



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

CARACTERIZACIÓN DE DESPERDICIOS DE ALIMENTOS Y SU REÚSO EN LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

TESIS presentada por:

ANAID MAIRA SANTOS CORONA

**A la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ingeniería Química como
requisito parcial para obtener el
grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN
INGENIERÍA QUÍMICA**

**Asesores: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya
Dra. Ana Alejandra Vargas Tah**

MORELIA, MICHUACÁN.

DICIEMBRE 2020

RESUMEN**CARACTERIZACIÓN DE DESPERDICIOS DE ALIMENTOS Y SU REUSO EN LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**

Por: Anaid Maira Santos Corona

Diciembre de 2020

Maestra en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Dra. Ana Alejandra Vargas Tah

La pérdida de alimentos a través de la cadena de suministro de alimentos representa un tercio de la producción total a nivel mundial. En México los desperdicios de alimentos representan más del 50% de los residuos sólidos urbanos y que son confinados a rellenos sanitarios lo que provoca problemas ambientales, sociales y económicos. La abundancia de estos residuos están disponibles para la obtención de diversos productos de valor agregado a través de un proceso biotecnológico como lo es la fermentación, ya que contienen carbohidratos, proteínas y lípidos, principalmente, lo que hace posible su transformación.

En este trabajo experimental se encontraron las condiciones óptimas de tiempo y concentración de H_2SO_4 como pretratamiento termoquímico aplicado a desperdicios de alimentos para la obtención de azúcares reductores que fueron utilizados como fuente de carbono para producir ácido láctico con *E. coli* JU15.

Los desperdicios de alimentos se caracterizaron a través de un análisis proximal (humedad, proteína, carbohidratos totales, grasas totales, cenizas y fibra cruda) y posteriormente fueron sometidos a pretratamientos termoquímicos con NaOH 0.5 % y H_2SO_4 2%. Utilizando un diseño central compuesto (DCC) fue posible identificar las condiciones óptimas de tiempo y concentración de ácido (H_2SO_4) para lograr tener una cantidad cercana a la teórica de azúcares reductores que fueron cuantificados por el método 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) y por HPLC. Se probó la cepa *E. coli* JU15 en el hidrolizado de desperdicios de alimentos enriquecido con medio mineral AM1 y se obtuvo ácido láctico que fue cuantificado por HPLC.

Los resultados mostraron que un pretratamiento con NaOH 0.5% p/p a 121 °C por 30 minutos en autoclave no son las condiciones ideales para los desperdicios de alimentos ya que se identificó una pérdida casi total de los azúcares reductores. El diseño de experimento aplicado al pretratamiento ácido con H₂SO₄ señaló las condiciones óptimas de concentración de ácido y tiempo, 1.6% y 31 minutos, respectivamente, alcanzando una concentración de azúcares reductores de 31.5 g/L (DNS). Glucosa, fructosa y arabinosa fueron los 3 principales azúcares reductores identificados por HPLC que conformaron el hidrolizado.

A la fase líquida del hidrolizado de desperdicios de alimentos se le adicionó medio mineral AM1. La glucosa, fructosa y arabinosa se utilizaron como fuente de carbono para la cepa JU15 en una fermentación en mini fermentadores por 48 horas. A partir de los datos obtenidos se determinó una velocidad volumétrica de producción de 0.47 ($g_{D-AL}/L \cdot h$) y además, se comprobó que la cepa tiene la capacidad de consumir fructosa.

Palabras clave: *desperdicios de alimentos, azúcares reductores, ácido láctico, pretratamiento termoquímico y E. coli JU15.*

ABSTRACT**FOOD WASTE: CHARACTERIZATION AND REUSE TO OBTAIN LACTIC ACID**

By: Anaid Maira Santos Corona

December 2020

Master of Science in Chemical Engineering

Directed by: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Dra. Ana Alejandra Vargas Tah

Food loss through the food supply chain represents one-third of total production worldwide. In Mexico, food waste represents more than 50% of the urban solid waste that is confined in landfills. This causes environmental, social, and economic problems. The abundance of food waste is available to obtain added-value products through a biotechnological process such as fermentation; since, it contains carbohydrates, proteins, and lipids mainly, which makes their transformation possible.

In this project, the optimal conditions of time and concentration of H_2SO_4 were found as thermochemical pretreatment applied to food waste, and the reducing sugars obtained were used as a carbon source to produce lactic acid with the strain *E. coli* JU15.

Food waste was characterized through a proximal analysis (moisture, protein, total carbohydrates, total fats, ashes, and crude fiber) and subsequently they were subjected to thermochemical pretreatments with NaOH 0.5% and H_2SO_4 2% to obtain reducing sugars. A Central Compound Design (CCD) was carried out to identify optimal conditions of time and acid concentration (H_2SO_4) and the reducing sugars were quantified by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method and HPLC. Finally, the food waste hydrolyzate was enriched with mineral medium AM1. Producing lactic acid quantified by HPLC, the *E. coli* JU15 strain was tested.

The pretreatment with NaOH 0.5% w / w at 121 °C for 30 minutes in an autoclave showed not the ideal conditions for food waste since the reducing sugars were totally lost. The design of the experiment applied to the acid pretreatment (H_2SO_4) indicated the optimal conditions of acid concentration and time, 1.6% and 31 minutes, respectively,

reaching a concentration of 30 g / L (DNS). Glucose, fructose, and arabinose were the 3 main reducing sugars identified by HPLC that made up the hydrolysate.

Mineral medium AM1 was added to the liquid phase of the food waste hydrolysate. Glucose, fructose, and arabinose were used as a carbon source for the JU15 strain in a fermentation carried out in mini fermenters for 48 hours. From the data, volumetric production was determined, 0.47 (gAL/h). In addition, the strain was found to be able of consuming fructose.

AGRADECIMIENTOS

Finalizar esta tesis no hubiera sido posible sin el esfuerzo, dedicación, apoyo, paciencia, experiencia y acompañamiento de muchas personas a través de estos dos años.

Primeramente, quiero agradecer a Dios por haberme dado la oportunidad de reencontrarme con lo que en verdad me apasiona y de permitirme llegar hasta este momento de mi vida. Por ser mi fuerza en los momentos difíciles y por darme la voluntad para seguir creciendo y alcanzar nuevas metas.

A mi familia, que siempre me ha apoyado incondicionalmente en cada momento y decisión de mi vida. Gracias por nunca dejar de creer en mí y por estar ahí para contenerme cuando más lo necesito. A mi madre Virginia por ser mi ejemplo y a mi hermana Mary por ser mi guía para apreciar y valorar las cosas simples, valiosas e importantes de la vida, y también por haber sido la editora gráfica de esta tesis.

Al Dr. Agustín Jaime Castro Montoya por haber sido la persona que aportó la idea de trabajar en este tema, por ofrecer su tiempo, experiencia y apoyo para llevar a buen término este proyecto. A la Dra. Ana Alejandra Vargas Tah por todo su tiempo, dedicación y acompañamiento durante todo mi trabajo de laboratorio. Gracias a mis asesores por haberme guiado y darme su apoyo.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por haber proporcionado muy amablemente la cepa *Escherichia coli* JU15 para este trabajo.

