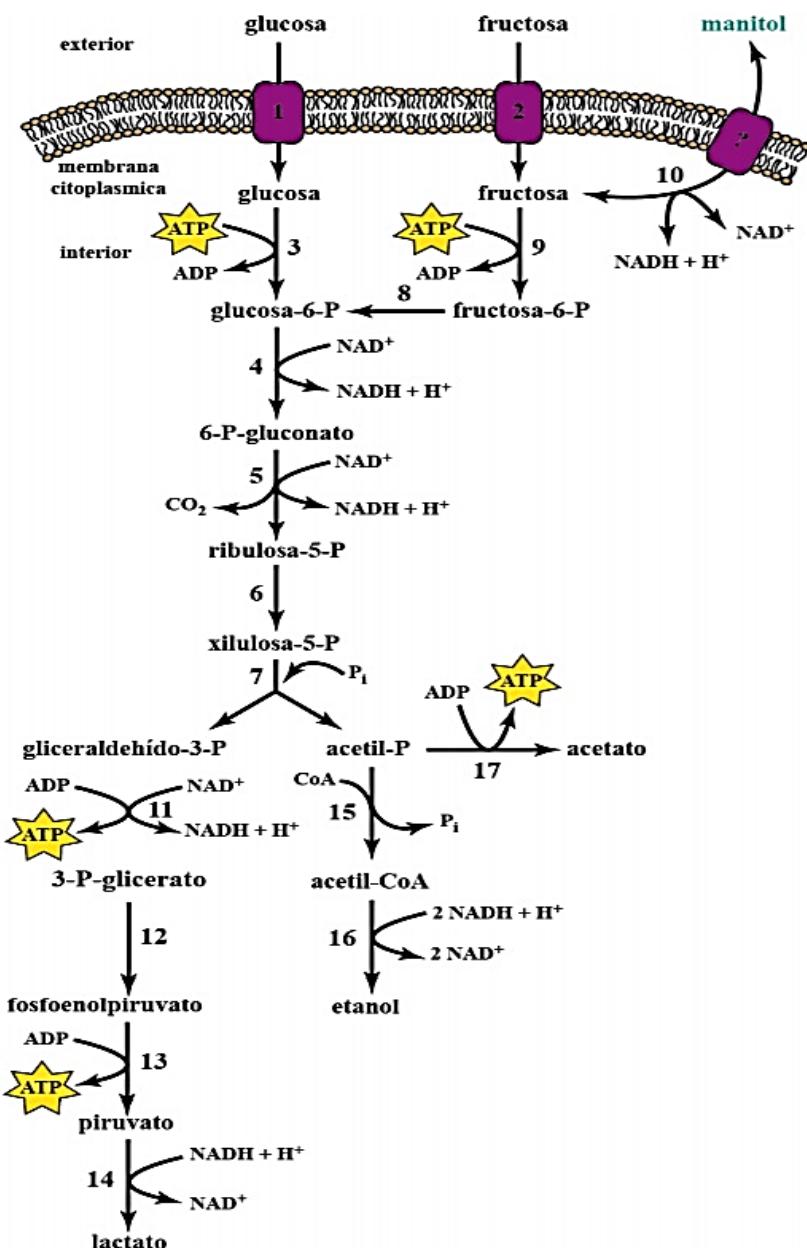
## b. Heterofermentativas

También denominadas heterolácticas, dentro de este grupo se encuentran los géneros como *Oenococcus*, *Leuconostoc* y algunas especies del género *Lactobacillus*, no poseen fructosa 1,6-difosfato aldolasa. Por lo tanto, llevan a cabo la fermentación de azúcares principalmente a través de la vía fosfocetolasa (PKP) o vía de Warburg-Dickens. Esta vía genera la producción de diferentes metabolitos además de los que suelen producir como, ácido acético, ácido láctico, etanol y dióxido de carbono (Mozzi, et al., 2010; Wisselink, et al., 2002).

Las BAL heterofermentativas pueden clasificarse en dos categorías: facultativas u obligadas. Las heterofermentativas facultativas llevan a cabo la fermentación de hexosas mediante la vía EMP y pentosas mediante la vía PKP. Mientras que las bacterias ácido lácticas heterofermentativas obligadas consumen hexosas y pentosas exclusivamente a través de la vía PKP (Ortiz, 2014). La enzima específica de la vía PKP es la D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa, que cataliza la conversión de xilulosa-5-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato y acetil-P (Figura 10). El gliceraldehído-3-fosfato ingresa a vía de glucólisis por lo que se convierte en ácido láctico, mientras que acetil-P es transformado en etanol. A lo largo de este proceso, se fermenta 1 mol de glucosa, generando 1 mol de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono (Mozzi, et al., 2010; Ortiz, 2014).

Ciertas bacterias ácido lácticas heterofermentativas presentan una baja actividad de acetaldehído deshidrogenasa, además de la falta de aceptores de electrones alternativos, resulta en un poder disminuido de la reoxidación del NAD(P)H, mediante el paso de transformación de acetil-fosfato hacia etanol. Como consecuencia, la síntesis de ácido acético no ocurre con tanta frecuencia, convirtiéndose en un factor que restringe el crecimiento de las BAL heterofermentativas en presencia de glucosa (Wisselink, et al., 2002; Bleckwedel, 2017). En situaciones en las que hay aceptores alternativos, como piruvato, oxígeno, fructosa o citrato, se observaría la síntesis de ácido acético como un producto final, proporcionando un beneficio adicional de ATP y, por ende, favoreciendo una mayor velocidad de crecimiento celular (Årsköld, et al., 2008; Wisselink, et al., 2002). La fructosa toma la vía heterofermentativa similar al que toma la glucosa. Sin embargo, también puede desempeñar la función de un aceptador de electrones apropiado

al realizar la oxidación del NAD(P)H. Como consecuencia, una considerable cantidad de fructosa es reducida a manitol (Ortiz, 2014).



**Figura 10.** Ruta metabólica de fermentación para hexosas de BAL heterofermentativa

1. Glucosa permeasa; 2. Fructosa permeasa; 3. Glucoquinasa; 4. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; 5. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa; 6. Epimerasa; 7. D-xilulosa-5P-fosfocetolasa; 8. Glucosa-fosfato isomerasa; 9. Fructoquinasa; 10. Manitol 2- deshidrogenasa; 11. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; 12. Fosfogliceromutasa y enolasa; 13. Piruvato quinasa; 14. Lactato deshidrogenasa; 15. Fosfato acetiltransferasa; 16. Acetaldehído deshidrogenasa y Alcohol deshidrogenasa; 17. Acetato quinasa, (?) Sistema de transporte de manitol desconocido.

FUENTE: Bleckwedel, 2017

### **2.4.3. Producción de manitol por bacterias ácido lácticas**

Se han descrito dos vías biosintéticas para el manitol, según la vía catabólica de carbohidratos utilizada: la fermentación homoláctica y heteroláctica (Mozzi, *et al.*, 2010).

#### **a. Producción de manitol en BAL homofermentativas**

La mayoría de las BAL homofermentativas tienden a consumir manitol en lugar de generarla. Aquellas que no cuentan con la MDH y emplean la vía EMP (Figura 9) para fermentar azúcares no pueden generar manitol de forma natural. Por lo tanto, la capacidad de formar este alcohol de azúcar está restringida a cepas que tienen dificultades significativas para generar NAD<sup>+</sup> cuando se produce ácido láctico. En situaciones específicas, estas cepas pueden producir manitol a partir tanto de fructosa como de glucosa utilizando vías alternativas de regeneración de NAD<sup>+</sup> mediante varias enzimas (Wisselink, *et al.*, 2002; Monedero, *et al.*, 2010).

En estas circunstancias, las bacterias ácido lácticas homolácticas pueden llevar a cabo una fermentación de ácidos mixtos, generando diversos metabolitos, entre ellos se encuentran el etanol, acetato, acetoína, 2,3-butanodiol, inclusive podría producirse manitol. La manitol-1-fosfato deshidrogenasa (M1PDH) se encarga de catalizar dicha reacción reversible desde la reducción de fructosa-6-fosfato hacia manitol-1-fosfato, siendo esta una reacción dependiente de NADH. Posteriormente, el manitol-1-fosfato se desfosforila a manitol mediante la acción de la enzima manitol-1-fosfatasa. Estas enzimas participan en la ruta biosintética del manitol (Figura 9) (Kowalczyk & Bardowski, 2007; Mozzi, *et al.*, 2010).

La síntesis de manitol dentro de la célula surge como resultado al disminuir la oxidación del NADH, originada por la disminución de la actividad del lactato deshidrogenasa (LDH) en las bacterias ácido lácticas homofermentativas. Al producir temporalmente manitol-1-P se logra regenerar NAD<sup>+</sup>, en contraste con la vía convencional que implica la formación de ácido láctico (Wisselink *et al.* 2002, Mozzi *et al.* 2010).

### **b. Producción de manitol en BAL heterofermentativas**

Algunas variedades de bacterias ácido lácticas heterofermentativas, que pertenecen a *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Streptococcus*, se consideran especialmente adecuadas para la producción de manitol, ya que emplean una combinación de vías para el catabolismo de azúcares. Se ha documentado que las especies *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* son bacterias productoras de manitol prometedoras (Grobben, *et al.*, 2001; Mozzi, *et al.*, 2010; Bleckwedel, 2017).

Cuando el microorganismo se desarrolla en un entorno anaeróbico con glucosa, se genera ácido láctico, así como etanol, mediante la vía de las pentosas fosfato. En este proceso, las BAL mantienen el equilibrio redox mediante la transformación de acetil-P a etanol. Sin embargo, en presencia de fructosa que actúa como aceptor de electrones alternativo, se convierte en manitol mediante la MDH. Catalizando la reducción de la fructosa utilizando NAD(P)H (Figura 10), es importante señalar que es una reacción reversible. Además, se regenera el NAD(P)<sup>+</sup> mediante la reducción de fructosa a manitol, dando lugar a una desviación del acetil-P en acetato en vez de generarse etanol. Esto conlleva a una ganancia adicional de ATP. La generación de ATP suplementario es el principal impulsor detrás de la elección de aceptores de electrones diferentes al acetilfosfato (Wisselink, *et al.*, 2002; Monedero, *et al.*, 2010; Ortiz, 2014; Bleckwedel, 2017).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Población**

Banco de bacterias ácido lácticas aisladas de tunta del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias - Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

#### **Muestra**

Cuarenta y un bacterias ácido lácticas del banco de BAL aisladas de tunta del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

##### **3.1. Reactivación de bacterias ácido lácticas aisladas de tunta**

Se tomaron 41 cepas aisladas de tunta, preservadas en caldo MRS con 30% de glicerol a -80 °C.

Se tomó 100 µL de caldo bacteriano para la inoculación en un tubo tapa rosca con 3mL de caldo MRS estéril. Se incubó a 28 °C durante 24 horas.

Luego se tomó una asada y se estrió en una placa petri con agar MRS, las placas se incubaron a 28 °C durante 24 horas.

##### **3.2. Selección de bacterias ácido lácticas heterofermentativas y aisladas de tunta**

Se preparó 420 mL de caldo MRS y se dispensó 10 mL de caldo en cada tubo colocando una campana Durham, después se autoclavó a 121 °C durante 15 min.

Se inoculó cada tubo con 100 µL de caldo bacteriano crecidos con 24 horas de anterioridad. Finalmente los tubos se incubaron a 28 °C durante 48 horas, teniéndose un tubo, solo con caldo MRS para usarlo como control (Goyal, *et al.*, 2012).

En el caso de observarse la producción de CO<sub>2</sub> en las campanas Durham muestra el comportamiento de una BAL heterofermentativa. Se realizó por duplicado.

### **3.3. Comparación de bacterias ácido lácticas heterofermentativas aisladas de tunta con respecto a la producción de manitol**

Se tomó una asada asépticamente de la cepa en placa crecida con 24 h de anterioridad, luego se resuspendió en un matraz de 125 mL con 50 mL de caldo MRS con 0.5 % de glucosa y 0.5 % de fructosa como fuente de carbono, en lugar de 20 g/L de glucosa que se usa en un caldo MRS típico(mMRS). Se incubó a 28 °C durante 12 h y se colocó en un shaker a 100 rpm. Se realizó un pase de preinóculo a inóculo, tomando 100 µL del caldo bacteriano crecido anteriormente durante 12 h hacia 50 mL de caldo mMRS estéril en un matraz de 125 mL, incubándolo a 28 °C durante 12 h a 100 rpm (Carvalheiro, *et al.*, 2010; Rodríguez, *et al.*, 2012).

En un matraz de 250 mL se colocó 135 mL caldo mMRS, se inoculó para obtener un valor inicial de densidad óptica de 0.1 a 600 nm y un volumen final de 140 mL. Finalmente se incubó a 28 °C durante 48 h en agitación a 100 rpm; las muestras fueron asépticamente extraídas a las 0, 6, 12, 24 y 48 h de fermentación (Rodríguez, *et al.*, 2012).

Se realizó el recuento en placa usando solución salina a 0.85% (*p/v*) de NaCl, se midió el pH y la cuantificación de glucosa, fructosa y manitol, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

### **3.4. Producción de manitol a partir de melaza de caña de azúcar mediante bacteria ácido láctica aislada de tunta y la determinación de azúcares en la melaza**

Se realizó una solución stock de 30% (*p/v*) de melaza de caña de azúcar disuelta en agua destilada, luego se centrifugó (11050 g durante 20 minutos a 4 °C), para remover partículas de interferencia de la solución. (Ortiz, *et al.*, 2012; Carvalheiro, *et al.*, 2010). A partir de la solución del 10 % de melaza de caña de azúcar se procedió al tratamiento de la muestra para leer en el HPLC las concentraciones de azúcares como sacarosa, fructosa y glucosa.

A partir de la solución stock se realizó las diluciones correspondientes para obtener soluciones del 10%, 15% y 20% (*p/v*) de melaza de caña de azúcar, luego se adicionaron los nutrientes que posee el medio MRS a excepción de la glucosa (MRSmc).

La cepa 1TP10-BL03, se reactivó en placa con agar MRS durante 24 h a 28 °C, luego se resuspendió una asada en un matraz de 125 mL con 50 mL de caldo MRSmc (correspondiente a la concentración en porcentaje de melaza de caña utilizada 10, 15 y 20%) y se incubó a 28 °C durante 12 h (preinóculo), luego se colocó 100 µL de preinóculo hacia 50 mL de caldo MRSmc en un matraz de 125 mL incubándose a 28 °C durante 12 h (inóculo). Con respecto al control, solo se trabajó con caldo MRS.

Finalmente se inoculó para obtener un volumen final de 140 mL de caldo MRSmc con un OD (densidad óptica) de 0.1 a 600 nm, en un matraz de 250 mL de volumen a 100 rpm y 28 °C (Ortiz, *et al.*, 2012) para mantener homogenizado el medio, ya que no es necesario la aireación debido a la naturaleza de las BAL.

Se tomaron las muestras asépticamente a las 0, 6, 9, 12, 24 y 48 h, para analizar UFC/mL, pH y concentración de melaza de caña de azúcar (glucosa, fructosa y sacarosa) y manitol mediante HPLC.

#### **3.4.1. Medición de pH**

Se tomaron 2 muestras de caldo bacteriano de 0.5 mL en microtubos eppendorf de 1.5 mL, luego se centrifugó a 10 000 g durante 20 minutos en una microcentrífuga SIGMA Typ Model 1-14, para obtener el sobrenadante libre de células.

Luego se midió el pH con un potenciómetro por inmersión de electrodo, previamente calibrado, se midieron las muestras por duplicado.