A mis compañeros de generación: Fabian, Salvador, Carlos y Nancy con quienes tuve la oportunidad de volver a compartir un aula como alumna pero ahora de un posgrado. Al equipo del laboratorio: Omar, Luis y Alejandra, alumnos de licenciatura internos y externos que se integraron por un corto tiempo al equipo haciendo más amena y enriquecedora esta experiencia llamada “maestría”.

Finalmente, quiero agradecer a todos mis amigos que me han acompañado a lo largo de mi vida: América, Pepe, Vero y Galetia y a las personas que han sido parte importante de mi crecimiento personal: Maestro Francisco Javier Blanco Saldaña, Cristy, Nitzy, Ana Isabel, Esmeralda, Edith, Isela, Judith, Mariana, Faby, Adilene y Adrian. Gracias, por sus palabras de aliento que me ayudaron a reencontrarme y volver a creer en mí misma, pero sobre todo por su amistad y su gran cariño.

Agradecimiento especial a Garegin Ordyan: *“you kindled my heart with your heart”*
Եւ սիրում եմ քեզ.

“Las cosas no pasan “por algo”, sino más bien pasan “para algo”. Una lágrima, es para una pronta sonrisa; un esfuerzo, es para posibilitar un logro; un fracaso es para un pronto éxito; una ruptura es para un nuevo encuentro; una adversidad, es para una futura prosperidad”
-Farid Dieck-

ÍNDICE

	Página
Lista de Tablas	xi
Lista de Figuras	xii
 CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Generalidades.	2
1.2 Justificación.	3
1.3 Hipótesis.	3
1.4 Objetivos.	4
1.4.1 Objetivo General.	4
1.4.2 Objetivos Específicos.	4
1.5 Alcance de la Investigación	4
 CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	
2.1 Desperdicios de Alimentos.	7
2.1.1 Definición de Desperdicios de Alimentos.	7
2.1.2 Situación Mundial de los Desperdicios de Alimentos.	7
2.1.3 Sistema Jerárquico de Recuperación de Alimentos.	9
2.2 Biorefinería.	11
2.2.1 Concepto de Biorefinería.	11
2.2.2 La Biorefinería en los Desperdicios de Alimentos.	11
2.2.3 Productos de Valor Agregado.	12
2.3 Residuos de Alimentos: Materia Prima Renovable para la Producción de Ácido Láctico.	13
2.4 Ácido Láctico.	13
2.4.1 Descubrimiento del Ácido Láctico y sus Aplicaciones.	13
2.4.2 Propiedades Físico-Químicas del Ácido Láctico.	14
2.4.3 Productos del Ácido Láctico.	16
2.4.3.1 Ácido Poliláctico.	18
2.4.4 Producción de Ácido Láctico.	18
2.4.4.1 Síntesis Química.	18
2.4.4.2 Producción Biotecnológica.	20
2.4.4.2.1 Clasificación de Microorganismos Productores de Ácido Láctico.	20
2.4.4.2.2 Capacidad de Fermentación.	21

2.5 Pretratamientos.	24
2.5.1 Pretratamientos Físicos y Mecánicos.	24
2.5.2 Pretratamientos Químicos.	24
2.5.2.1 Pretratamiento Ácido.	25
2.5.2.2 Pretratamiento Alcalino.	26
2.5.3 Pretratamiento Térmico.	26
2.5.4 Pretratamiento Biológico.	27
 CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.	
3.1 Desperdicios de Alimentos.	29
3.1.1 Recolección e Identificación.	29
3.2 Pretratamientos Exploratorios.	29
3.3 Condiciones Óptimas de Pretratamiento Ácido Diluido.	30
3.3.1 Diseño de Experimentos.	30
3.3.2 Hidrolizado de Desperdicios de Alimentos.	31
3.4 Producción de D – Ácido Láctico.	32
3.4.1 Microorganismo.	32
3.4.2 Inóculos para Cultivos..	32
3.4.3 Medios de Cultivo.	33
3.4.4 Condiciones de Cultivo.	33
3.5 Métodos Analíticos.	33
3.5.1 Análisis Químico de los Desperdicios de Alimentos.	33
3.5.2 Crecimiento Bacteriano.	34
3.5.3 Cuantificación de Azúcares y D – Ácido Láctico.	34
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
4.1 Composición de los Desperdicios de Alimentos.	36
4.1.1 Análisis Proximal.	39
4.2 Pretratamientos Termoquímicos Exploratorios.	40
4.3 Diseño Ácido Diluido.	43
4.4 Producción de D – Ácido Láctico.	48
4.4.1 Fermentación del Simulado (AM1) Suplementado con Glucosa, Fructosa y Arabinosa.	49
4.4.2 Fermentación del Hidrolizado de Desperdicios de Alimentos con <i>E. coli</i> JU15.	52
 Conclusiones.	55
Referencias.	56

Apéndices.

Apéndice 1. Método de Estimación de Azúcares Reductores por Ácido Dinitrosalicílico (DNS).	65
--	----

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 2.1	Propiedades físicas del ácido láctico.	15
Tabla 3.1	Valores codificados y decodificados del Diseño Central Compuesto (DCC).	31
Tabla 3.2	Matriz del diseño experimental.	31
Tabla 4.1	Registro de los desperdicios de alimentos recolectados.	36
Tabla 4.2	Tipos de desperdicios de alimentos recolectados.	37
Tabla 4.3	Caracterización de los desperdicios de alimentos recolectados.	40
Tabla 4.4	Concenración de azúcares antes y después de los pretratamientos.	41
Tabla 4.5	Cuantificación de azúcares por DNS y HPLC de casa uno de los experimentos.	44
Tabla 4.6	Identificación de azúcares en cada tratamiento por HPLC.	47
Tabla 4.7	Velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo, velocidad específica de producción, velocidad volumétrica de producción, rendimiento de ácido láctico y rendimiento de biomasa de la cepa JU15 en hidrolizado simulado.	50

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 2.1	Relación entre el INB per cápita y desperdicio de alimentos en algunos países.	9
Figura 2.2	Jerarquía de residuos para una mejor gestión de acuerdo a lo que es mejor para el medio ambiente.	10
Figura 2.3	Manejo del excedente de alimentos.	11
Figura 2.4	Valorización de la CSA.	12
Figura 2.5	Compuestos presentes en la cadena de suministro de residuos de alimentos, su uso y aplicación más común.	13
Figura 2.6	Los dos enantiómeros del ácido láctico.	16
Figura 2.7	Rutas de conversión del ácido láctico a otros compuestos químicos.	17
Figura 2.8	Síntesis química del ácido láctico.	19
Figura 2.9	Fermentación homoláctica.	22
Figura 2.10	Fermentación heteroláctica.	23
Figura 3.1	Cepa JU15 en medio LB a) sólido y b) líquido.	32
Figura 3.2	Pre inóculo.	32
Figura 3.3	Adaptación en medio mineral AM1.	32
Figura 4.1	Desperdicios de comida recolectados.	36
Figura 4.2	Desperdicios de alimentos recuperados: a) cáscaras de naranja, b) bagazo de zanahoria, c) flor de jamaica, d) cáscara de limón, e) carne de pollo y res, f) varios, g) pico de gallo, h) lechuga y i) tortilla.	38

Figura 4.3	Muestras de desperdicios de alimentos con NaOH/H ₂ SO ₄ antes de someter a pretratamiento térmico en autoclave.	42
Figura 4.4	Muestras de desperdicios de alimentos después del pretratamiento termoquímico.	42
Figura 4.5	Reacción de una hidrólisis ácida en azúcares.	43
Figura 4.6	Gráfica de superficie de concentración de azúcares vs. Ácido, tiempo. Resultados DNS	45
Figura 4.7	Gráfica de superficie de concentración de azúcares vs. Ácido, tiempo. Resultados HPLC.	45
Figura 4.8	Hidrolizado de desperdicios de alimentos real.	48
Figura 4.9	Fermentaciones en medio mineral AM1 adicionado con glucosa fructosa y arabinosa (hidrolizado simulado.	50
Figura 4.10	Cinéticas de fermentación con la cepa JU15. Hidrolizado de desperdicios de alimentos simulado: medio mineral AM1 adicionado con glucosa, fructosa y arabinosa: 24.37 g/L, 5.26 g/L y 2.22 g/L, respectivamente.	51
Figura 4.11	Fermentaciones en hidrolizado de alimentos complementado con medio mineral AM1.	52
Figura 4.12	Cinéticas de fermentación con la cepa JU15. Hidrolizado de desperdicios de alimentos complementado con medio mineral AM1.	53
Figura 4.13	Velocidad volumétrica de producción de <i>D</i> -ácido láctico a 24 h y 48 h.	54

CAPITULO I:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades.

El incremento de la demanda de productos químicos, el calentamiento global y la escasez de combustibles fósiles representan un área de oportunidad donde la comunidad científica está poniendo interés y esfuerzos fomentando la reutilización y la valorización de los desperdicios de alimentos para la obtención de productos de valor agregado (Lin *et al.*, 2013).

A pesar de estos beneficios, utilizar los desperdicios de alimentos es un desafío debido a varias desventajas y limitaciones, su heterogeneidad principalmente, ya que está depende de la composición de los alimentos (lípidos, proteínas y carbohidratos), y diversas características de quién genera los residuos y cuando los genera, por ejemplo: estación del año, densidad poblacional, sexo, edad, ingreso per cápita, etcétera, (Lin *et al.*, 2013).

La manufactura de productos químicos a partir de un proceso biotecnológico como lo es la fermentación, utilizando recursos renovables como materia prima es una mejor alternativa a la síntesis química, ya que se puede evitar la obtención de productos secundarios no deseados utilizando microorganismos, obteniendo así un producto con mayor pureza (Sara, Brar y Blais, 2016).

El mercado de alcoholes y ácidos orgánicos a partir de desperdicios orgánicos alcanzará una producción mundial de hasta 113 millones de toneladas para el 2050, lo que estaría representando un 38% de la producción total de químicos orgánicos (Pachapur, Sarma, Brar, y Chaabouni, 2016).

El ácido láctico es un ácido orgánico que es posible obtener a través de una fermentación utilizando desperdicios de alimentos, además ha adquirido una gran importancia comercial debido a sus diversas aplicaciones en la industria de alimentos,

textil, química, farmacéutica y a su extensa aplicación como precursor del ácido poliláctico, que es un polímero biodegradable (Sara, Brar y Blais, 2016).

1.2 Justificación.

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que la ciudad de Morelia tenía una población de 729 757 habitantes en 2010. Los residuos sólidos urbanos (RSU) que son generados por la población son destinados a un relleno sanitario municipal que opera desde diciembre de 2007 (Hernández *et al.*, 2019).

Buenrostro y Bocco (1999) afirman que los mercados y tianguis de la ciudad de Morelia son una fuente generadora muy importante de residuos orgánicos -carne roja y blanca, frutas, vegetales y productos lácteos-. En el 2012 se reportó que de los RSU confinados al relleno sanitario municipal de Morelia, el 68% eran residuos orgánicos (González y Buenrostro, 2012).

El manejo de los desperdicios de comida es un problema ambiental (Thi, *et al.*, 2015) y esto se debe a que los desperdicios de comida son biodegradables y su disposición en rellenos sanitarios originan principalmente microbios, insectos y ratas, ocasionando diversas enfermedades. Además su descomposición produce gases efecto invernadero (GEI) y sus lixiviados contaminan el suelo y agua (Chakrabarti y Sarkhel 2003).

Además, los países en desarrollo como México, no tienen la capacidad económica que permita un mejor manejo de los residuos orgánicos. Consiguiendo solo destinar un lugar para su disposición que se encuentre lejos de ciudades o grandes poblaciones.

Para realizar esta investigación se eligió el Centro Gastronómico de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Ya que actualmente cuenta con un Centro Gastronómico que ofrece servicios de alimentos y bebidas a la comunidad universitaria, generando este tipo de residuos por lo que es posible recuperarlos antes

de su confinamiento en el relleno sanitario municipal. Dando la oportunidad de proponer su reúso para obtener ácido láctico.

1.3 Hipótesis.

Es posible utilizar un hidrolizado de desperdicios de alimentos encontrando las condiciones óptimas de concentración de ácido y tiempo para una recuperación máxima de azúcares reductores permitiendo utilizarlos por la cepa *Escherichia coli* JU15 como fuente de carbono para la producción de ácido láctico.

1.4 Objetivos.

1.4.1 Objetivo General.

Implementar un proceso biotecnológico para obtener ácido láctico a partir de azúcares reductores provenientes de desperdicios de alimentos.

1.4.2 Objetivos Específicos.

- i) Identificar bromatológicamente la composición de los desperdicios de comida obtenidos en el centro gastronómico de la UMSNH.
- ii) Realizar un diseño Desarrollar un diseño de experimento que permita obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables bajo las condiciones de pretratamiento estab.
- iii) Obtener ácido láctico a partir de una fermentación homoláctica utilizando la cepa *Escherichia coli* JU15.

1.5 Alcance de la Investigación.

De acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo se logró establecer las condiciones óptimas de pretratamiento de los desperdicios de alimentos y se comprobó que la cepa *Escherichia coli* JU15 es capaz de producir ácido láctico utilizando estos hidrolizados.

Posterior a este proyecto es importante probar el desempeño de la cepa en un reactor escala laboratorio controlando el pH de manera eficiente que permita una fermentación bajo condiciones anaerobias. Determinando los parámetros cinéticos es posible establecer las condiciones de escalamiento y proponer las etapas posteriores de bioseparación y purificación del ácido láctico. Una aplicación actual para este ácido orgánico es su polimerización y tener un bioplástico (ácido poliláctico).

Finalmente, es importante elaborar un análisis de costo-beneficio que pueda ser atractivo a las autoridades locales proponiendo una alternativa de impacto ambiental, social y económico a un problema actual de la localidad .

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Desperdicios de Alimentos.