#### **3.4.2. Análisis mediante HPLC**

Las muestras fueron colocadas en microtubos eppendorf de 2 mL, se muestreo por duplicado, luego se centrifugó a 2 750 g durante 10 min a 4 °C en una microcentrífuga temperada marca Hettich MIKRO 200R, luego 600 µL de sobrenadante se desproteinizó con 50 µL de Carrez A [3.6% (p/v) de K<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)·3H<sub>2</sub>O] homogenizando la mezcla, después se agregó 50µL de Carrez B [7.2% (p/v) de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O] homogenizando en un vortex, luego se añadió 100 µL de 0.1 M NaOH, después se diluyó hasta 1000 µL con agua ultrapura. Se centrifugó a 14,500 g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se diluyó 5 veces, se filtró (0.2-µm filtros), finalmente se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

Para analizar azúcares se utilizó una columna Hi-Plex Ca, con un flujo de 0.6 mL/min a 80 °C, usando agua ultrapura como fase móvil. (Ortiz, *et al.*, 2012)

Debido a la metodología del tratamiento de la muestra para su análisis en HPLC, se observa una dilución de la muestra durante todo el proceso, por ende, la dilución que sufre la muestra es de 600/5000, es decir 3/25, por lo tanto, cada concentración que arroja el HPLC debe ser multiplicado por 25/3.

### **3.5. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se evaluaron por ANOVA de un solo factor mediante el programa *STATGRAPHICS Centurion XVI.I*, donde el indicador del nivel de significancia fue de  $p < 0.05$ , además se realizó la prueba de Tukey para realizar la comparación entre grupos. Los gráficos se realizaron utilizando *Excel 2016*, graficándose la media y como barra de error su desviación estándar (SD).

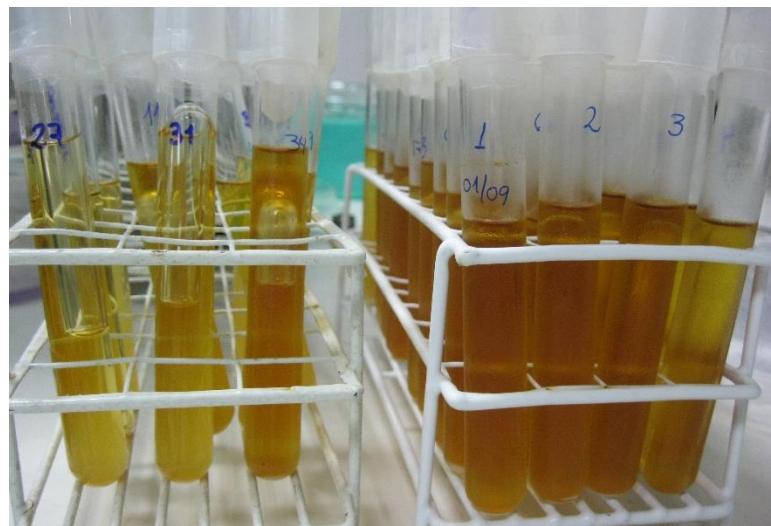
## IV. RESULTADOS

### 4.1. Selección de bacterias heterofermentativas en medio MRS para la producción de manitol

La formación de CO<sub>2</sub> se presentó en 10 de 41 cepas BAL analizadas (Tabla 6, Figura 11) se realizó por duplicado y presentaron los mismos resultados, siendo las productoras de CO<sub>2</sub> las cepas heterofermentativas 1TP05-BL03, 1TP05-BL11, 1TP07-BL07, 1TP07-BL11, 1TP09-BL01, 1TP09-BL02, 1TP09-BL04, 1TP10-BL03, 1TP11-BL09 y 1TP12-BL08.

**Tabla 6.** Resultado de producción de CO<sub>2</sub> de 41 cepas BAL aisladas de tunta

Cepa	Formación de CO <sub>2</sub>	Cepa	Formación de CO <sub>2</sub>
1TP01-BL01	-	1TP07-BL11	+
1TP01-BL04	-	1TP08-BL02	-
1TP02-BL01	-	1TP08-BL03	-
1TP02-BL02	-	1TP08-BL05	-
1TP03-BL02	-	1TP08-BL07	-
1TP04-BL01	-	1TP09-BL01	+
1TP04-BL02	-	1TP09-BL02	+
1TP04-BL03	-	1TP09-BL04	+
1TP04-BL04	-	1TP09-BL13	-
1TP05-BL03	+	1TP10-BL01	-
1TP05-BL11	+	1TP10-BL03	+
1TP05-BL18	-	1TP10-BL04	-
1TP05-BL20	-	1TP11-BL06	-
1TP05-BL24	-	1TP11-BL09	+
1TP06-BL05	-	1TP11-BL10	-
1TP06-BL06	-	1TP11-BL12	-
1TP06-BL07	-	1TP11-BL13	-
1TP07-BL02	-	1TP12-BL01	-
1TP07-BL07	+	1TP12-BL08	+
1TP07-BL10	-	1TP12-BL14	-
		1TP10-BL02	-



**Figura 11.** Formación de CO<sub>2</sub> en campanas Durham producidas por BAL heterofermentativas (lado izquierdo) y BAL homofermentativas que no produjeron CO<sub>2</sub> (lado derecho).

Luego se realizó una tinción simple a las 10 cepas seleccionadas para observar su morfología celular, dando el siguiente resultado (Tabla 7).

**Tabla 7.** Morfología celular de las 10 cepas BAL heterofermentativas

Cepa	Morfología
1TP05-BL03	Bacilo pequeño
1TP05-BL11	Coco
1TP07-BL07	Bacilo pequeño
1TP07-BL11	Bacilo
1TP09-BL01	Coco
1TP09-BL02	Bacilo pequeño
1TP09-BL04	Coco
1TP10-BL03	Bacilo pequeño
1TP11-BL09	Bacilo pequeño
1TP12-BL08	Bacilo pequeño

#### **4.2. Comparación de bacterias ácido lácticas heterofermentativas aisladas de tunta con respecto a la producción de manitol**

Se trabajó con las 10 cepas seleccionadas y se realizó la fermentación con mMRS que posee 0.5% (*p/v*) de glucosa y 0.5% (*p/v*) de fructosa, para observar cuál de las 10 cepas era la óptima para trabajar en la siguiente etapa con el medio MRSmc, se eligió la cepa 1TP10-BL03 (resaltada en Tabla 8), ya que presentó mayor rendimiento de producto a partir de sustrato (Y<sub>p/s</sub>) y mayor productividad volumétrica (Q<sub>p</sub>) con respecto a las demás cepas. Se trabajó en matraces de 250 mL de volumen con 140 mL de caldo mMRS agitados a 100 rpm manteniéndose a 28 °C (Todos los resultados en Anexo 3, 3.1).

El rendimiento de manitol a partir de fructosa se halló de la siguiente manera:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{g \text{ de manitol producido}}{g \text{ de fructosa consumida}}$$

Depende del investigador usar las unidades g/g, mol/mol o % para el rendimiento (Y<sub>p/s</sub>).

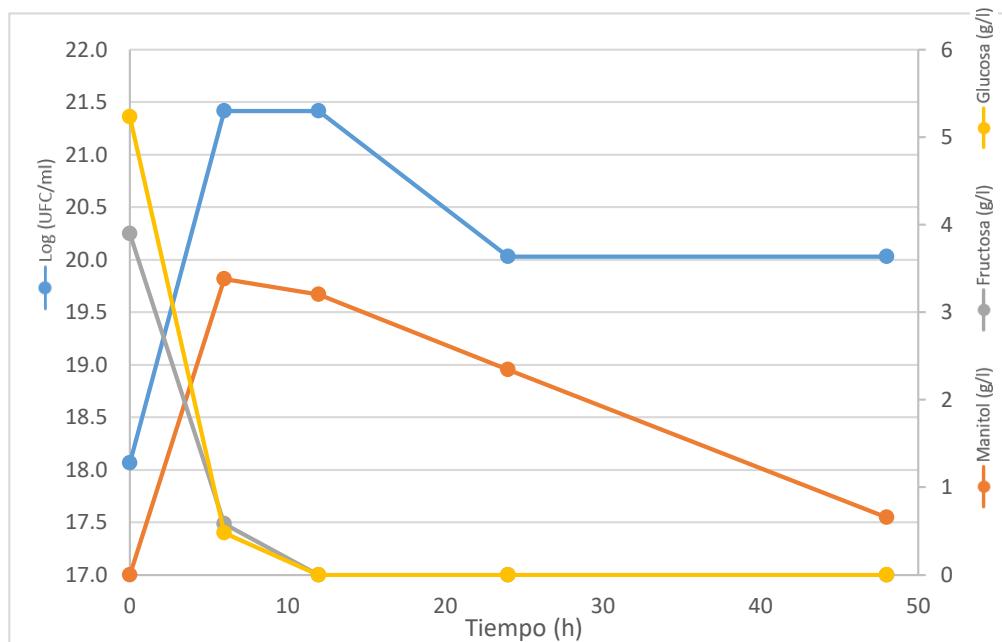
Por otro lado, la productividad volumétrica o la velocidad volumétrica se halló de la siguiente manera:

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{\text{manitol } g/L}{\text{tiempo de fermentación } h}$$

**Tabla 8.** Producción de manitol de 10 cepas BAL aisladas de tunta

Cepa	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>p/s</sub> (mol/mol)	Q <sub>p</sub> (g/L h)
1TP05-BL03	0.81	0.80	0.26
1TP05-BL11	0.27	0.27	0.05
1TP07-BL07	0.80	0.79	0.25
1TP07-BL11	0.70	0.69	0.25
1TP09-BL01	0.69	0.68	0.25
1TP09-BL02	0.69	0.68	0.23
1TP09-BL04	0.76	0.75	0.26
<b>1TP10-BL03</b>	<b>0.87</b>	<b>0.86</b>	<b>0.56</b>
1TP11-BL09	0.79	0.78	0.54
1TP12-BL08	0.65	0.64	0.19

La cepa 1TP10-BL03 y 1TP11-BL09, presentaron la mayor Q<sub>p</sub>, puesto que ambas cepas produjeron la mayor cantidad de manitol a las 6 h de fermentación a comparación del resto de las cepas que produjeron mayor cantidad de manitol a las 12 h y la cepa 1TP05-BL11 a las 24 h de fermentación por ende su Q<sub>p</sub> es menor que el resto de cepas.



**Figura 12.** Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y fructosa, y producción de manitol de la cepa 1TP10-BL03.

La cepa 1TP10-BL03, consumió en su totalidad la fuente de carbono, glucosa y fructosa a las 12 h de fermentación, es evidente que la mayor cantidad de fructosa se transformó en manitol y éste fue liberado extracelularmente, además a partir de las 24 h hasta las 48 h de fermentación se mantuvo constante el número de células viables y la concentración de manitol disminuye, por lo tanto el manitol sería usado por la bacteria como fuente de carbono al no haber presencia de glucosa ni fructosa. También se puede observar existe una relación entre la producción de manitol con respecto al crecimiento bacteriano, ya que ambos perfiles aumentan durante el mismo periodo de tiempo (Figura 12).

Por otra parte, el pH disminuyó en un punto desde 5.5 a 4.5, al igual que en el resto de fermentaciones con las otras 9 BAL (ver Anexo 3, Tabla 17).

En este procedimiento no se evaluaron los demás subproductos de las fermentaciones para las 10 BAL evaluadas, como lo son el ácido láctico y acético, ya que lo principal era conocer qué cepa presentaba un mayor rendimiento de manitol y productividad volumétrica con respecto al resto.

Además, en estas fermentaciones se observó que se debía tener una toma de muestra a las 9 h, para la siguiente etapa del experimento, y así poder hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en para cada tratamiento.

#### **4.3. Producción de manitol a partir de melaza de caña de azúcar mediante la cepa 1TP10-BL03**

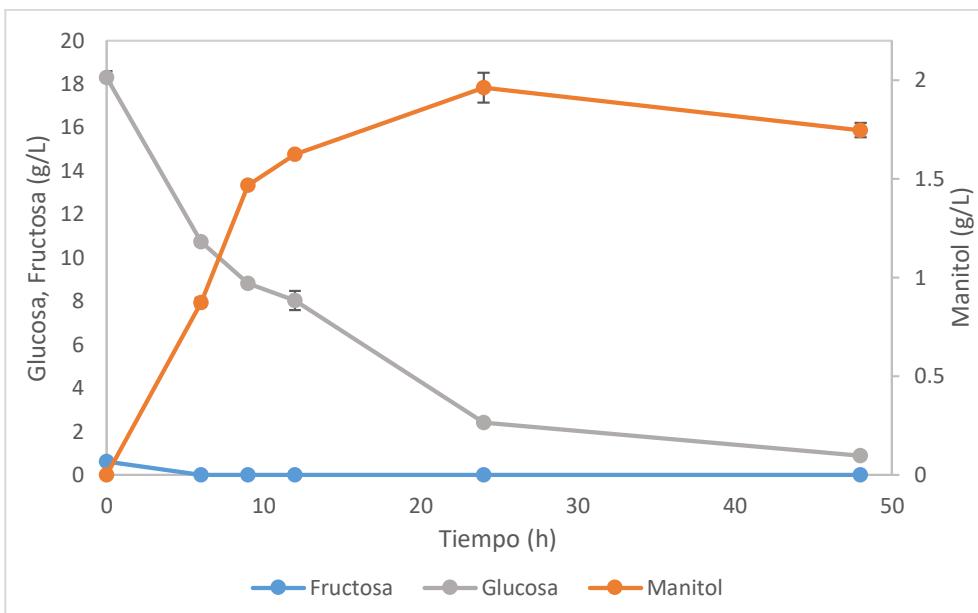
Se realizó la lectura de azúcares en HPLC de una solución de melaza de caña de azúcar al 10%, resultando 2.22 g/L de sacarosa, 1.04 g/L de glucosa, 0.81 g/L de fructosa y 0.07 g/L de manitol, para tener como referencia para las lecturas de HPLC de las muestras a las 0 h.

Todos los experimentos se realizaron en matraces de 250 mL de volumen con 140 ml de caldo de cultivo y fueron agitados a 100 rpm manteniéndose a 28 °C.

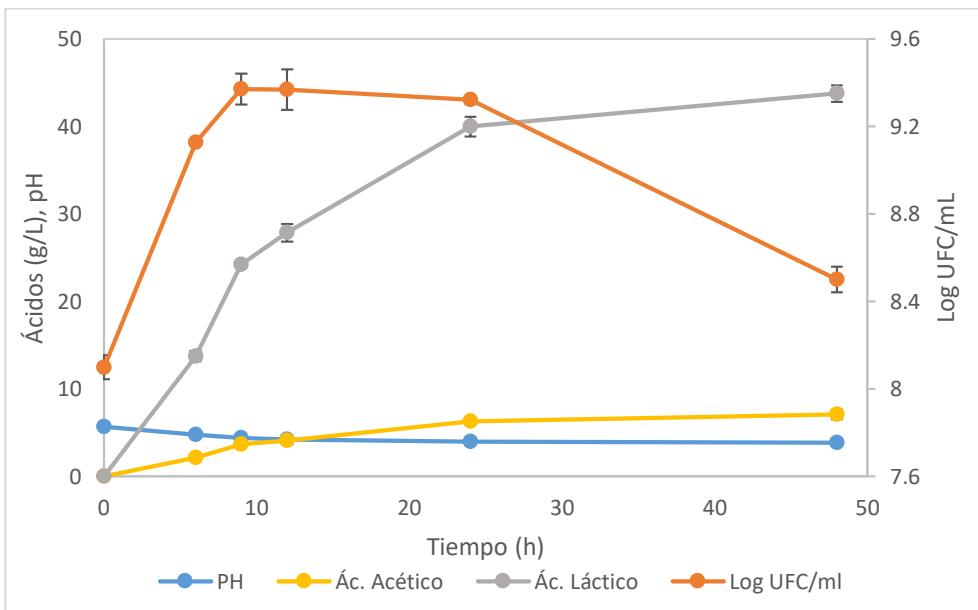
Con respecto al control, el HPLC detectó pequeñas cantidades de fructosa al inicio de la fermentación que fueron consumidas a las 6 h, a pesar que solo se trabajó con medio MRS para el control, es decir solo contenía glucosa como fuente de carbono. Se observó una pequeña producción de manitol en el control ( $1.75 \pm 0.036$  g/L), la glucosa fue consumida casi en su totalidad, dejando como glucosa residual  $0.88 \pm 0.08$  g/L (Figura 13).

Por otro lado, la cepa produjo mayor concentración de ácido láctico ( $43.77 \pm 0.95$  g/L) aumentando su concentración durante las 48 h mientras se consumía la glucosa durante la fermentación, también se generó ácido acético ( $7.05 \pm 0.55$  g/L) (Figura 14)

En cuanto al crecimiento bacteriano, se aprecia claramente la fase logarítmica o exponencial desde las 0 h hasta las 9 h, la fase estacionaria desde las 9 h hasta las 24 h y la muerte celular desde las 24 h hasta las 48 h de fermentación (Figura 14). El pH en el control varía mucho más, empezando en 5.7 descendiendo a 3.9, a comparación de los demás tratamientos.



**Figura 13.** Producción de manitol y consumo de fructosa y glucosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio MRS (Control)

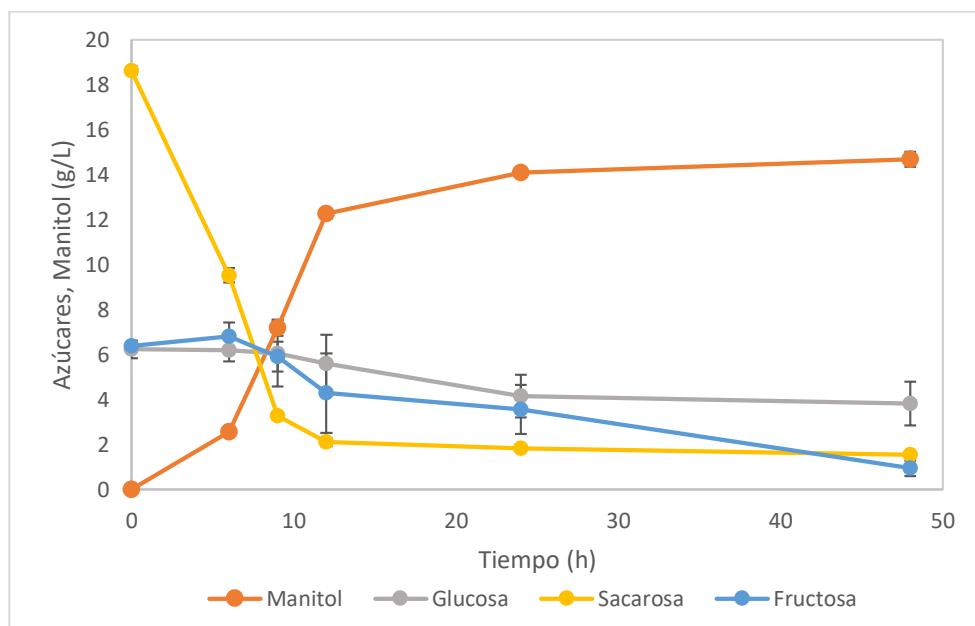


**Figura 14.** Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio MRS (control)

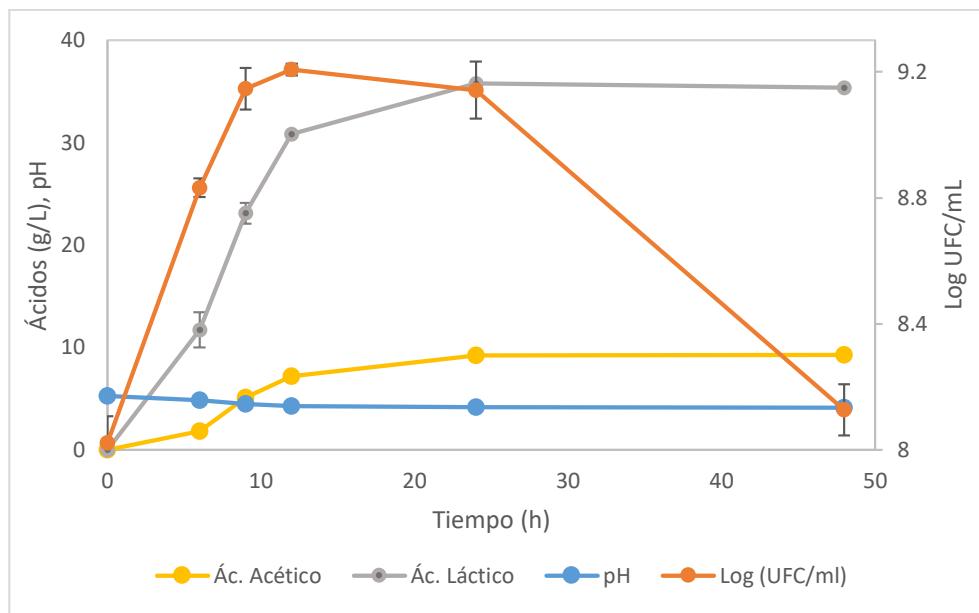
Se trabajó con tres tratamientos, dentro de los cuales estaba el medio 10% MRmc, que contenía 10% de melaza de caña de azúcar, en este tratamiento la cepa produjo  $14.69 \pm 0.33$  g/L de manitol a las 48 h a partir de la fructosa libre y la fructosa que se encuentra en la sacarosa ( $11.80 \pm 1.06$  g/L de fructosa total consumida), asimismo, consumió

$17.09 \pm 0.20$  g/L de sacarosa y solo  $2.43 \pm 0.76$  g/L de glucosa libre y  $11.40 \pm 0.83$  de glucosa total (glucosa libre más glucosa a partir de la sacarosa) consumida (Figura 15).

Además de manitol, se produjo ácido láctico y acético que en este caso la mayor producción fue de  $35.83 \pm 0.04$  g/L de ácido láctico a las 24 h y  $9.28 \pm 0.17$  g/L de ácido acético a las 48 h, al mismo tiempo se puede observar el crecimiento bacteriano en la figura 16, mostrando una mayor concentración de Log UFC/mL a las 12 h, para luego descender hasta las 48 h, comparándolo con la producción de manitol, éste es generado en mayor concentración también hasta las 12 h de fermentación, sin embargo se continúa produciendo a las 24 h y 48 h pero en menor proporción. Por último, el pH solo varía en un punto en toda la fermentación.



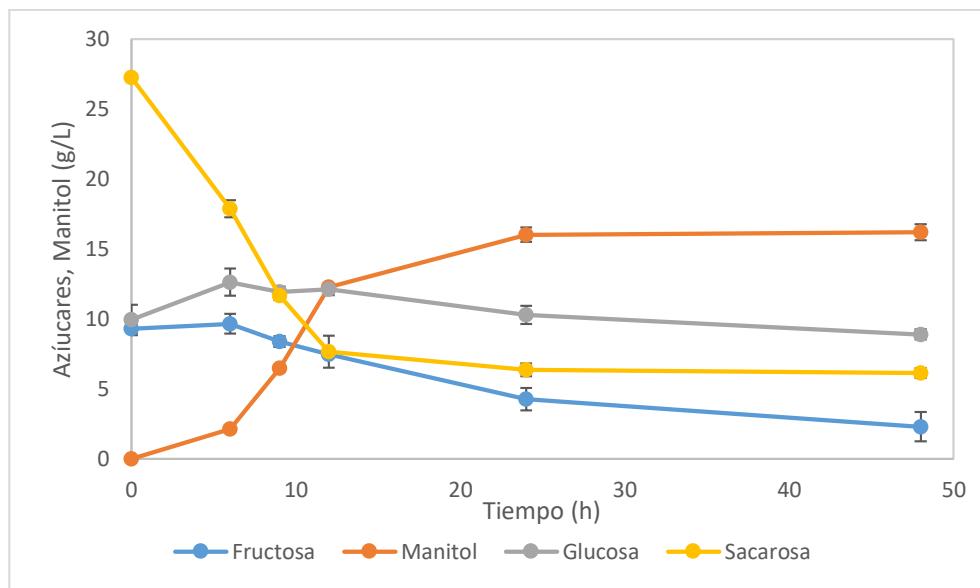
**Figura 15.** Producción de manitol y consumo de fructosa, glucosa y sacarosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio 10% MRSmc



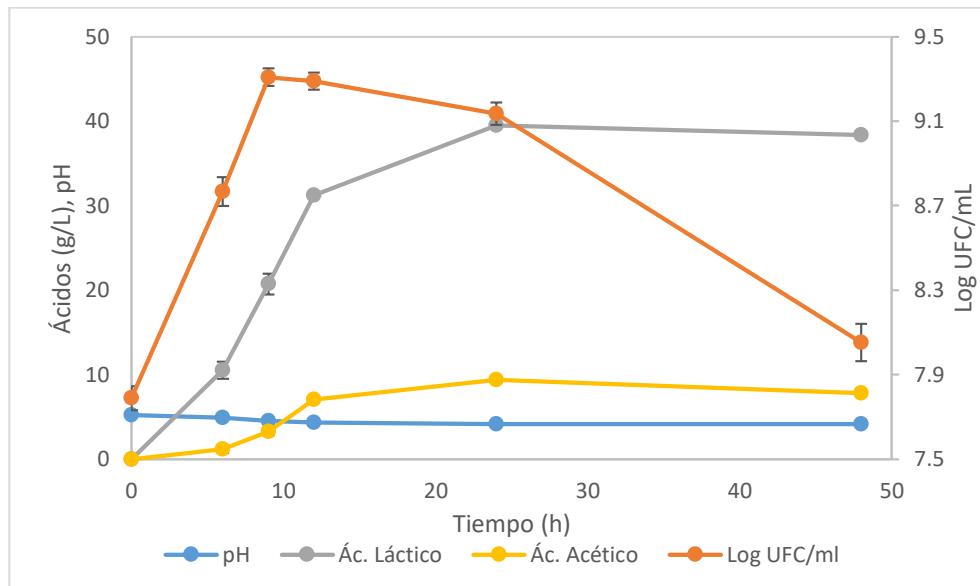
**Figura 16.** Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio 10% MRSmc

El otro tratamiento trabajado fue en medio 15% MRSmc, en este tratamiento se produjo  $16.21 \pm 0.57$  g/L de manitol a las 48 h, una concentración un poco mayor a la que se obtuvo en medio 10% MRSmc, se consumió  $18.13 \pm 1.24$  g/L de fructosa total (fructosa libre más fructosa a partir de sacarosa), también se observa en la figura 17 que la glucosa aumenta y disminuye durante la fermentación y pareciese que no se consumió. Sin embargo, se consumió solo  $1.04 \pm 0.77$  g/L de glucosa libre y  $12.16 \pm 0.89$  g/L de glucosa total (glucosa libre más glucosa proveniente de la hidrólisis de la sacarosa); la sacarosa también fue consumida a mayor velocidad que la fructosa y glucosa libre, consumiéndose  $21.14 \pm 0.24$  g/L.

En la figura 18, se observa que la mayor velocidad de producción de ácido láctico y ácido acético se da hasta las 12 h no obstante sigue incrementándose su concentración hasta las 24 h ( $39.51 \pm 0.38$  g/L de ácido láctico y  $9.37 \pm 0.11$ ) para luego disminuir a las 48 h de fermentación. Igualmente se ve el crecimiento de la cepa 1TP10-BL03 expresado en Log UFC/mL, donde la fase exponencial se da lugar a las 9 h, a diferencia del tratamiento 10% MRSmc que se observó el punto más alto de crecimiento a las 12 h; luego una fase de latencia hasta las 24 h y finalmente la fase de muerte celular desde las 24 hasta las 48 h de fermentación. Finalmente, el PH disminuyó desde 5.2 hasta 4.1 durante toda la fermentación.



**Figura 17.** Producción de manitol y consumo de fructosa, glucosa y sacarosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio 15% MRSmc.

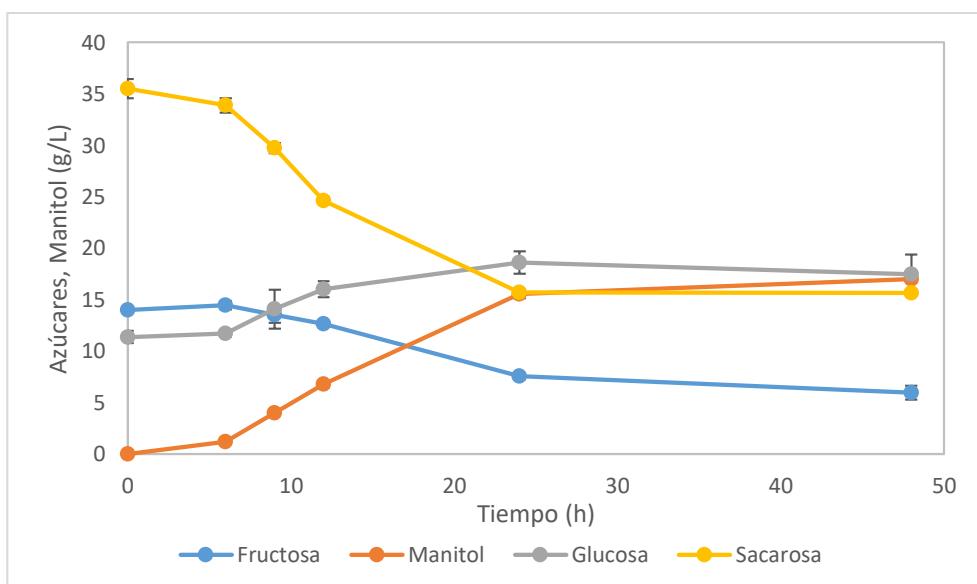


**Figura 18.** Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio 15% MRSmc

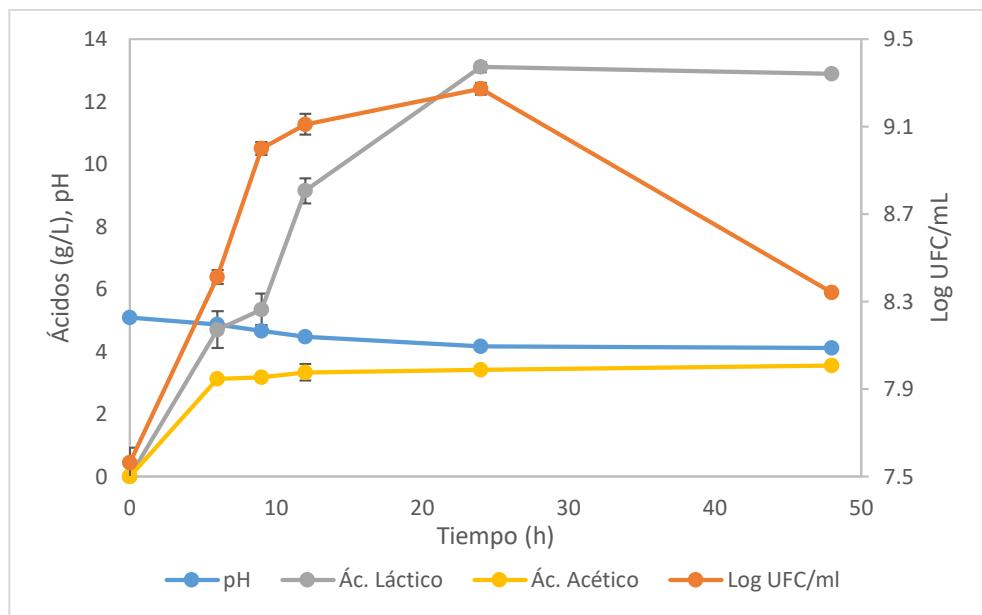
En este último tratamiento, 20% MRSmc se obtuvo la mayor concentración de manitol en comparación con los otros tratamientos ( $17.01 \pm 0.40$  g/L), el consumo de fructosa total fue de  $18.46 \pm 0.76$  g/L, cabe resaltar que se relaciona la producción de manitol con el consumo de fructosa, ya que la fructosa se transforma en manitol mediante la enzima manitol 2-deshidrogenasa en bacterias heterofermentativas. También se observa

que la glucosa libre en el medio no es consumida, sino todo lo contrario incrementa su concentración a través del tiempo, excepto entre las 24 h y 48 h que disminuye en 1.19 g/L, mientras que la sacarosa disminuye hasta las 24 h y se mantiene constante hasta las 48 h de fermentación (sacarosa consumida  $19.83 \pm 0.86$  g/L), por lo tanto, la glucosa total consumida fue de  $4.38 \pm 2.52$  g/L (Figura 19). En este tratamiento se consumió muy poca cantidad de glucosa a comparación de los otros tratamientos que fue poco menos del triple del glucosa consumida en los medios 15% MRSmc y 10% MRSmc.