2.1.1 Definición desperdicios de alimentos.

En la literatura se pueden encontrar definiciones para clasificar a los alimentos destinados al consumo humano y que tienen que ser desechados debido a varios factores. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define pérdida de alimentos (*food loss*) a la disminución del valor nutrimental de los alimentos destinados al consumo humano debido a las ineficiencias en las cadenas de suministros de alimentos (CSA), como lo son una baja infraestructura y logística, falta de tecnología, así como una insuficiencia de habilidades y conocimientos para su manejo. Esta definición también incluye las pérdidas originadas por desastres naturales.

Mientras que los desperdicios de alimentos (*food waste*) son los aquellos alimentos que se pierden entre mayoristas, minoristas y consumidores finales, incluso se considera un desperdicio de alimento si posteriormente son utilizados para alimentar ganado o para la obtención de bioenergía. Aquí se incluyen aquellas pérdidas debidas a la compra de comida en exceso y que después es desechada debido a que su fecha de caducidad expira o que se echan a perder en el caso de alimentos perecederos.

2.1.2 Situación mundial de los desperdicios de alimentos.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reporta que una tercera parte de los alimentos producidos en el mundo es desperdiciada, lo cual contribuye a un gran impacto negativo sobre la economía global, la disponibilidad de los alimentos y a un impacto ambiental; debido al desperdicio de recursos utilizados durante la producción de los alimentos como lo son el uso de suelo, agua, energía e insumos que son traducidos a emisiones a la atmósfera de CO₂ (Gustavsson *et al.*, 2011).

Estás pérdidas también afectan la seguridad alimentaria de las personas pobres, el desarrollo económico y al medioambiente. Estas pérdidas tienen diferentes causas que varían de acuerdo a las condiciones locales de cada país; como lo son la infraestructura, las formas de producción de cultivos, así como la capacidad que tienen las cadenas comerciales y canales de distribución de cada lugar (Gustavsson *et al.*, 2011).

Las principales etapas en las CSA en las que se han detectado y estimado pérdidas y/o desperdicio de alimentos son en la producción agrícola, manejo y almacenamiento pos cosecha, procesado, distribución y consumo (Gustavsson *et al.*, 2011). La mayor pérdida de alimentos reportada en países desarrollados es causada por las exigencias de estética y altos estándares de calidad de los alimentos por parte de los consumidores, mientras que, en los países en desarrollo, como es el caso de México, esta pérdida se debe principalmente al deterioro biológico derivado de la falta de tecnología para conservar los alimentos (Hodges *et al.*, 2010).

La Figura 2.1 (Thi *et al.*, 2015) muestra la relación de los desperdicios de alimento per cápita/día de varios países desarrollados y en desarrollo contra el Ingreso Nacional Bruto reportado. El comportamiento de la curva en la gráfica muestra una tendencia al incremento del desperdicio de alimentos en países en desarrollo, México se encuentra en este caso. Por el contrario, en los países desarrollados que se muestra un desperdicio mayor de alimentos la tendencia va dirigida a una disminución de esta proporción, debido al implemento de la campaña de concientización “basura cero” (Thi *et al.*, 2015).

Por el contrario, los países en desarrollo tienen políticas y regulaciones con acciones preventivas, de reciclaje, de tratamiento y de disposición de los desperdicios de alimentos que ayudan a reducir los problemas ambientales, sociales y económicos que estos generan (Thi *et al.*, 2015).

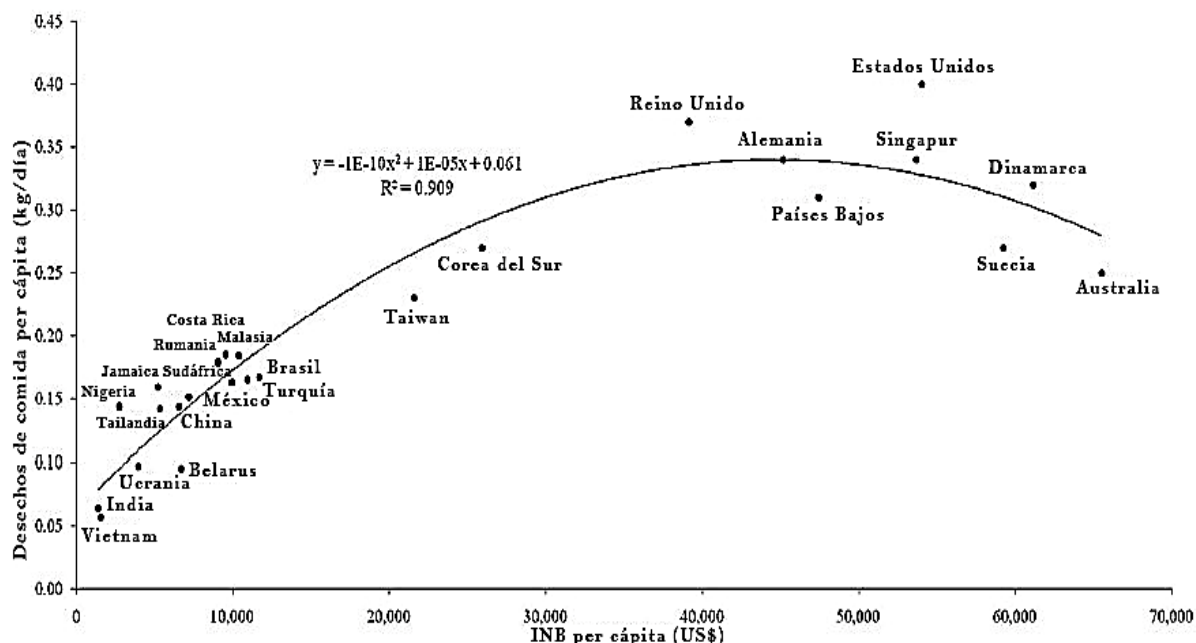


Figura 2.1. Relación entre el INB per cápita y desperdicio de alimentos en algunos países.

2.1.3 Sistema jerárquico de recuperación de alimentos.

Existe un sistema jerárquico de recuperación de alimentos, con esto se pretende lograr el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria en primera instancia y por último disminuir la huella ecológica de la CSA (Papargyropoulou *et al.*, 2014) logrando una utilidad de costo-beneficio (Schall, 1992).

La Figura 2.2 (DEFRA, 2011) muestra que la mejor opción es la prevención, y en la parte inferior se muestra la disposición como la menos favorable. Este sistema fue desarrollado como una herramienta de solución una vez que los desperdicios se han generado (Papargyropoulou *et al.*, 2014).

La Figura 2.3 de igual manera propone esta jerarquía para el proceso del manejo de excedente de alimentos una vez que estos ya se generaron, es decir, que no se realizaron acciones de prevención y que ya no es posible llevar a cabo una reutilización para consumo humano. En este caso el excedente de alimentos se convierte en desecho, es importante mencionar que en aún en esta etapa las acciones de prevención son las

más favorables. Los desperdicios de alimentos inevitables son los idóneos para su uso en la obtención de energía, biocombustibles y otros productos de valor agregado.



Figura 2.2. Jerarquía de residuos para una mejor gestión de acuerdo a lo que es mejor para el medio ambiente.

El problema de los desechos de alimentos está en aumento y las soluciones sustentables involucran a todos los participantes de la CSA, sector industrial y agrícola, así como a los minoristas y consumidores finales. Algunas soluciones que pueden ser implementadas para un buen manejo de desperdicio de alimentos se basa de manera similar en la jerarquía del manejo de residuos sólidos (Giroto *et al.*, 2015).