Los metabolitos que también se produjeron durante la fermentación además del manitol, fueron el ácido láctico y ácido acético, se produjo mayor concentración de ácido láctico a las 24 h siendo de  $13.11 \pm 0.16$  g/L, mientras que se produjo mayor concentración de ácido acético igual a  $3.55 \pm 0.08$  g/L a las 48 h de fermentación. Con respecto al crecimiento bacteriano el punto más alto para Log UFC/mL fue a las 24 h. Sin embargo, según la gráfica se observa que hasta las 9 h se da lugar a la fase exponencial, luego de 12 h a 24 h la fase estacionaria, si bien es cierto que aún se continúa incrementando el Log UFC/mL, este incremento es poco a comparación del incremento que se observa claramente a partir de las 0 h hasta las 9 h; por último, desde las 24 hasta las 48 h se observa la muerte celular con un descenso en el Log UFC/mL. Mientras que el pH también disminuye en un punto (5.1 a 4.1) al igual que en el tratamiento 10% MRSmc y 15% MRSmc (Figura 20).



**Figura 19.** Producción de manitol y consumo de fructosa, glucosa y sacarosa por la cepa 1TP10-BL03 en medio 20% MRSmc



**Figura 20.** Producción de ácido láctico y acético, perfil de pH y crecimiento bacteriano (Log UFC/mL) de la cepa 1TP10-BL03 en medio 20% MRSmc

Ahora bien, es evidente que la velocidad de hidrólisis y/o consumo de sacarosa fue mucho más rápida en el medio 10% MRSmc, comparando el perfil de consumo de sacarosa en medio 10% MRSmc (Figuras 15) se observó un consumo de sacarosa más marcado a comparación con la del medio de 15% MRSmc (Figura 17), y observándose un perfil de consumo de sacarosa mucho más lento en el medio 20% MRSmc (figura 19). Por lo tanto, a mayor incremento de concentración de melaza de caña de azúcar nuestra cepa se tomará más tiempo para consumir y/o hidrolizar la sacarosa.

Adicionalmente, en los tres tratamientos y en el control, se observó que se produjo una mayor cantidad el ácido láctico a comparación del ácido acético, las concentraciones de ácido láctico fueron 5 veces aprox. en comparación con el ácido acético.

Por otro lado, se evaluó mediante un análisis de ANOVA de una vía si existía una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los rendimientos (Yp/s en unidades de mol/mol) hallados a las 24 h y 48 h de fermentación ya que durante este periodo se incrementa levemente la concentración de manitol. Los rendimientos no presentaron diferencia significativa (ver Anexo 4), por ende, se trabajará con los rendimientos hallados a las 24 h de fermentación.

Con respecto al crecimiento de la cepa 1TP10-BL03, se observó el crecimiento exponencial desde las 0 h hasta las 9h a 12 h en todos los tratamientos, cabe resaltar que

la diferencia de log(UFC/mL) entre las 9 h y 12 h es muy poca, por ello se procedió a hallar el  $\mu$  de la cepa 1TP10-BL03 para cada tratamiento teniendo como fase exponencial desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación.

Para hallar el  $\mu$ , primero se observó el perfil del crecimiento bacteriano (logUFC/mL vs tiempo) hallándose la fase exponencial de crecimiento, se procede a graficar el Ln UFC/mL, solo de la fase exponencial, vs tiempo, luego se realiza una regresión lineal obteniéndose la ecuación de la recta e igualando la pendiente de la recta al  $\mu$  bacteriano (ver Anexo 2, Protocolo 4), los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9, siendo la media  $\pm$  SD, se observa que la velocidad específica de crecimiento más alta se obtuvo en el medio 15% MRSmc ( $0.39 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ), siendo más alto que el control.

**Tabla 9.** Velocidad específica de crecimiento de 1TPBL10-BL03 para cada tratamiento desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación

Tratamiento	$\mu (\text{h}^{-1})$
Control	$0.34 \pm 0.03^{\text{ab}}$
10% MRSmc	$0.29 \pm 0.03^{\text{a}}$
15% MRSmc	$0.39 \pm 0.01^{\text{c}}$
20% MRSmc	$0.36 \pm 0.02^{\text{bc}}$

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre letras diferente, según la prueba LSD ( $p<0.05$ ).

En cuanto a la producción de manitol, éste se produce en mayor cantidad en los medios 15% MRSmc y 20% MRSmc, a comparación del medio 10% MRSmc y el control (la producción de manitol fue muy baja de 1.7 g/L) es por ello que ya no se consideró en la Tabla 10.

Estadísticamente según la prueba de Tukey no existe diferencia significativa entre la concentración de manitol producida en 15% MRSmc y 20% MRSmc (ver Anexo 4). Sin embargo, el rendimiento de manitol a partir de fructosa (Yp/s) es mayor en el medio 15% MRSmc así como la productividad volumétrica a comparación de la fermentación en medio 20% MRSmc (Tabla 10).

Las unidades del Yp/s pueden ser g/g o mol/mol, ya que se realizaron los cálculos y los resultados con un dígito decimal fueron los mismos para ambas unidades.

Se observa que no existe una diferencia significativa con respecto al  $\mu$  bacteriano entre el tratamiento 15% MRSmc y 20% MRSmc al igual que en la producción de manitol en

ambos tratamientos. Sin embargo, debido al costo generado por el sustrato se opta por la menor concentración de melaza de caña de azúcar (15% MRSmc).

Por consiguiente, los mejores resultados teniendo en cuenta el Yp/s, Qp y  $\mu$  bacteriano se obtuvieron con el medio 15% MRSmc.

**Tabla 10.** Consumo total de fructosa, producción de manitol, rendimiento de manitol (Yp/s) y productividad volumétrica mediante la cepa 1TP10-BL03 a las 24 h de fermentación a 28 °C

Medio con melaza de caña	Consumo Total de Fructosa (g/L)	Producción de Manitol (g/L)	Yp/s	Qp (g/L h)
10% MRSmc	11.65 ± 1.05	14.10 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.2	0.59
15% MRSmc	16.05 ± 0.91	16.03 ± 0.59 <sup>b</sup>	1.0	0.67
20% MRSmc	16.87 ± 0.51	15.56 ± 0.38 <sup>b</sup>	0.9	0.65

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre letras diferente (a-b), según la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ).

## V. DISCUSIÓN

Se realizó un screening de bacterias heterofermentativas observando la formación de CO<sub>2</sub> de campanas Durham, ya que según la ruta metabólica de las BAL heterofermentativas son capaces de formar CO<sub>2</sub> a partir de glucosa-6-P a 6-P-gluconato liberándose CO<sub>2</sub> y reduciéndose el NAD<sup>+</sup> a NADH + H para formarse la ribulosa 5-P (Figura 10) (Bleckwedel, 2017), basándose en este paso de la ruta metabólica realizó el screening de bacterias heterofermentativas. Por otro lado, las BAL homofermentativas también pueden producir CO<sub>2</sub> mediante una fermentación ácido mixta, siendo una de las causas la acumulación de piruvato y la proporción de NADH a NAD<sup>+</sup> en el medio. Cuando la concentración de piruvato intracelular excede el ácido láctico producido por la enzima lactato deshidrogenasa, el piruvato se deriva a otras vías para su transformación mientras se oxida el NADH. Estas vías alternativas también proporcionaron a las células los medios para producir un ATP adicional y también la formación de CO<sub>2</sub> (piruvato + CoA + NAD<sup>+</sup> → acetil CoA +CO<sub>2</sub> + NADH + H<sup>+</sup>, luego acetil-CoA → acetato + ATP). Una fermentación ácido mixta también se puede dar cuando existe oxígeno en el medio (el NADH que actuaba sobre la reducción del piruvato, podría oxidarse usando el oxígeno como aceptor de electrones, evitando así la reacción del lactato deshidrogenasa) o en condiciones anaeróbicas cuando la fuente de carbono es limitada (causando la falta de fructosa-1,6-difosfato, baja actividad de isomerasas, lactato deshidrogenas, y la acumulación de piruvato) y una baja tasa de crecimiento (Wang, *et al.*, 2019). Sin embargo, estas condiciones no se dieron durante el screening de bacterias heterofermentativas, puesto que se dio en condiciones anaeróbicas y con suficiente concentración de fuente de carbono (glucosa), descartándose así algún falso positivo como resultado.

Por otra parte, se sabe que las bacterias homofermentativas también son capaces de producir manitol mediante la conversión de fructosa-6-fosfato a manitol-1-fosfato luego éste se desfosforila convirtiéndose en manitol que a su vez sería secretado extracelularmente mediante un sistema de transporte. Sin embargo, se ha reportado que producen cantidades muy pequeñas. Loesche & Kornman (1976) reportaron que *Streptococcus mutans* produjo 0.1 – 0.3 mg a partir de 1.5 % de sucrosa como fuente de carbono. Las bacterias homofermentativas dirigen principalmente la fuente de carbono a la producción de acetato, es por ello que para la producción de manitol la enzima

lactato deshidrogenasa debería inactivarse para que se redirija el flujo metabólico hacia la producción de manitol, regenerándose el NAD<sup>+</sup> mediante la conversión de fructosa - 6-fosfato a manitol-1-fostato en lugar de regenerarse mediante la conversión de piruvato a lactato. Neves, *et al.* (2002) compararon un *Lactococcus lactis* MG1363 y su derivado mutante deficiente de lactato deshidrogeanasa (LDHd), produciendo 100 mM de manitol-1-fosfato, es decir manitol intracelular, a partir de 55mM de glucosa y 0.4 mM de manitol extracelular. La acumulación de manitol intracelularmente conllevaría a realizar un paso más en el downstream, ya que se tendría que lisar las células para que el manitol quede libre en el medio.

Debido a las razones anteriormente expuestas no se optó por la producción de manitol en bacterias homofermentativas en el presente trabajo, sino por el empleo de BAL heterofermentativas porque estas producen mayor cantidad de manitol a partir de fructosa y es liberado extracelularmente (Wisselink, *et al.*, 2002).

En lo que concierne a los perfiles de crecimiento de la cepa utilizada, se observa un descenso marcado a partir de las 24 h de fermentación en los 3 tratamientos utilizados (Figura 16, 18 y 20). Ortiz (2014) reporta un perfil de crecimiento bacteriano similar con el presente trabajo, puesto que también se observa la fase de muerte celular a las 24 h de fermentación en un cultivo MRS suplementado con melaza de caña de azúcar al 7.5% a 100 rpm y pH libre. Esto debido a la disminución de sustrato que posee la bacteria así como el incremento de ácidos orgánicos que limitarían su crecimiento.

Con respecto a los perfiles de pH, estos disminuyen en un punto cuando se utiliza el medio mMRS (Anexo 3, tabla 17) al igual que cuando se realiza la fermentación en los medio MRSmc, pero se observa la disminución de 2 puntos de pH cuando se realiza la fermentación en medio MRS (control), debido a que se produce mayor cantidad de ácidos (ácido láctico + acético) en el control, a comparación de la cantidad de ácidos producidos en el medio MRSmc, también el manitol que se produce en los medios mMRS y MRSmc tendría que ver con la menor disminución de pH a comparación de la fermentación en MRS tal como lo mencionan Rice, *et al.*(2020). Además, la melaza de caña de azúcar posee una capacidad buffer (Dumbrepatil, *et al.*, 2008) sin permitir que el pH baje demasiado durante la fermentación en medio MRSmc. Asimismo, Prechtl, *et al.*, (2018), obtuvieron un pH final ligeramente más ácido cuando trabajaron con medio MRS a comparación de un medio MRS modificado, ya que en lugar de tener glucosa como fuente de carbono tenía sacarosa. En esta investigación también ocurrió algo

similar, solo que la diferencia de pH fue de 2 puntos para la fermentación en medio MRS y de un punto para la fermentación en medio MRSmc (posee sacarosa, glucosa y fructosa).

Por otra parte, según Fontes, *et al.* (2013) reportaron que trabajar con pH libre con la cepa *Leuconostoc citreum* B-742, que es una BAL heterofermentativa, no presentó una conversión significativa de fructosa a manitol con respecto a una fermentación a pH controlado de 5.0, mientras que *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, obtuvo mayor rendimiento de conversión (95 %) a pH constante de 5.0. Igualmente, Otgonbayar, *et al.*, (2011), reportaron que *Leuconostoc mesenteroides* MU3, *Leuconostoc mesenteroides* D1 y *Leuconostoc citreum* KACC 91348P obtuvieron mayor producción de manitol a pH constante de 6.5 en un cultivo batch con caldo MRS. También Rodríguez, *et al.* (2012), trabajaron a pH constante de 5.0 y pH libre en un cultivo por lote, obteniendo mayor rendimiento de manitol a pH constante de 5.0 para *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 y *L. fermentum* CRL 573.

Teniendo en cuenta a Fontes, *et al.* (2013) y sabiendo que la melaza de caña de azúcar posee capacidad buffer o amortiguadora, manteniendo de cierta manera el pH durante la fermentación, se optó por trabajar a pH libre todas las fermentaciones.

La cepa 1TP10-BL03, también se utilizó en otro trabajo de investigación puesto que se realizó en el mismo laboratorio que la presente tesis, sin embargo el trabajo experimental de esta tesis se realizó sin tener conocimiento a que género y clase pertenecía la cepa 1TP10-BL03. Ramos, *et al.* (2018) caracterizaron molecularmente la cepa 1TP10-BL03 mediante el gen 16S rRNA, comparando la secuencia de nucleótidos en la base de datos del NCBI dando como resultado la bacteria, *Lactobacillus curvatus* JCM 1096<sup>T</sup> con una identidad del 100 %.

*Lactobacillus curvatus* es una bacteria facultativamente heterofermentativa incluida en el grupo de *Lactobacillus sakei* (ambas bacterias están relacionadas filogenéticamente). Su nombre refleja su forma: varillas simples con una ligera curva en forma de luna. *Lactobacillus curvatus* es un miembro de la población NSLAB (bacterias ácido lácticas no iniciadoras) en muchas variedades de queso (Fuquay, *et al.*, 2011; Hammes & Vogel, 1995).

*Lactobacillus curvatus* contiene dos subespecies: *curvatus* y *melibiosus*. Estas subespecies sólo pueden distinguirse mediante métodos de determinación molecular.

*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* y subsp. *melibiosus* tienen 42-44% de contenido de G + C (% mol) y el peptidoglicano de tipo lisina-D-aspártico (Fuquay, *et al.*, 2011).

*Lactobacillus curvatus* crece a 15 °C, pero no a 45 °C. Algunas cepas pueden crecer a 2-4 °C, siendo bacterias psicrótrofas (Santos, *et al.*, 1997). Esto respalda lo siguiente, esta bacteria se aisló durante el proceso de la elaboración de la tunta en el altiplano puneño donde la tunta fue elaborada hasta temperaturas menores a 5 °C. Razón por la cual se trabajó a 28 °C en todas las fermentaciones y no se optó por una temperatura más alta como 30 ó 35 °C, se trabajó a 28 °C desde el screening de bacterias heterofermentativas (que se dio en tubos de ensayo) hasta el ensayo de producción de manitol con melaza de caña de azúcar, en vista que todas las bacterias se aislaron del proceso de la elaboración de la tunta. Asimismo, Castilho, *et al.* (2019) evaluó el crecimiento de dos cepas de *Lactobacillus curvatus* a diferentes temperaturas, donde se observa un mayor OD (600 nm) a 25 °C que a 30 y 37 °C. Por lo tanto, según la literatura se trabajó a una adecuada temperatura de incubación. Además, es importante tener en cuenta que el incremento de temperatura de incubación conllevaría a un incremento en los gastos de operación y consumo de energía durante la fermentación si se llevase a la siguiente etapa que vendría a ser a escala piloto.