Existen cinco métodos de tratamiento para desperdicios de alimentos que son utilizados en los países en desarrollo: alimentación animal, composta, digestión anaerobia, incineración y rellenos sanitarios. De los cuales los más utilizados son los rellenos sanitarios (90%), composta (1% - 6%) y la digestión anaerobia (0.6%) (Thi *et al.*, 2015).

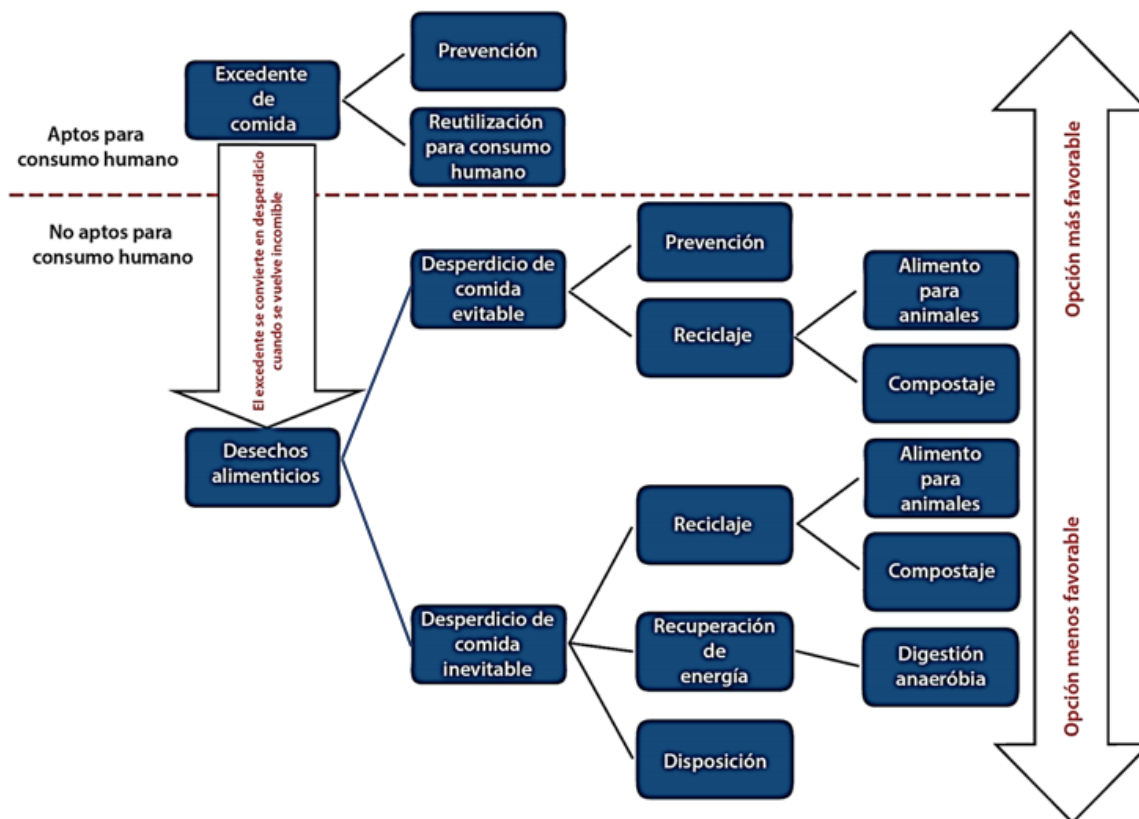


Figura 2.3. Manejo del excedente de alimentos.

2.2 Biorefinería.

2.2.1 Concepto de biorefinería.

“Es la conversión de la biomasa como materia prima en bioenergía, productos químicos de base biológica o materiales funcionales” (Sarma, Ayadi y Brar, 2016).

2.2.2 La biorefinería en los desperdicios de alimentos.

Existe una brecha entre los desperdicios de alimentos recuperados para la alimentación animal y los utilizados para el compostaje y recuperación de energía que puede ser explotado para obtener valor en la producción de químicos, materiales funcionales y bioenergía, como se observa en la Figura 2.4 (Matharu, de Melo y

Houghton, 2016), de esta manera se estaría dando un tratamiento a los desperdicios de alimentos aplicando el concepto de biorefinería.

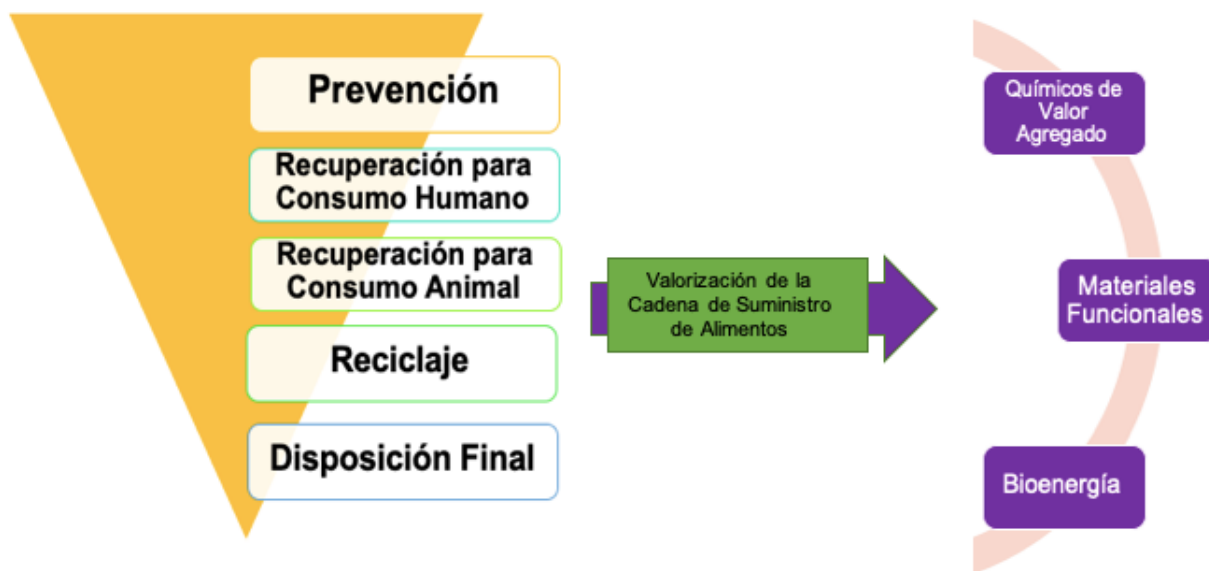


Figura 2.4. Valorización de la CSA.

2.2.3 Productos de valor agregado.

En la valorización de la CSA se pueden utilizar las pérdidas inevitables de los alimentos durante la cosecha y procesamiento (picar, pelar, triturar, hervir, conservar, etc.) ya que contienen moléculas de valor agregado como flavonoides, resinas, biopolímeros y ácidos grasos, conformados en una mezcla de lípidos, carbohidratos y proteínas (Giroto *et al.*, 2015). La Figura 2.5 (Pfaltzgraff *et al.*, 2013) muestra los diferentes productos que se pueden conseguir a partir de la CSA. La proporción de lípidos, proteínas y carbohidratos contenida en los desperdicios de alimentos va a depender de su procedencia.