En el presente trabajo, los mejores resultados se obtuvieron en el medio 15% MRSmc mediante la cepa 1TP10-BL03 (*Lactobacillus curvatus*) con un rendimiento de manitol de 1 g g<sup>-1</sup> o mol mol<sup>-1</sup> a las 24 h de fermentación. El haber generado un rendimiento de 1, significaría que durante la fermentación se usó la fructosa exclusivamente como un acceptor alternativo de electrones. Dado que, durante la ruta metabólica, se reduce la fructosa a manitol mediante la enzima manitol deshidrogenasa y a su vez se el NADH + H<sup>+</sup> a NAD<sup>+</sup> mientras que el acetil fosfato se transforma a acetato liberándose una mol de ATP extra, porque de no realizarse la reducción de fructosa a manitol, la regeneración del NAD<sup>+</sup> durante esta reacción se tendrían que realizar mediante la producción de etanol y ya no se produciría acetato lo que conllevaría a no generar un ATP extra. Siendo esta la razón por la cual la bacteria opta por la producción de manitol y a su vez de acetato. Sin embargo, cuando se produce etanol se oxidan 2 moles de NADH + H<sup>+</sup> y en la reducción de fructosa a manitol solo se oxida 1 mol de NADH + H<sup>+</sup>, es por ello que se debe reducir 2 moles de fructosa para generar 2 moles de manitol y por ende oxidarse 2 moles de NADH + H<sup>+</sup>. Conociendo esta información, se puede hallar fácilmente el rendimiento de manitol a partir de fructosa, dividiéndose el número de moles de manitol

entre el número de moles de fructosa, resultando un rendimiento de 1 mol mol<sup>-1</sup>; alcanzándose este rendimiento en el presente estudio. Además, en óptimas condiciones se encuentra un máximo rendimiento de 2 mol de ATP por mol de glucosa fermentada y una reducción completa de fructosa a manitol, 1 glucosa + 2 fructosa → 1 lactato + 1 acetato + 2 manitol, siendo esta la reacción (Wisselink, *et al.*, 2002; Parra, 2010; Montano, *et al.*, 1992).

Conociéndose que el manitol y el acetato se deben producir al mismo tiempo, por ende, los perfiles de producción de manitol y ácido acético en las fermentaciones con melaza de caña de azúcar que se realizaron (Figura 15, 16, 17, 18, 19 y 20) poseen perfiles similares ya que ambos metabolitos se producen al mismo tiempo solo que a diferentes concentraciones, debido a que el ácido acético depende de la glucosa. Reforzándose así lo expuesto en el párrafo anterior. También es importante señalar la Figura 12, etapa de comparación de bacterias heterofermentativas en medio mMRS donde se observa un descenso de manitol mucho más marcado a partir de las 12 h porque no había ni glucosa ni fructosa para consumir, por lo que se deduce que la cepa 1TP10-BL 03, *Lactobacillus curvatus*, tiene la capacidad de consumir manitol, cabe mencionar que Castilho, *et al.* (2019) reportaron que dos bacterias de *Lactobacillus curvatus* a las que llamaron 12 y 13, fueron capaces de consumir manitol como sustrato para evaluar la producción de bacteriocinas, por el contrario Gandevia, *et al.* (2017) reportaron que la bacteria de *Lactobacillus curvatus* con la que trabajaron no fue capaz de fermentar manitol. Por ende nuestra bacteria al igual que las de Castilho, *et al.* (2019) son capaces de fermentar manitol. Mediante la enzima D-mannitol PTS permeasa (EC 2.7.1.197) codificado por el gen *mtlA* que fosforila al manitol para que ingrese al interior de la célula, según la base de datos de vías metabólicas de KEGG ([https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?lcv00051](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?lcv00051), [https://www.kegg.jp/dbget-bin/www\\_bget?ec:2.7.1.197](https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?ec:2.7.1.197))

Dentro de los tres tratamientos que se trabajó, se lograron mejores resultados con el medio 15% MRSmc, alcanzándose 1 g/g o 1 mol/mol como rendimiento de manitol (Yp/s), también se puede expresar como una conversión del 100 %, la productividad volumétrica (Qp) fue de 0.67 g/L h, la fermentación se realizó con la cepa 1TP10-BL03 que es *Lactobacillus curvatus* hasta la fecha no hay referencias del uso intencional de esta BAL para la producción de manitol en diferentes medios de cultivo o a diferentes temperaturas o pH, pero sí para la producción de otros metabolitos como por ejemplo la producción de bacteriocinas tales como la curvacina A y sackacina P además de su uso

en procesamiento cárnico, lechero, productos de pescado, en fermentaciones de vegetales y cereales (Chen, *et al.*, 2020). Es por ello que se compararán los resultados con la literatura a nivel de género de la bacteria.

Rice, *et al.* (2020), registraron que *Lactobacillus brevis* presentó un Yp/s de 0.61 g/g en medio MRS5 (en lugar de glucosa, maltosa y fructosa solo usaron fructosa como fuente de carbono) a diferentes concentraciones de fructosa 20, 60, 80 y 100 g/L con un Qp de 0.22, 0.52, 0.55 y 0.6 g/L h, respectivamente y para el medio MRS5 con 40 g/L de fructosa reportaron un Yp/s de 0.59 g/g y un Qp de 0.39 g/L h. Todas las fermentaciones se llevaron al cabo de 48 h.

Mientras que Saha (2006a) evaluó la producción de manitol de *Lactobacillus intermedius* B-3693 en un medio simplificado con 300 g/L de fructosa, a las 67 h de fermentación obtuvo un Yp/s de 0.67 g/g, un Qp 2.99 g/L h, está claro que obtuvo una productividad volumétrica mayor a la que se halló en este trabajo y trabajó a pH constante de 5.0 y a 37 °C. Además, Saha (2006b) trabajó con la misma bacteria, *Lactobacillus intermedius* B-3693, pero en medio con melaza de caña de azúcar y jarabe de fructosa con licor de maíz entre otros, obtuvieron un Yp/s de 0.87 g/g, con un Qp de 2.6 g/L h a 37 °C empezando con un pH de 6.5 y manteniéndolo en 5.0 durante 40 h de fermentación. Mientras que Saha & Nakamura, (2003), reportaron que *Lactobacillus intermedius* B-3693 obtuvo una conversión de 70% con una sola fuente de carbono, 250 g/L de fructosa, mientras que con 100g/L de fructosa y 50 g/L de glucosa obtuvo una conversión del 65%.

Adicionalmente, Ortiz, *et al.* (2012) trabajaron con la cepa *Lactobacillus reuteri* CRL 110 en medio MRS suplementado con melaza de caña de azúcar a diferentes concentraciones totales de azúcares (Mol 3%, Mol 5%, Mol 7.5% y Mol 10%), alcanzando mejores resultados con el medio Mol 7.5%, un Yp/s de 89.7 % y  $177.7 \pm 26.6$  mM de manitol a las 24 h de fermentación a pH libre y cultivo batch.

Weymarn, *et al.* (2002) realizaron la producción de manitol mediante *Lactobacillus fermentum* NRRLB-1932, logrando 93.6 mol% de Yp/s para manitol, con un medio simplificado que contenía 20 g/L de fructosa y 10 g/L de glucosa en cultivo batch a pH libre.

Zakaria & Ahmed (2014), produjeron  $74.38 \pm 5.06$  g/L de manitol con un Yp/s de 0.87 g/g y Qp de 1.55 g/L h con la bacteria *Lactobacillus brevis* NM101-1 en medio

suplementado con melaza de caña de azúcar hidrolizada en cultivo batch a pH libre, ese fue el resultado para la bacteria “salvaje” ya que trabajaron también con bacterias mutadas por rayos gamma.

Por otra parte, Carvalheiro, *et al.* (2010) reportaron que obtuvieron un rendimiento de 0.96 g/g con *Lactobacillus reuteri* y 0.91 g/g con *Lactobacillus intermedius*, siendo el *Lactobacillus reuteri* con un Qp 1.79 y 1.68 g/L h, respectivamente; estos valores fueron calculados a las 30 h de fermentación batch o por lote, trabajaron con medio MRS suplementado con jarabe de algarrobo hidrolizado (glucosa, fructosa y una pequeña parte de sacarosa) y le agregaron buffer citrato con el fin de que el pH se mantenga en rangos aceptables para el crecimiento microbiano.

Comparando nuestro Yp/s con la bibliografía pues obtuvimos un rendimiento alto del 100% o 1 g/g, por otro lado, el Qp que se generó en el medio 15% MRSmc fue bajo a comparación de la literatura a diferencia de Rice, *et al.* (2020) que reportaron un Qp menor de 0.39 g/L h al que se obtuvo en el presente trabajo (Qp: 0.68 g/L h).

En cuanto a la producción de ácidos orgánicos, se observó que la producción de ácido láctico fue mayor, seguido del ácido acético, además la producción de manitol fue menor que la del ácido láctico y mayor que la del ácido acético. Sin embargo, (Saha, 2006b; Saha, 2006a; Zakaria & Ahmed, 2014; Ortiz, *et al.*, 2012) produjeron mayor concentración de manitol seguido de ácido láctico y por último de acetato. No obstante es importante recalcar que en esos estudios se trabajaron con BAL heterofermentativas estrictas y en nuestro caso se trabajo con una BAL heterofermentativa facultativa que producirá ácido láctico como producto principal (Ibrahim & Ouwehand, 2019); en este estudio también se obtuvo una mayor concentración de ácido láctico a comparación de ácido acético como en la bibliografía.

En relación con la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en el medio 15% MRSmc fue de  $0.39 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  y en medio MRS fue de  $0.34 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ , son valores cercanos y se relacionan con algunos valores de  $\mu$  que presentan Janßen, *et al.* (2020) algunas cepas de *Lactobacillus curvatus* en medio MRS (no se modificó la fuente de carbono, glucosa 20 g/L) como 0.3, 0.2, 0.1  $\text{h}^{-1}$ , pero también hubo una cepa que presentó 0.7  $\text{h}^{-1}$ , siendo esta última poco más del doble del  $\mu$  que se halló en el presente trabajo, sin embargo queda claro que  $\mu$  variará de acuerdo a la cepa que se evalúe y del medio de cultivo en el que crezca.

Por último, el consumo de sacarosa se da por un PTS (Sistema de fosfo transferasa) específico de sacarosa, después de lo cual el 6-fosfato de sacarosa resultante es hidrolizado por la sacarosa 6-fosfato hidrolasa y los productos de esta hidrólisis son glucosa 6-fosfato, que entra en la glucólisis, y fructosa (Wisselink, *et al.*, 2002). No obstante en las Figuras 15, 17 y 19, se observa algo curioso, en las tres figuras la fructosa se incrementa ligeramente a las 6 h, en el medio 15% MRSmc (Figura 17) la glucosa se incrementa desde las 0 h hasta las 6 h, luego disminuye y vuelve a incrementarse entre las 9 y 12 h, en el medio 20% MRSmc (Figura 19) la glucosa se incrementa desde las 0 h hasta las 24 h luego disminuye ligeramente a las 48 h. Por otra parte la sacarosa siempre disminuye en los tres medio con melaza de caña de azúcar a excepción del medio 20% MRSmc que se mantiene constante desde las 24h a 48 h mientras que la glucosa disminuye en ese intervalo de tiempo. Ahora bien, analizando estos resultados, se concluye que la sacarosa no se hidroliza como lo dice Wisselink, *et al.*, (2002) sino que en lugar de hidrolizarse intracelularmente, la bacteria 1TP10-BL03, *Lactobacillus curvatus* hidroliza la sacarosa extracelularmente y va consumiendo fructosa o glucosa. Afirmando lo anterior expuesto, Terán, *et al.* (2018), analizaron 13 genomas publicados de *L. curvatus* y según un análisis filogenético existen 2 linajes de *L. curvatus*, afirman que algunas cepas del linaje 2 son capaces de usar sacarosa a través de dos vías diferentes, una que involucra a la sacarosa *src* PTS y la sacarosa-6-fosfato hidrolasa, la que se menciona al comienzo del párrafo, y la otra involucra un sistema de transporte acoplado con el catabolismo de levan bacteriano por el *lev* PTS. La levansacarasa hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa extracelularmente al igual que en el presente estudio, alternativamente también tiene actividad transferasa que cataliza la transferencia de la fructosa a partir de la sacarosa a un acceptor de fructosilo produciendo FOS (fructooligosacáridos) o levana. Esta enzima se encuentra frecuentemente en lactobacilli, como *L. sanfranciscensis* y *L. reuteri* (Tieking, *et al.*, 2005; Van Huum, *et al.*, 2006).

## VI. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron 10 cepas BAL heterofermentativas (1TP05-BL03, 1TP05-BL11, 1TP07-BL07, 1TP07-BL11, 1TP09-BL01, 1TP09-BL02, 1TP09-BL04, 1TP10-BL03, 1TP11-BL09 y 1TP12-BL08) a partir de un total de 41 cepas BAL.
- Se seleccionó la cepa 1TP10-BL03 dado que se obtuvo los mayores resultados de Yp/s de 0.87 g/g y Qp de 0.56 g/L h en medio mMRS en comparación a las otras 9 cepas BAL en cultivo por lote.
- Se logró mayor producción de manitol con el medio 15% MRSmc alcanzándose un Yp/s de 1 g/g, Qp de 0.67 g/L h y  $\mu$  de 0.39 h<sup>-1</sup>, la fermentación se realizó mediante la cepa 1TP10-BL03 (*Lactobacillus curvatus*) en cultivo por lote.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Evaluar el incremento de productividad volumétrica en cultivo continuo para la producción de manitol.
- Diseñar un medio de cultivo simplificado, reemplazando los componentes del medio MRS por componentes más económicos. Además de realizar la búsqueda de un sustrato rico en fructosa y de bajo costo.
- Evaluar la producción de manitol a pH constante de 5.0 y 6.0 para cerciorarse si existiese una mayor producción de manitol.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y. & Sonomoto, K., 2013. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), pp. 877-902.
- Arana, I., Orruño, M. & Barcina, I., 2012. *Como abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Cálculo de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano*, Lejona: s.n.
- Årsköld, E. y otros, 2008. Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *Journal of Bacteriology*, 190(1), pp. 206-212.
- Azadnia, y otros, 2011. Isolation and Identification of Thermophilic *Lactobacilli* from Traditional Yoghurts of Tribes of Kazerum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(6), pp. 774 - 776.
- Bleckwedel, J., 2017. *Aspectos Moleculares de Producción de Manitol por Bacterias Lácticas Heterofermentativas.*, San Milguel de Tucumán: s.n.
- Brimacombe, J. & Webber, J., 1972. Alditols and derivatives. En: *The carbohydrates*. 2nd ed. London, England: Academic Press, p. 479–519.
- Cardenas, L., 2018. *Niveles de glicoalcaloides durante la elaboración del chuño negro a partir de la papa amarga Solanum juzepczukii y Solanum curtilobum.(Tesis para grado académico de maestra)*. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
- Carvalheiro, F. y otros, 2010. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *J Ind Microbiol Biotechnol*, p. 38:221–227.
- Castilho, N. y otros, 2019. *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiology*, 19(63), pp. 1-13.
- Castillo, F. y otros, 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 30(1), pp. 70-83.

Chalfan, Y., Levy, R. & Mateles, R. I., 1975. Detection of mannitol formation by bacteria. *Applied Microbiology*, 30(3), p. 476.

Chen, J., 1991. *Manual del azúcar de caña*. México D.F.: LIMUSA.

Chen, M. y otros, 2020. Mannitol: physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volumen 104, p. 6941–6951.

Chen, Y. y otros, 2020. *Latilactobacillus curvatus*: A Candidate Probiotic with Excellent Fermentation Properties and Health Benefits. Review. *Foods*, 9(10), pp. 1-20.

Condon, S., 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(3), pp. 269-280.

Cortés, R., Pérez, C., Cortéz, M. & Cruz, E., 2011. *Aprovechamiento de los residuos agroindustriales en la producción de Bio Oil*. Veracruz, Universidad Veracruzana.

Dai, Y., Meng, Q., Mu, W. & Zhang, T., 2017. Recent advances in the applications and biotechnological production of mannitol. *Journal of Functional Foods*, Volumen 36, pp. 404-409.

Dapo, R. & Stevens, 1999. *Use of hydroscopic agents in electrolytic capacitors*. s.l. Patente n° United States Patent 5997771.

Dumbrepatil, A. y otros, 2008. Utilización de azúcar de melaza para la producción de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 en fermentación por lotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), pp. 333-335.

Dumbrepatil, A. y otros, 2008. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), p. 333–335.

Fajardo, E. & Sarmiento, S., 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*., Bogotá: s.n.

FAO, s.f. *Guía de campo de los cultivos andinos*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s05.pdf> [Último acceso: 5 Mayo 2020].

Fonseca, C., Huarachi, E., Chura, W. & Cotrado, G., 2008. *Guía de las buenas prácticas de procesamiento para la producción artesanal de la tunta*. Cuenca del río Ilave Puno: Alianza institucional para el desarrollo competitivo de la tunta.

Fonseca, C., Huarachi, E. & Ordinola, M., 2011. Una experiencia de innovación tecnológica y difusión en la producción artesanal de la papa deshidratada. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 16(1), pp. 99-127.

Fonseca, C. & Ordinola, M., 2011. *Mejorando la competitividad de la agroindustria rural: El caso de la tunta en el altiplano peruano.*, Lima, Perú: s.n.

Fontes, y otros, 2013. Substitution of yeast extract by ammonium sulfate for mannitol production in cashew apple juice. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volumen 2, p. 69–75.

Fuquay, J., Fox, P. & McSweeney, P., 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Segunda ed. Mississippi State: Elsevier.

Gandevia, H., Rana, D. & B., D., 2017. Screening, Production and Antibacterial Activity of Bacteriocin from *Lactobacillus spp.* *BMR Microbiology*, 3(1).

Gänzle, M., 2015. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, Volumen 2, pp. 106-117.

García, L., 2008. *Uso de bacterias probióticas en el ensilado de residuos de pescado.*, Lima: s.n.

Gianella, T., 2004. Chuño blanco, ‘tunta’ o ‘moraya’: un proceso natural de conservación. *Revista de Agroecología: Manejando la poscosecha*, Diciembre, 20(3), pp. 29-31.

Gil, I., 2017. Chuño, el secreto milenario de los Andes para lograr que una papa dure 20 años. *BBC News Mundo*, 13 Junio.

González, C., 2018. Aplicación de *Lactobacillus spp.* como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas verdes, Jaén: s.n.

Grembecka, 2015. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, pp. 1-14.

Griffin, W. C. & Lynch, M. J., 1972. Polyhydric alcohols. En: *CRC Handbook of Food Additives*. Segunda edición ed. Cleveland: CRC-Press Inc, pp. 431-455.

Grobben, G. y otros, 2001. Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), pp. 2867-2870.

Guicherd, P. y otros, 1997. Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L.: malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions.. *Trees*, Volumen 11, p. 155–161.

Hammes, W. & Vogel, R., 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Boundary Row, London: Blackie Academic and Professional.

Hawashi, M., Widjaja, T. & Gunawan, S., 2019. Solid-State Fermentation of Cassava Products for Degradation of Anti-Nutritional Value and Enrichment of Nutritional Value. *New Advances on Fermentation Processes*. IntechOpen, 22(8).

Ibrahim, F. & Ouwehand, A., 2019. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Quinta ed. Boca Ratón: Taylor & Francis Group.

Janßen, D. y otros, 2020. Interspecies assertiveness of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei* in sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 331.

Kandler, O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), pp. 209-224.

Kitamoto, D., Isoda, H. & Nakahara, T., 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — From energy - saving materials to gene delivery carriers. *J Biosci Bioeng* , Volumen 94, p. 187 – 201.

Korakli & Vogel, 2003. Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Cartas de microbiología de FEMS*, 220(2), p. 281–286.

Kowalczyk, M. & Bardowski, J., 2007. Regulation of sugar catabolism in *Lactococcus lactis*. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(1), pp. 1-13.

Kulbe, Schwab & Gudernatsch, 1987. Enzyme-catalyzed production of mannitol and gluconic acid. Product recovery by various procedures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volumen 506, pp. 552-568.

Le & Mulderrig, 2001. Sorbitol and Mannitol. En: *Alternative Sweeteners*. Boca Raton: FL : CRC Press, p. 317 – 334.

Leroy, F. & De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), pp. 67-78.

Liu, S., Han, Y. & Zhou, Z., 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44(3), pp. 643-651.

Livesey, G., 2003. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties 16:163–191. *Nutrition Research*, Issue 16, p. 163–191.

Loesche, W. J. & Kornman, K. S., 1976. Production of mannitol by *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, Volumen 21, pp. 555-553.

Martău, G., Coman, V. & Vodnar, C., 2020. Recent advances in the biotechnological production of erythritol and mannitol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(5), pp. 608-622.

Martínez, G., Baker, H. & Horecker, B., 1963. A specific mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *J Biol Chem*, 238(5), p. 1598 – 1603.

Meng, y otros, 2017. Production of mannitol from a high concentration of glucose by *Candida parapsilosis* SK26. 001. *Applied iochemistry and Biotechnology*, 181(1), p. 391–406.

Meza, L., 2014. *Elaboración de abono líquido mediante fermentación homoláctica de papas de descarte utilizando el consorcio microbiano ácido láctico B-lac*, Lima: s.n.

MINAGRI, 2007. *Ministerio de Agricultura y Riego*. [En línea] Available at: <http://minagri.gob.pe/portal/datero/29-sector-agrario/azucar>

MINAGRI, 2019. *Observatorio de Commodities: Azúcar*, Lima: s.n.

- Monedero, V., Pérez, G. & Yebra, M., 2010. Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), pp. 1003-1015.
- Montano, A., Castro, A. & Rejano, L., 1992. Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas y Aceites*, 43(6), pp. 352-360.
- Moreno, F., 2007. *La caña panelera (Saccharum officinarum) en la alimentación del ganado*. s.l., s.n.
- Moro, J., 2012. *Diseño y construcción de un clarificador de melaza para mejorar los procesos de fermentación alcohólica*, Tingo María: s.n.
- Mozzi, F., Raya, R. & Vignolo, G., 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications*. Primera ed. Iowa - USA: Wiley-Blackwell.
- Neves, A. R. y otros, 2002. Catabolism of mannitol in *Lactococcus lactis* MG1363 and a mutant defective in lactate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, Issue 148, p. 3467–3476.
- Nidetzky, y otros, 1997. Simultaneous Enzymatic Synthesis of Gluconic Acid and Sorbitol - Production, Purification, and Application of Glucose-Fructose Oxidoreductase and Gluconolactonase. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Volumen 63, pp. 173-188.
- Ortiz, M., 2014. *Producción de manitol por bacterias ácido lácticas*, San Miguel de Tucumán: s.n.
- Ortiz, M., Fornaguera, M., Raya & Mozzi, 2012. *Lactobacillus reuteri*CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source. *Applied Microbiology and*, 95(4), p. 991–999.
- Osman, S., 1983. Glycoalkaloids in potatoes. *Food Chemistry*, 11(4), pp. 235-247.
- Ossa, Vanegas & Badillo, 2010. Evaluación de melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), pp. 97-104.

Parra, R., 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Ciencias Agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*, 8(1), pp. 93-105.

Patra, F., Kumar, S., Singh, Y. & Singh, R., 2011. Characterization of mannitol producing strains of *Leuconostoc* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volumen 27, pp. 933-939.

Patra, Tomar & Arora, 2009. Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 74(1), pp. 16-23.

Perez, R., s.f. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/AGAP/FRG/ECONF95/HTML/MOLASSES.HTM>

Prechtl, R. y otros, 2018. Sucrose-Induced Proteomic Response and Carbohydrate Utilization of *Lactobacillus sakei* TMW 1.411 During Dextran Formation. *Frontiers in Microbiology*, Volumen 9, p. 2796.

Qianqian, W., 2010. Research progress in preparation and application of mannitol. *Sci Technol Food Ind*, 31(12), p. 401–404.

Quain, D. & Boulton, C., 1987. Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, 133(7), p. 1675 – 1684.

Rabinstein, A., 2006. Treatment of cerebral edema. *Neurologist*, 12(2), p. 59–73.

Racine, M. & Saha, B., 2007. Production of mannitol by *Lactobacillus intermedius* NRRLB-3693 in fed-batch and continuous cell-recycle fermentations. *Process Biochemistry*, Volumen 42, p. 1609–1613.

Ramos, E. y otros, 2018. Genetic diversity and antimicrobial activity of lactic acid bacteria in the preparation of traditional fermented potato product ‘tunta’. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(144).

Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P., 2010. Lactic acid bacteria : their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 1(4), pp. 218-228.

Reyes García, M., Gómez Sánchez, P. & Espinoza Barrientos, C., 2017. *Tablas peruanas de composición de alimentos.* (10ma ed.), Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

Rice, T. y otros, 2020. Isolation, characterisation and exploitation of lactic acid bacteria capable of efficient conversion of sugars to mannitol. *International Journal of Food Microbiology*, Volumen 321, p. 108546.

Rockwell, K., 2015. Therapeutic review: Mannitol. *J Exo Pet Med*, 24(1), p. 120–122.

Rodríguez, C. y otros, 2011. Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*, p. 93:2519–2527.

Rodríguez, C. y otros, 2012. Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(6), p. 2519–2527.

Saha, B., 2006a. Effect of salt nutrients on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Issue 33, p. 887–890.

Saha, B., 2006b. A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(4), p. 676–680.

Saha, B. & Nakamura, L., 2003. Production of Mannitol and Lactic Acid by Fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnology and bioengineering*, 30 Junio, 82(7), pp. 864-871.

Saha, B. & Nakamura, L., 2003. Production of Mannitol and Lactic Acid by Fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnology and bioengineering*, 30 Junio, 82(7), pp. 864-871.

Saha & Racine, 2011. Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volumen 89, p. 879–891.

Sakai, S. & Yamanaka, K., 1968. Crystalline D - mannitol : NAD+ oxidoreductase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzimología*, 151(3), pp. 684-686.

- Santos, E., González-Fernández, C., Jaime, I. & Rovira, J., 1997. Identificación y caracterización de bacterias acidolácticas aisladas de chorizos tradicionales elaborados en Castilla y León. *Food Science and Technology International*, Issue 3, pp. 21-29.
- Sauer, M. y otros, 2017. The efficient clade: Lactic acid bacteria for industrial chemical production. *Trends in Biotechnology* , 35(8), pp. 756-769.
- Schneider, K. & Giffhorn, 1994. Overproduction of mannitol dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41(5), pp. 578-583.
- Schwarz, E., 1994. *Sugar alcohols: Mannitol* . In *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th ed. Weinheim: Wiley - VCH.
- Sepúlveda, S. & S., C., 1998. *Gestión sostenible de espacios rurales: sistema de información: sistema de información*. s.l.:IICA.
- Sirpa, A. & Mejía, L., 2004. *Enriquecimiento de calcio en el proceso de elaboración de tunta o chuño blanco*. Cochabamba: XI Congreso Internacional de cultivos andinos.
- Soetaert, Vanhooren & Vandamme, 1999. The Production of Mannitol by Fermentation. *Carbohydrate Biotechnology Protocols*, Volumen 10, p. 261–275.
- Terán, L. y otros, 2018. Phylogenomic Analysis of *Lactobacillus curvatus* Reveals Two Lineages Distinguished by Genes for Fermenting Plant-Derived Carbohydrates. *Genome Biology and Evolution*, 10(6), p. 1516–1525.
- Thokchom, S. & Joshi, S., 2012. Antibiotic Resistance and Probiotic Properties of Dominant Lactic Microflora from Tungrymbai , an Ethnic Fermented Soybean Food of India. *The Journal of Microbiology*, 50(3), pp. 535-539.
- Tieking, M., Ehrmann, M., Vogel, R. & Gänzle, M., 2005. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), pp. 655-63.
- Tomás, M., Ocaña, V., Wiese, B. & Nader-Macías, M., 2003. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 52(12), pp. 1117-1124.

Van Huijum, S. y otros, 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), pp. 157-76.

Veana, Martinez, Aguilar & Rpdriguez, M., 2014. Utilización de melaza y bagazo de caña de azúcar para la producción de invertasa fúngica en fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger* GH1. *Revista Brasileña de Microbiología*, 45(2).

Vodnar, D., Paucean, A., Dulf, F. & Socaciu, C., 2010. HPLC Characterization of Lactic Acid Formation and FTIR Fingerprint of Probiotic Bacteria during Fermentation Processes.. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), pp. 109-113.

Vrancken, R. D. V. M., 2010. Low-calorie sugars produced by lactic acid bacteria.. En: R. V. Mozzi, ed. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Ames: Wiley-Blackwell, p. 193–209.

Wang, G., Zhao, G., He, D. & Li, J., 2005. Preparation of crystalline mannitol by double isomerization.. *Food Res Develop*, 26(4), pp. 82-84.

Wang, S., Chen, P. & Hui, D., 2019. *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications*. Primera ed. Singapore: Springer. Science Press Beijin.

Weymarn, N. v., Hujanen, M. & Leisola, M., 2002. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, Volumen 37, p. 1207 – 1213.

Wichmann, Wandrey, Bückmann & Kula, 1981. Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIII(12), pp. 2789-2802.

Wisselink, Eggink, W., Hugenholtz & Grobben, 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12(2-3), pp. 151-161.

Yue, M. y otros, 2013. Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Octubre, 29(10), pp. 1923-1930.

Zakaria, E. & Ahmed, A., 2014. Improvement of *Lactobacillus brevis* NM101-1 grown on sugarcane molasses for mannitol, lactic and acetic acid production. *Annals of Microbiology*, Setiembre, 64(3), pp. 983-990.

## **IX. ANEXOS**

### **Anexo 1. Composición de medio de cultivo y reactivos usados**

#### **1.1 Medio Man Rogosa Sharpe (MRS)**

Componente	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	4
D-Glucosa	20
K2HPO4	2
Tween 80	1
Di amonio citrato	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.04

Los reactivos fueron disueltos en el volumen apropiado de agua estilada y llevados a pH  $5.7 \pm 0.2$ , luego fueron autoclavados a 121 °C durante 15 min. Para la preparación de agar MRS se agrega 14 g/L de agar agar.

#### **1.2 Carrez A**

Ferrocianuro de potasio:  $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$

Se pesa 3.6 g del compuesto luego se adiciona 100 mL de agua ultrapura, se homogeniza utilizando un agitador magnético y se preserva a 4 °C hasta su uso.

#### **1.3 Carrez B**

Sulfato de Zinc:  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Se pesa 7.2 g luego se adiciona 100 mL de agua ultrapura, se homogeniza utilizando un agitador magnético y se preserva a 4 °C hasta su uso.

#### **1.4 Solución Salina**

Se pesa 8.5 g de cloruro de sodio, se disuelve en 1000 mL de agua destilada, luego se dispensa 10 mL de solución en tubos y finalmente son autoclavados a 121 °C durante 15 min.

#### **Anexo 2. Metodología de actividades realizadas**

##### **Protocolo 1: Reactivación de cepa en placa**

- Se retiró el grupo de microtubos del banco de cepas aisladas de tunta del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología preservado a -80 °C.
- Se flameó el asa bacteriológica, luego se procedió a tomar una asada del microtubo para ser descargada sobre la parte superior de la placa con agar MRS (Rogosa, *et al.*, 1951), se flameó el asa bacteriológica y se procedió a estriar perpendicularmente a la estriada anterior, luego se repitió el mismo procedimiento.
- Finalmente, las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h.