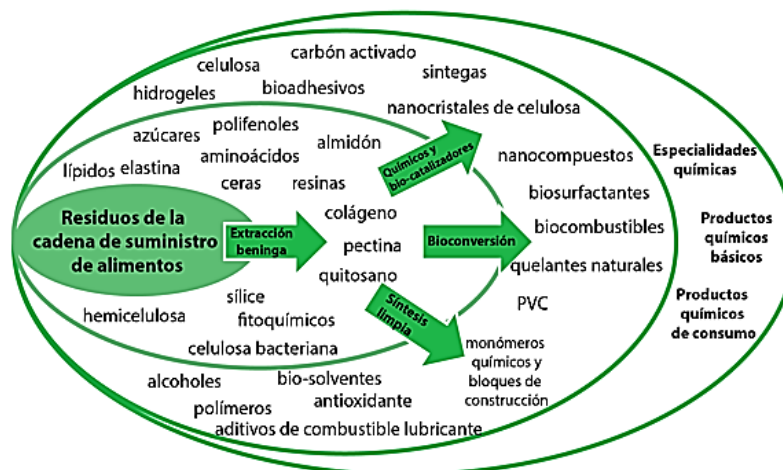


Figura 2.5. Compuestos presentes en la cadena de suministro de residuos de alimentos, su uso y aplicación más común.

2.3 Residuos de alimentos: materia prima renovable para la producción de ácido láctico.

Es posible utilizar diversas materias primas como sustrato para la obtención del ácido láctico que tienen las características de ser renovables, de bajo costo, que se encuentran en abundancia y que no son parte de la cadena de alimentos (Wee y Rye, 2009, De la Torre, *et al.*, 2019). Melazas, almidones, y diversos residuos orgánicos como; alimentos (Lichfield, 1996), materiales lignocelulósicos, agrícolas y agroindustriales (Gao, *et al.*, 2011) son algunos de estos.

No obstante, los microorganismos no los pueden utilizar (consumir) directamente por lo cual, pretratamientos fisicoquímicos y enzimáticos son necesarios para la obtención de azúcares. Además, la modificación genética de las BAL ayuda a mejorar el rendimiento y la productividad del ácido láctico (Okano, *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011).

2.4 Ácido láctico.

2.4.1 Descubrimiento del ácido láctico y aplicaciones.

El ácido láctico fue descubierto en la leche cortada en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele (Parra, 2010). En 1789, fue nombrado “ácido láctico” por Lavoisier y en 1833 Mitscherlich y Liebig concluyeron que la fórmula del ácido láctico era $C_6H_{12}O_6$ (fórmula para la molécula doble). En 1847 Blondeaur descubrió que el ácido láctico no era un componente de la leche, sino más bien era un metabolito generado por ciertos microorganismos como producto de fermentación. *Streptococcus lactis* fue la primera bacteria láctica que se logró obtener de un cultivo puro por Lister en 1877 (Benninga, 1990). La fermentación de ácido láctico a escala industrial la inició C. E. Avery en 1881 en Littleton, MA, USA. (Vick-Roy, 1985).

El ácido láctico fue el primer químico producido biotecnológicamente y tiene amplias aplicaciones dentro de la industria de alimentos como acidulante y conservador, en la farmacéutica se utiliza para la producción de sales de hierro y calcio, en la industria textil para remojar y desencalado de pieles, mientras que dentro de la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico (Hujanen y Linko, 1996; Serna *et al.*, 2003).

2.4.2 Propiedades físico-químicas del ácido láctico.

Herryman y Blanco (2005) describen al ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico o ácido hidroxi-propanoico) “como un líquido incoloro, soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter de petróleo y disulfuro de carbono, o un sólido de punto de fusión bajo en estado puro” (p. 50). La tabla 2.1 (Holten *et al.*, 1971) muestra propiedades físicas del ácido láctico.

El ácido láctico posee un átomo de carbono quiral que permite que existan dos enantiómeros del ácido láctico designados como L (+) ó S (+) (dextrógiro) y el D (-) ó R (-) (levógiro) (Groot *et al.*, 2010; Litchfield, 1996) como se muestra a continuación en la Figura 2.6.

Tabla 2.1. Propiedades físicas del ácido láctico.

Propiedad	Valor	Referencia
Número CAS	General: 50-21-5	(Datta y Henry, 2006)
	Ácido Láctico - (L): 79-33-4	
	Ácido Láctico - (D): 10326-41-7	
Peso Molecular (g/mol)	90.08	
Fórmula	C ₃ H ₆ O ₃	
Punto de Fusión (C°)	52.8 (D)	(Komesu <i>et al.</i> , 2017)
	53.0 (L)	
	16.8 (DL)	
Punto de Ebullición (C°)	82.0 a 0.5 mmHg (DL)	(Komesu <i>et al.</i> , 2017; Sepitka, 1961)
	122.0 a 15 mmHg (DL)	
	103 a 15 mmHg (D)	
Estructura Cristalina	Ácido Láctico - (L): ortorrómbico	(Shouten <i>et al.</i> , 1994)
	Grupo Espacial: P212121	
Densidad sólida (g/ml)	1.33 (20 °C sólido)	PURAC
Densidad líquida (g/ml, 20°C)	1.224 (100% Líquido Subenfriado)	(Sepitka, 1961)
	1.186 (80.8% Solución en Agua)	(Troupe <i>et al.</i> , 1940)
pKa a 25 °C	3.83 (D)	(Komesu <i>et al.</i> , 2017)
	3.79 (L)	
Capacidad Calorífica (J/mol °C)	190 (DL) a 20 °C	(Komesu <i>et al.</i> , 2017)
Entalpía de Solución (kJ/mol)	7.79 (L) a 25 °C	(Komesu <i>et al.</i> , 2017)

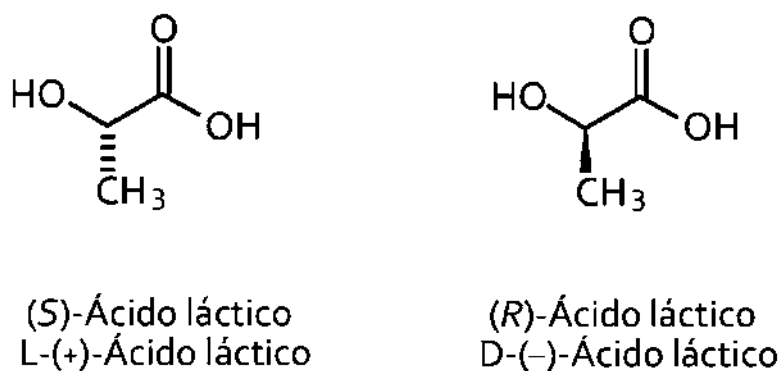


Figura 2.6. Los dos enantiómeros del ácido láctico.

2.4.3 Productos del Ácido Láctico.

El ácido láctico puede ser utilizado como materia prima para la obtención de diversos químicos; ácido pirúvico, ácido acrílico, 1,2 – propanodiol y el éster de lactato, a través de una síntesis química o de una ruta biotecnológica, como se observa en la Figura 2.7 (Gao *et al.*, 2011).

Es posible obtener estos productos debido a que la molécula del ácido láctico posee un grupo funcional hidroxilo y un ácido carboxílico (Fan *et al.*, 2009).

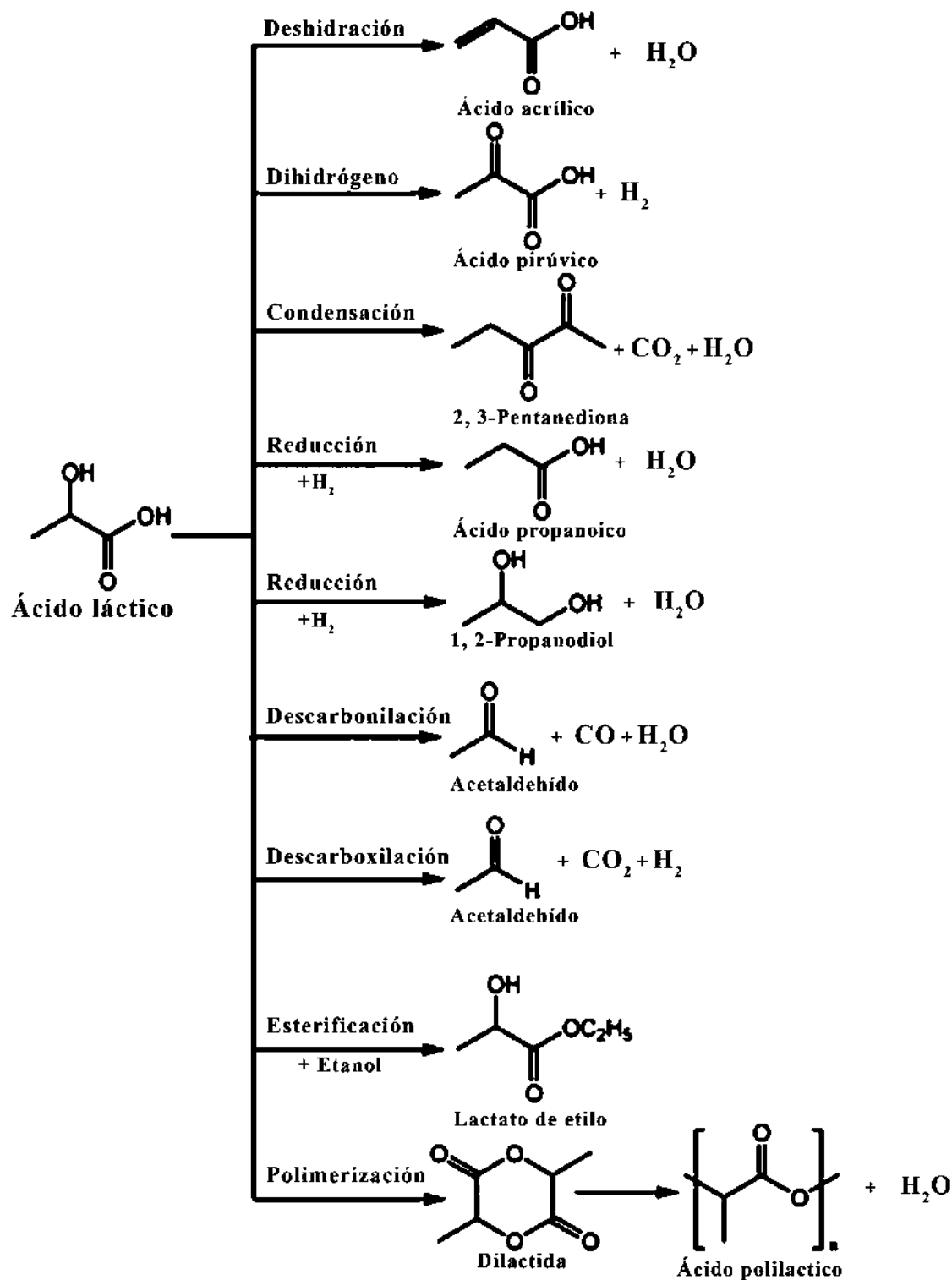


Figura 2.7. Rutas de conversión del ácido láctico a otros compuestos químicos.

2.4.3.1 Ácido poliláctico.

El ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico. A este biopolímero se le han encontrado diversas aplicaciones derivadas de sus características de biodegradabilidad, biocompatibilidad y de barrera que posee debido a sus inusuales propiedades, desde el estado amorfo hasta el estado cristalino, que se logran al manipular las mezclas de sus isómeros D (-) y L (+), los pesos moleculares y su polimerización (Serna *et al.*, 2003).

2.4.4 Producción ácido láctico.

El ácido láctico puede ser obtenido por medio de un proceso biotecnológico (fermentación) o un proceso de síntesis química (Gao *et al.*, 2011; Serna *et al.*, 2011). Estos dos métodos han sido utilizados en su producción. Sin embargo, la síntesis química tiene varias limitaciones: altos costos de manufactura, vinculación a otros subproductos de otros procesos y obtención de una mezcla de D (-) y L (+) ácido láctico (Datta y Henry, 2006), mientras que con un proceso bioquímico utilizando microorganismos se puede obtener solo uno de los isómeros por lo que es posible obtener un producto con alto grado de pureza (Hofvendahl y Hahn - Hägerdal, 2000).

2.4.4.1 Síntesis química.

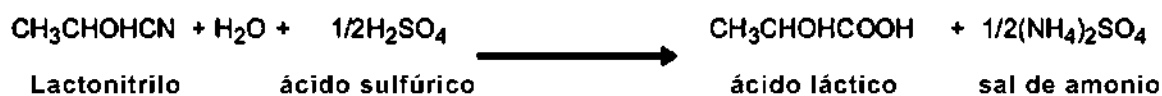
La síntesis química que es utilizada para procesos comerciales esta basada en la reacción del acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para obtener lactonitrilo, esta reacción ocurre en fase líquida y a presión muy alta; después el lactonitrilo es recuperado y purificado utilizando una destilación. Por último, se realiza una hidrólisis utilizando HCl concentrado o H_2SO_4 para producir una sal de amonio y ácido láctico. Para el proceso de purificación con destilación, el ácido láctico se esterifica con metanol para producir lactato de metilo que se hidroliza con agua por medio de un catalizador ácido para producir ácido láctico y metanol; este último es reciclado. Con este proceso se obtiene una mezcla de L

(+) y D (-) ácido láctico. La figura 2.8 muestra las reacciones descritas anteriormente. (Gao *et al.*, 2011; Narayanan *et al.*, 2004; Serna *et al.*, 2003).

(a) Adición de cianuro de hidrógeno



(b) Hidrólisis por H_2SO_4



(c) Esterificación



(d) Hidrólisis por H_2O

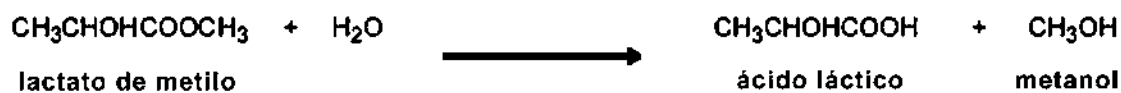


Figura 2.8. Síntesis química del ácido láctico.