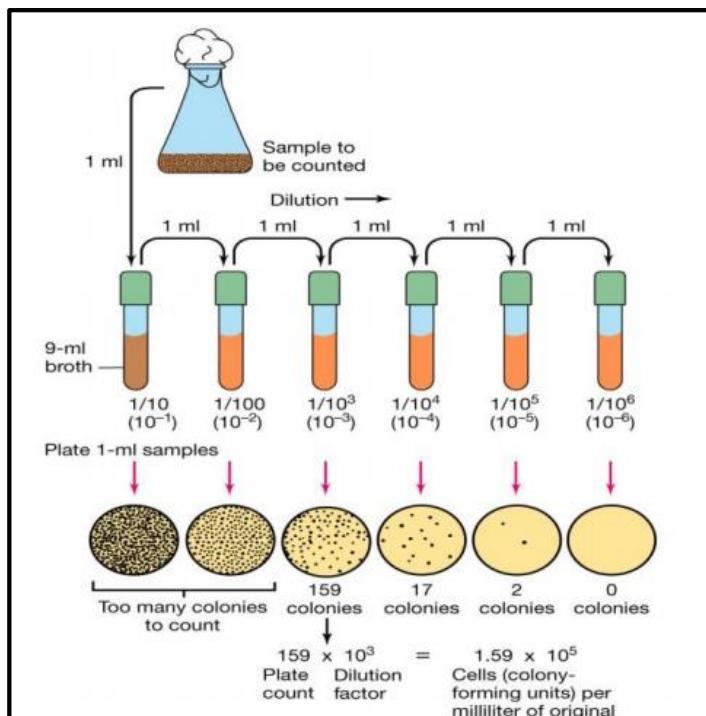
##### **Protocolo 2: Tinción simple**

- Se dividió el portaobjeto para 12 muestras, luego se colocó una gota de agua destilada y se tomó una asada de la cepa cerca del mechero para luego resuspenderla en la gota de agua.
- Se fijó la muestra, flameando el portaobjeto.
- Se agregó cristal violeta a la muestra fijada, dejando reposar durante 1 min, luego se lavó el portaobjeto y se secó.
- Se agregó aceite de inmersión a la muestra y se observó al microscopio a 100X.

##### **Protocolo 3: Recuento en placa (UFC/mL)**

- Se extrajo 1 mL de muestra de manera aséptica mediante una micropipeta y se transfirió a un tubo que contenía 9 mL de solución salina previamente autoclavada. El tubo se homogeneizó utilizando un vórtex, representando así la dilución  $10^{-1}$ . Posteriormente, se llevó a cabo el mismo procedimiento para realizar diluciones seriadas. En el momento inicial del muestreo, se realizaron diluciones hasta  $10^{-6}$ , mientras que, para los puntos de muestreo subsiguientes, las diluciones se extendieron hasta  $10^{-8}$ .

- Finalmente, se seleccionaron las tres últimas diluciones efectuadas y se añadió 1 mL de cada dilución a placas de Petri. Posteriormente, se agregaron aproximadamente 15 mL de agar MRS a 45 °C, seguido de un periodo de incubación a 28 °C durante 48 horas. Se procedió a contar el número de colonias, el cual fue multiplicado por el factor de dilución correspondiente.



**Figura 21.** Recuento en placa por diluciones seriadas

#### Protocolo 4: Hallar velocidad específica de crecimiento

Partiendo de la siguiente ecuación diferencial

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

$$\frac{dX}{X} = \mu dt$$

Se integra la ecuación y resulta:

$$\ln X - \ln X_0 = \mu t$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0$$

Dónde:

X: concentración de biomasa

$X_0$ : concentración de biomasa inicial

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento

t: tiempo

La ecuación final se iguala a la ecuación de la recta.

Ecuación de la recta:  $y = mx + b$ , donde m es la pendiente de la recta

Siendo:  $y = \ln X$

$$mx = \mu t$$

$$b = \ln X_0$$

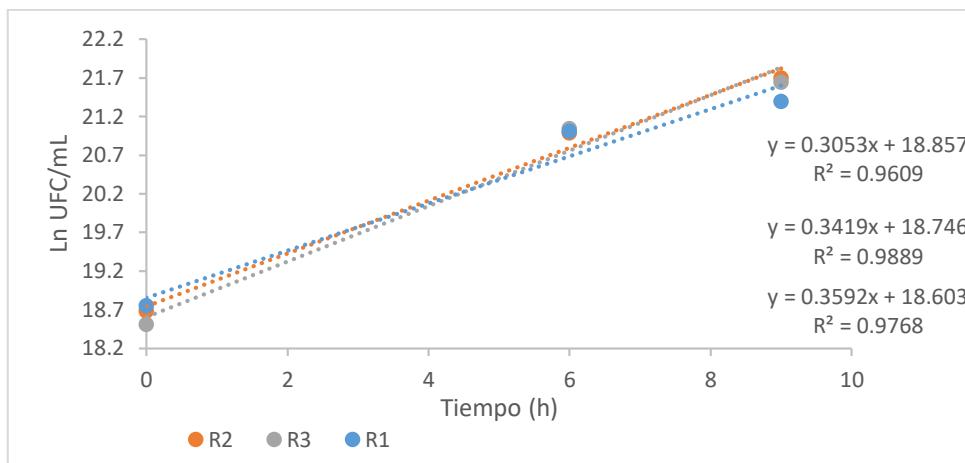
Por lo tanto, igualamos:  $m = \mu$

Es por ello que se realiza una regresión lineal, solo de la fase exponencial de crecimiento, la biomasa es expresada en  $\ln$ , siendo esta graficada en el eje y, tiempo en el eje x y por último igualamos la pendiente de la recta a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

En la siguiente metodología, se usó  $\ln$  de UFC/mL y no  $\ln$  de peso seco microbiano, porque la melaza de caña de azúcar oscurece el medio MRSmc y por consecuente la lectura de absorbancia no sería la mejor debido al grado de oscurecimiento del medio. Además se encontró bibliografía donde se realiza el cálculo de  $\mu$  usando  $\ln$  UFC/mL (Arana, *et al.*, 2012).

**Tabla 11.**  $\ln$  UFC/mL desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el control (medio MRS)

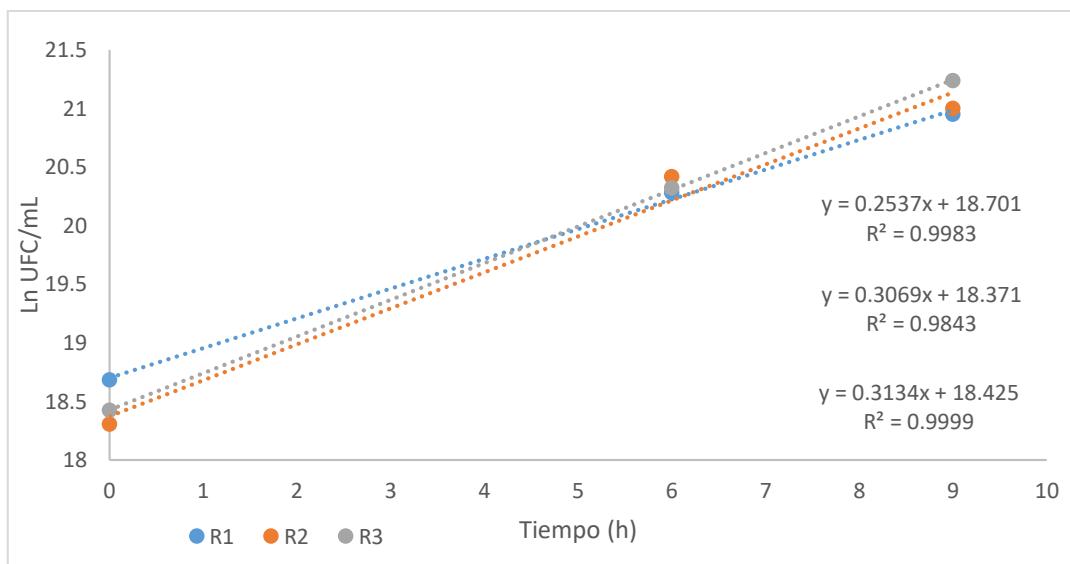
Tiempo (h)	CONTROL			$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\mu$ media	DS
	R1	R2	R3			
0	18.7499845	18.68304501	18.5068584	0.305	0.335	0.02751987
6	21.0084448	20.9856301	21.0453493	0.3419		
9	21.3910952	21.69782548	21.6435486	0.3592		



**Figura 22.** Regresión lineal de las 3 réplicas de tiempo vs  $\ln \text{UFC/mL}$ , desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar  $\mu$  de la cepa 1TP10-BL03 en el control (medio MRS)

**Tabla 12.**  $\ln \text{UFC/mL}$  desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 10% MRSmc

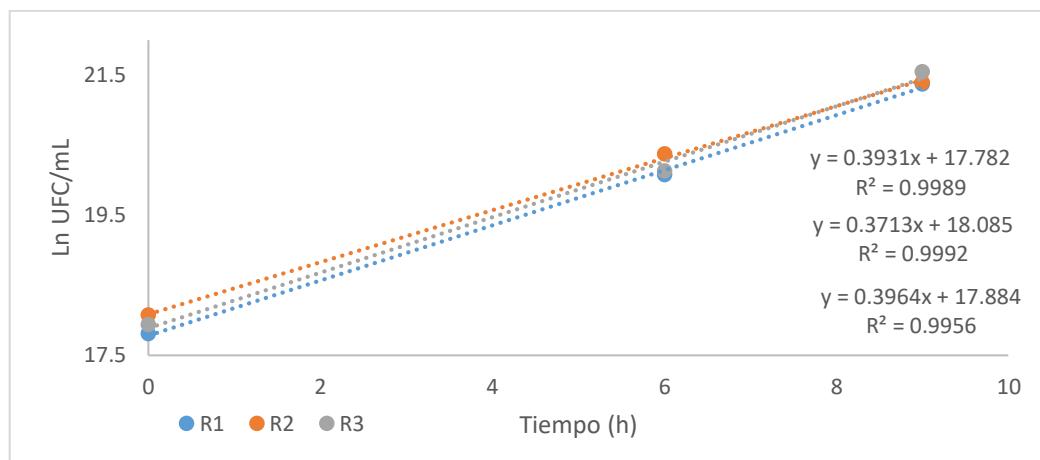
Tiempo (h)	10%			$\mu$	$\mu$ media	DS
	R1	R2	R3			
0	18.683045	18.30414693	18.4206807	0.2537	0.291	0.03275307
6	20.2769787	20.41401959	20.3197987	0.3069		
9	20.9480081	20.99938127	21.2360895	0.3134		



**Figura 23.** Regresión lineal de las 3 réplicas tiempo vs  $\ln \text{UFC/mL}$ , desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar  $\mu$  de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 10% MRSmc

**Tabla 13.** Ln UFC/mL desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 15% MRSmc

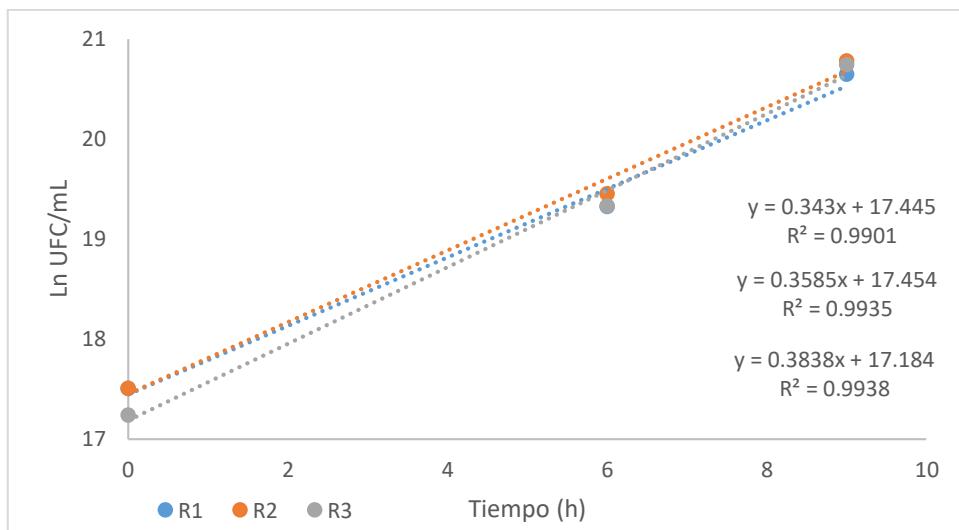
Tiempo (h)	15%			$\mu$	$\mu$ media	DS
	R1	R2	R3			
0	17.8044946	18.06685887	17.9296577	0.3931	0.387	0.014
6	20.0731781	20.36659089	20.1254288	0.3713		
9	21.3651197	21.39109521	21.5430457	0.3964		



**Figura 24.** Regresión lineal de las 3 réplicas de tiempo vs Ln UFC/mL, desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar  $\mu$  de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 15% MRSmc

**Tabla 14.** Ln UFC/mL desde las 0 h hasta las 9 h de fermentación para hallar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 20% MRSmc

Tiempo (h)	20%			$\mu$	$\mu$ media	DS
	R1	R2	R3			
0	17.50439	17.50439001	17.2365106	0.343	0.362	0.02059523
6	19.3248989	19.45386523	19.3289393	0.3585		
9	20.6506951	20.78153475	20.7430685	0.3838		



**Figura 25.** Regresión lineal de las 3 réplicas de tiempo vs Ln UFC/mL, desde 0 h hasta 9 h de fermentación, para hallar  $\mu$  de la cepa 1TP10-BL03 en el medio 20% MRSmc

### Anexo 3. Datos los resultados obtenidos

#### 3.1 Datos obtenidos durante la comparación de las 10 cepas BAL en medio mMRS para la producción de manitol a nivel de matraz

**Tabla 15.** Resultados de consumo de glucosa y fructosa de las 10 BAL evaluadas en caldo mMRS

CEPA	TIEMPO																			
	T0a		T0b		T6a		T6b		T12a		T12b		T24a		T24b		T48a		T48b	
	G (g/L)	F (g/L)																		
<b>1TP05-BL03</b>	4.11	3.91	4.49	3.67	0.00	1.02	0.00	1.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP05-BL11</b>	4.69	3.99	4.83	4.10	2.61	4.31	2.74	4.06	1.73	2.16	2.14	2.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP07-BL07</b>	4.38	3.68	4.93	3.91	0.95	2.37	1.28	2.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP07-BL11</b>	4.92	4.22	4.88	4.45	2.50	1.70	2.94	1.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP09-BL01</b>	5.39	4.31	5.08	4.37	1.42	1.59	2.11	1.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP09-BL02</b>	4.58	3.91	4.73	4.02	3.24	1.99	3.04	1.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP09-BL04</b>	4.88	3.94	4.89	4.18	0.00	1.51	0.00	1.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP10-BL03</b>	5.04	3.99	5.43	3.80	0.49	0.64	0.46	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP11-BL09</b>	4.41	4.14	5.49	3.99	0.00	0.57	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>1TP12-BL08</b>	3.81	3.28	3.99	3.78	2.00	1.62	1.56	0.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

G: glucosa, F: fructosa. Como se muestreó por duplicado para el análisis en HPLC se tiene dos muestras para hora de muestreo, como para el T0 (0 h) tenemos la muestra a y b (T0a y T0b).

**Tabla 16.** Producción de manitol de las 10 cepas BAL evaluadas desde las 0 h hasta las 24 h en medio mMRS

Cepa	TIEMPO (h)									
	T0a	T0b	T6a	T6b	T12a	T12b	T24a	T24b	T48a	T48b
	Manitol (g/L)									
1TP05-BL03	0.00	0.00	2.82	3.17	3.01	3.12	1.61	1.69	0.73	0.64
1TP05-BL11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52	0.43	1.12	1.07	1.02	1.01
1TP07-BL07	0.00	0.00	2.04	2.05	3.02	3.02	2.03	1.93	0.79	0.82
1TP07-BL11	0.00	0.00	1.83	2.00	3.03	3.04	2.15	2.16	0.53	0.56
1TP09-BL01	0.00	0.00	2.48	2.45	3.00	3.00	1.33	1.31	0.69	0.60
1TP09-BL02	0.00	0.00	2.51	2.41	2.70	2.74	1.43	1.35	0.68	0.74
1TP09-BL04	0.00	0.00	2.99	3.08	3.09	3.06	1.38	1.36	0.58	0.56
1TP10-BL03	0.00	0.00	3.33	3.43	3.15	3.25	2.25	2.43	0.76	0.55
1TP11-BL09	0.53	0.61	3.18	3.26	3.08	3.23	1.37	1.37	0.70	0.72
1TP12-BL08	0.00	0.00	1.40	1.39	2.32	2.29	1.54	1.50	1.06	1.24

**Tabla 17.** pH de las 10 cepas BAL evaluadas en caldo mMRS

Cepa	Tiempo (h)				
	0	6	12	24	48
1TP05-BL03	5.6	4.7	4.6	4.4	4.3
1TP05-BL11	5.7	5.4	4.8	4.4	4.4
1TP07-BL07	5.5	4.7	4.5	4.4	4.5
1TP07-BL11	5.7	5.1	4.7	4.5	4.4
1TP09-BL01	5.5	4.7	4.5	4.4	4.5
1TP09-BL02	5.6	4.8	4.6	4.4	4.4
1TP09-BL04	5.6	4.7	4.5	4.4	4.4
1TP10-BL03	5.5	4.7	4.5	4.4	4.5
1TP11-BL09	5.6	4.7	4.5	4.3	4.4
1TP12-BL08	5.6	4.8	4.6	4.4	4.4

**Tabla 18.** UFC de las 10 cepas BAL evaluadas en medio mMRS

Cepa	Tiempo (h)				
	0	6	12	24	48
1TP05-BL03	5.00E+07	9.00E+08	1.00E+09	1.00E+09	1.00E+09
1TP05-BL11	6.00E+07	1.00E+08	4.00E+08	1.00E+09	4.00E+08
1TP07-BL07	6.00E+07	1.00E+08	1.00E+08	3.00E+08	6.00E+07
1TP07-BL11	6.00E+07	3.00E+09	4.00E+08	2.00E+09	2.00E+09
1TP09-BL01	1.00E+08	2.00E+08	2.00E+09	2.00E+09	6.00E+07
1TP09-BL02	5.00E+07	2.00E+09	2.00E+09	1.00E+09	1.00E+09
1TP09-BL04	7.00E+07	3.00E+09	1.00E+09	2.00E+09	6.00E+07
1TP10-BL03	7.00E+07	2.00E+09	2.00E+09	5.00E+08	5.00E+08
1TP11-BL09	6.00E+07	2.00E+09	2.00E+09	3.00E+08	6.00E+07
1TP12-BL08	6.00E+07	2.00E+09	2.00E+09	2.00E+09	9.00E+08

**3.2 Datos obtenidos durante el ensayo de producción de manitol con la cepa 1TP10-BL03 a diferentes concentraciones de MRSmc (10%, 15% y 20%) y como control en medio MRS**

**Tabla 19.** Consumo de glucosa libre (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS)

Tiempo (h)	Réplicas	Control	10% MRSmc	15% MRSmc	20% MRSmc
0	R1	18.562	6.387	8.956	12.054
	R2	18.313	5.801	9.750	10.965
	R3	17.978	6.531	11.126	11.049
6	R1	10.630	6.118	11.534	12.009
	R2	10.648	5.744	13.113	11.680
	R3	10.902	6.750	13.283	11.379
9	R1	8.924	7.744	11.963	15.346
	R2	8.618	5.429	11.553	14.978
	R3	8.917	4.993	12.293	11.917
12	R1	8.453	4.767	11.970	16.666
	R2	8.083	4.992	11.797	16.245
	R3	7.563	7.082	12.578	15.140
24	R1	2.460	3.526	10.464	17.399
	R2	2.380	3.685	9.600	19.473
	R3	2.365	5.249	10.836	18.937
48	R1	0.845	3.259	8.706	16.458

	R2	0.827	3.262	8.668	16.299
	R3	0.977	4.959	9.339	19.490

**Tabla 20.** Consumo de sacarosa (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS)

Tiempo (h)	Réplicas	Control	10% MRSmc	15% MRSmc	20% MRSmc
0	R1	0	18.580	27.354	36.506
	R2	0	18.829	27.324	35.353
	R3	0	18.485	27.139	34.637
6	R1	0	9.323	17.251	34.390
	R2	0	9.350	17.934	34.154
	R3	0	9.895	18.457	33.067
9	R1	0	3.115	12.031	29.475
	R2	0	3.344	11.490	30.307
	R3	0	3.405	11.526	29.393
12	R1	0	1.908	8.867	24.964
	R2	0	2.188	6.577	24.636
	R3	0	2.221	7.442	24.226
24	R1	0	1.768	6.895	15.948
	R2	0	1.862	6.112	15.547
	R3	0	1.882	6.114	15.523
48	R1	0	1.559	6.489	15.753
	R2	0	1.509	6.093	15.682
	R3	0	1.557	5.821	15.581

**Tabla 21.** Consumo de fructosa libre (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS)

Tiempo (h)	Réplicas	Control	10% MRSmc	15% MRSmc	20% MRSmc
0	R1	0.643	6.448	9.033	13.899
	R2	0.616	6.260	9.611	13.899
	R3	0.583	6.432	9.291	14.151
6	R1	0.000	7.323	8.937	14.392
	R2	0.000	6.124	10.346	14.863
	R3	0.000	6.985	9.680	14.037
9	R1	0.000	5.250	7.956	14.274
	R2	0.000	6.564	8.559	13.517
	R3	0.000	5.937	8.690	12.735
12	R1	0.000	6.308	7.677	12.673
	R2	0.000	3.023	7.345	12.877

	R3	0.000	3.528	7.420	12.334
24	R1	0.000	4.148	4.599	7.294
	R2	0.000	4.254	4.840	7.905
	R3	0.000	2.315	3.345	7.438
48	R1	0.000	0.815	2.332	5.999
	R2	0.000	0.698	1.262	5.284
	R3	0.000	1.348	3.339	6.587

**Tabla 22.** Producción de manitol (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS)

Tiempo (h)	Réplicas	Control	10% MRSmc	15% MRSmc	20% MRSmc
0	R1	0.000	0.944	1.054	1.598
	R2	0.000	0.947	1.229	1.491
	R3	0.000	0.969	1.010	1.438
6	R1	0.891	3.487	3.135	2.726
	R2	0.847	3.595	3.525	2.667
	R3	0.884	3.526	3.047	2.661
9	R1	1.490	8.187	7.381	5.575
	R2	1.454	8.483	7.796	5.574
	R3	1.460	7.763	7.534	5.373
12	R1	1.624	13.323	13.193	8.604
	R2	1.627	13.357	13.522	8.389
	R3	1.619	12.982	13.448	7.888
24	R1	1.889	15.035	16.835	17.445
	R2	2.039	15.105	16.831	17.178
	R3	1.955	15.034	17.719	16.570
48	R1	1.772	15.934	16.649	19.061
	R2	1.760	15.695	17.541	18.345
	R3	1.705	15.300	17.730	18.155

**Tabla 23.** Producción de ácido láctico (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS)

Tiempo (h)	Control			10% MRSmc			15% MRSmc			20% MRSmc		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	2.411	2.815	2.656	1.598	1.377	1.507	1.643	1.757	1.708	1.598	1.840	2.061
6	16.451	16.882	15.768	13.557	11.331	14.698	12.864	11.031	12.720	6.632	6.541	6.430
9	27.084	26.509	26.939	23.619	24.591	25.638	21.004	23.360	22.902	7.288	7.145	7.119
12	29.301	31.143	30.969	32.570	32.272	32.123	33.046	32.739	33.009	10.989	10.909	11.039
24	42.076	41.851	43.901	37.314	37.286	37.365	41.554	40.913	41.164	14.875	14.938	15.017
48	45.928	45.778	47.494	36.819	36.811	37.057	40.347	39.859	40.069	14.742	14.665	14.753

**Tabla 24.** Producción de ácido acético (g/L) mediante la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS)

Tiempo (h)	Control			10% MRSmc			15% MRSmc			20% MRSmc		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	4.818	4.758	4.668	6.480	6.353	6.409	6.269	6.349	6.182	6.094	6.260	6.349
6	6.946	6.666	6.951	8.012	8.407	8.241	6.951	7.596	7.789	9.393	9.416	9.268
9	8.341	8.361	8.415	11.148	11.367	11.957	8.991	9.792	9.819	9.402	9.424	9.384
12	8.383	8.796	9.241	13.482	13.491	13.813	13.506	13.195	13.250	9.587	9.533	9.584
24	10.778	10.790	11.417	15.386	15.715	15.724	15.659	15.610	15.651	9.653	9.685	9.631
48	11.484	11.480	12.438	15.564	15.759	15.757	14.122	13.996	14.165	9.668	9.881	9.818

**Tabla 25.** UFC/mL de la cepa 1TP10-BL03 en diferentes medios MRSmc y en control (MRS)

Tiempo (h)	Control			10% MRSmc			15% MRSmc			20% MRSmc		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	1.39E+08	1.30E+08	1.09E+08	1.30E+08	8.90E+07	1.00E+08	5.40E+07	7.02E+07	6.12E+07	4.00E+07	4.00E+07	3.06E+07
6	1.33E+09	1.30E+09	1.38E+09	6.40E+08	7.34E+08	6.68E+08	5.22E+08	7.00E+08	5.50E+08	2.47E+08	2.81E+08	2.48E+08
9	1.95E+09	2.65E+09	2.51E+09	1.25E+09	1.32E+09	1.67E+09	1.90E+09	1.95E+09	2.27E+09	9.30E+08	1.06E+09	1.02E+09
12	2.99E+09	2.03E+09	2.10E+09	1.57E+09	1.58E+09	1.70E+09	1.83E+09	1.86E+09	2.17E+09	1.16E+09	1.29E+09	1.44E+09
24	2.16E+09	2.00E+09	2.13E+09	1.40E+09	1.70E+09	1.12E+09	1.20E+09	1.40E+09	1.52E+09	1.78E+09	2.01E+09	1.86E+09
48	3.70E+08	2.94E+08	2.90E+08	1.36E+08	1.10E+08	1.60E+08	1.18E+08	9.00E+07	1.34E+08	2.15E+08	2.19E+08	2.24E+08

**Tabla 26.** pH de las fermentaciones con diferentes medios MRSmc y en control (MRS) mediante la cepa 1TP10-BL03

Tratamiento	Réplicas	Tiempo (h)									
		0	0	6	6	9	9	12	12	24	24
Control	R1	5.68	5.68	4.8	4.8	4.4	4.4	4.22	4.23	3.98	3.97
	R2	5.69	5.69	4.76	4.77	4.39	4.39	4.23	4.22	3.95	3.95
	R3	5.68	5.7	4.76	4.77	4.4	4.41	4.23	4.23	3.95	3.96
10%	R1	5.24	5.25	4.82	4.82	4.43	4.44	4.24	4.24	4.13	4.14
	R2	5.24	5.24	4.8	4.8	4.43	4.43	4.24	4.25	4.14	4.14
	R3	5.24	5.28	4.82	4.83	4.45	4.45	4.25	4.26	4.14	4.14
15%	R1	5.22	5.23	4.9	4.89	4.57	4.57	4.34	4.34	4.17	4.17
	R2	5.22	5.25	4.84	4.84	4.5	4.49	4.29	4.29	4.17	4.17
	R3	5.23	5.26	4.9	4.91	4.57	4.57	4.33	4.33	4.16	4.15
20%	R1	5.03	5.1	4.85	4.86	4.65	4.65	4.47	4.47	4.17	4.18
	R2	5.1	5.13	4.86	4.87	4.65	4.65	4.48	4.48	4.17	4.17
	R3	5.1	5.1	4.86	4.87	4.66	4.66	4.49	4.48	4.18	4.17

#### Anexo 4. Análisis estadístico

##### 4.1 Evaluando si existe diferencia significativa entre Yp/s de 24 y 48 h

**Tabla ANOVA para Yp/s 10% por Tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0018375	1	0.0018375	0.13	0.7377
Intra grupos	0.05699	4	0.0142475		
Total (Corr.)	0.0588275	5			

La tabla ANOVA divide la variabilidad de Yp/s 10% en dos componentes: uno correspondiente a las diferencias entre los grupos y otro asociado a las diferencias dentro de los grupos. La razón-F, que en este caso es de 0.13, se obtiene dividiendo la estimación entre grupos por la estimación dentro de grupos. Debido a que el *valor-P* asociado a la razón-F es 0.7377 siendo un valor mayor a 0.05, por lo que no se observa diferencia estadísticamente significativa entre las medias de Yp/s 10% entre las 24h y 48 h de fermentación. Esto realizándose con un nivel de confianza del 95.0%.

**Tabla ANOVA para Yp/s 15% MRSmc por Tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0155042	1	0.0155042	5.20	0.0848
Intra grupos	0.0119307	4	0.00298267		
Total (Corr.)	0.0274348	5			

La tabla ANOVA desglosa la variabilidad de Yp/s 15% en dos componentes: uno relacionado con las diferencias entre los grupos y otro vinculado a las diferencias dentro de los grupos. La razón-F, que en este caso es de 5.20, se calcula dividiendo la estimación entre grupos por la estimación dentro de grupos. Debido a que el *valor-P* asociado a la razón-F es 0.0848 siendo un valor mayor a 0.05, por lo que no se observa diferencia estadísticamente significativa entre las medias de Yp/s 15% entre las 24h y 48 h de fermentación. Esto realizándose con un nivel de confianza del 95.0%.

**Tabla ANOVA para Yp/s 20% MRSmc por Tiempo**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.66667E-7	1	1.66667E-7	0.000187	0.9897
Intra grupos	0.00356667	4	0.000891667		
Total (Corr.)	0.00356683	5			

La tabla ANOVA divide la variabilidad de Yp/s 20% en dos componentes: uno correspondiente a las diferencias entre los grupos y otro asociado a las diferencias dentro de los grupos. La razón-F, que en este caso es de 0.000187, se obtiene dividiendo la estimación entre grupos por la estimación dentro de grupos. Debido a que el *valor-P* asociado a la razón-F es 0.9897 siendo un valor mayor a 0.05, por lo que no se observa diferencia estadísticamente significativa entre las medias de Yp/s 15% entre las 24h y 48 h de fermentación. Esto realizándose con un nivel de confianza del 95.0%.

**CONCLUSIÓN:** como todos los *valor-P* son mayores a 0.05, entonces no existe diferencia estadísticamente significativa entre el rendimiento hallado a las 24 h y el de 48 h para los tratamientos del 10%, 15% y 20%.

#### 4.2 ANOVA de una vía para producción de manitol en g/L

**Tabla ANOVA para Manitol por Melaza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	402.207	3	134.069	1068.10	0.0000
Intra grupos	1.00417	8	0.125521		
Total (Corr.)	403.211	11			

La tabla ANOVA desglosa la variabilidad de Manitol en dos componentes: uno asociado a las diferencias entre los grupos y otro vinculado a las diferencias dentro de los grupos. La razón-F, que en este caso es de 1068.10. Dado que el *valor-P* de la prueba-F es menor que 0.05, se concluye que hay una diferencia estadísticamente significativa entre la producción de manitol a distintos niveles de Melaza (10%, 15% y 20%), con un nivel de confianza del 95.0%.

#### 4.3 Prueba de Tukey

##### Pruebas de Múltiple Rangos para Manitol por Melaza

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Melaza</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Control	3	1.96079	X
10%	3	14.1048	X
20%	3	15.5552	X
15%	3	16.0304	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Control – 10%	*	-12.144	0.926034
Control – 15%	*	-14.0696	0.926034
Control - 20%	*	-13.5944	0.926034
10% - 15%	*	-1.92565	0.926034
10% – 20%	*	-1.45047	0.926034
15% - 20%		0.475174	0.926034

Esta tabla realiza un análisis de comparación múltiple para determinar las medias que presentan diferencias significativas entre sí. El cuadro inferior proporciona las estimaciones de las diferencias entre cada par de medias, y los asteriscos indican si existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95.0%. En la tabla superior, se han hallado tres grupos homogéneos estos mediante su marcado con una X en cada columna. No se evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de melaza al 15% y 20%. El método utilizado para discriminar entre las medias es el procedimiento de Diferencia Honestamente Significativa (HSD) de Tukey, con un riesgo del 5.0%.

**CONCLUSIÓN:** Por lo tanto, existe diferencia estadísticamente significativa entre el Control, 10% y el grupo homogéneo de 15% y 20%. Puesto que, en los tratamientos con melaza de caña de azúcar al 15% y 20% no existe diferencia estadísticamente significativa.