Existen otras posibles rutas para la obtención de ácido láctico (Narayanan *et al.* 2004):

- oxidación del propilenglicol
- reacción del acetaldehído
- monóxido de carbono y agua en condiciones de temperatura y presión elevadas
- hidrólisis de ácido cloropropiónico
- oxidación de propileno con ácido nítrico

2.4.4.2 Producción biotecnológica.

El proceso biotecnológico para la producción de ácido láctico tiene diversas ventajas sobre la síntesis química: bajo costo del sustrato, bajo consumo de temperatura y energía durante la producción (Datta y Henry, 2006) así como también una alta estereo especificidad en su producción por parte de los microorganismos que depende del tipo de enzima involucrada (John *et al.*, 2007) por lo que es posible obtener un producto con alto grado de pureza (Hofvendahl y Hahn - Hägerdal, 2000).

Cuando la producción del ácido láctico se lleva a cabo por una fermentación a partir de recursos renovables abarca los siguientes cuatro pasos: pretratamiento del sustrato incluyendo la hidrólisis de los azúcares, fermentación de los azúcares a ácido láctico, separación de la bacteria y residuos sólidos del cultivo, y por último la purificación del ácido láctico (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000). Cabe mencionar que los costos de los procesos de separación y purificación después de la fermentación elevan los costos en la producción del ácido láctico (Datta y Henry, 2006).

2.4.4.2.1 Clasificación de microorganismos productores de ácido láctico.

Los microorganismos que producen ácido láctico son clasificados en bacterias, fungi y levaduras (Krishna *et al.*, 2018).

Las bacterias que producen ácido láctico, se clasifican a su vez en cuatro categorías: 1) bacterias láctico-ácidas (BAL), 2) *Escherichia coli*, 3) *Corynebacterium glutamicum* y 4) *Bacillus*. De esta clasificación las BAL son las más utilizadas (Litchfield *et al.*, 2009; Budhavaram y Fan, 2009).

Las BAL son las dominantes en la producción industrial del ácido láctico (Okano *et al.*, 2010) y su clasificación fue iniciada en 1919 por Orla – Jensen, la mayoría son gram-positivas, no formadoras de esporas, no móviles, en forma de cocos y carecen de

la enzima catalasa. Pueden ser microorganismos mesófilos o termófilos (Savadogo *et al.*, 2006).

Algunos géneros de las BAL son: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Zymomonas mobilis* y *Kluiveromyces lactis* (Serna *et al.*, 2003).

E. coli es una bacteria anaerobia facultativa y ha sido utilizada en la ingeniería metabólica para desarrollar cepas homofermentativas que generen ácido láctico a partir de diferentes fuentes de carbono (Martinez *et al.*, 2017; Narayanan *et al.*, 2004). La cepa silvestre de *E. coli* utiliza la glucosa como sustrato para producir diversos productos: ácido acético, lactato, succinato, formiato, piruvato y etanol (Martinez *et al.*, 2017).

2.4.4.2.2 Capacidad de fermentación.

En cuanto a la capacidad de fermentación, los microorganismos que producen ácido láctico se clasifican en homofermentativos y heterofermentativos (John *et al.*, 2007). Las cepas homofermentativas sólo producen ácido láctico y utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (Figura 2.9) para convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, y tiene un rendimiento de más del 85% a partir de glucosa (Parra, 2010).

Algunas de las BAL homofermentativas que son utilizadas en la producción del ácido láctico son: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus acidophilus* (John *et al.*, 2007).

Por el contrario, las cepas heterofermentativas producen lactato, CO₂ y etanol en cantidades equimolares (1 mol) a partir de 1 mol de glucosa utilizando la vía de la hexosa monofosfato (ruta Embden-Meyerhoff) o la vía de las pentosas (vía de la fosfocetolasa) y producen 50% de ácido láctico (Krishna *et al.*, 2018, Parra, 2010), como se muestra en la Figura 2.10. *Lactobacillus pentosus* (Bustos *et al.*, 2004), *Lactobacillus bifementans* y

Lactobacillus brevis (Cui *et al.*, 2011) son algunos ejemplos de este tipo de bacterias heterofermentativas.

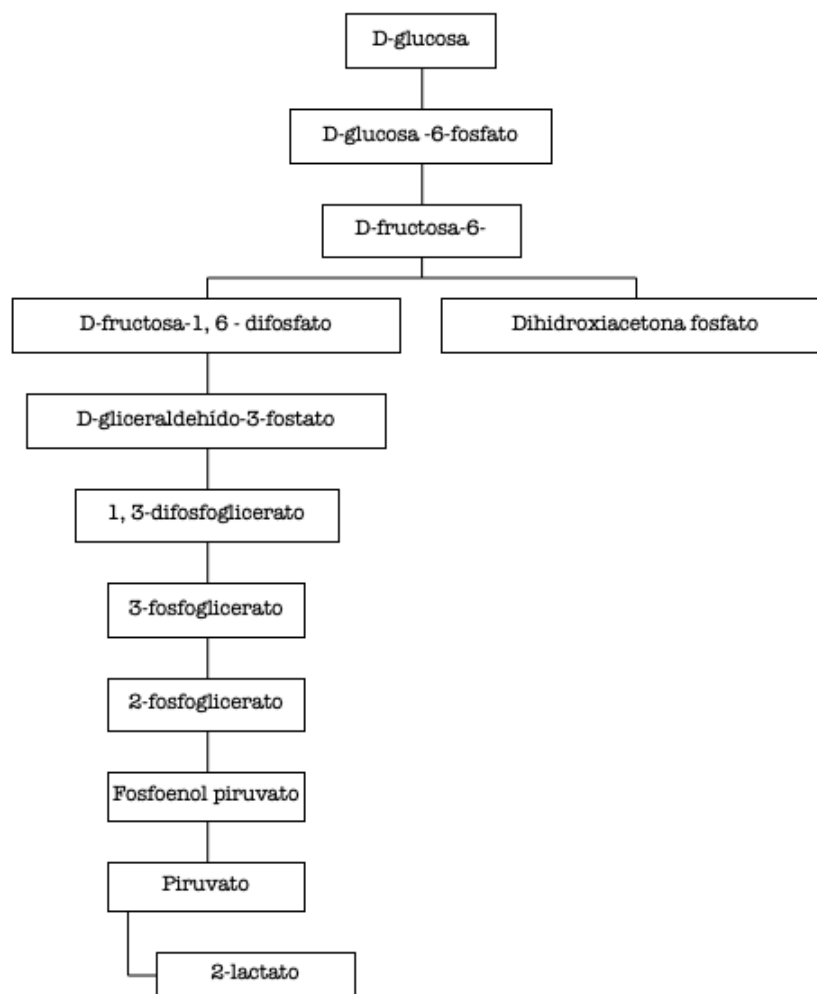


Figura 2.9. Fermentación homoláctica.

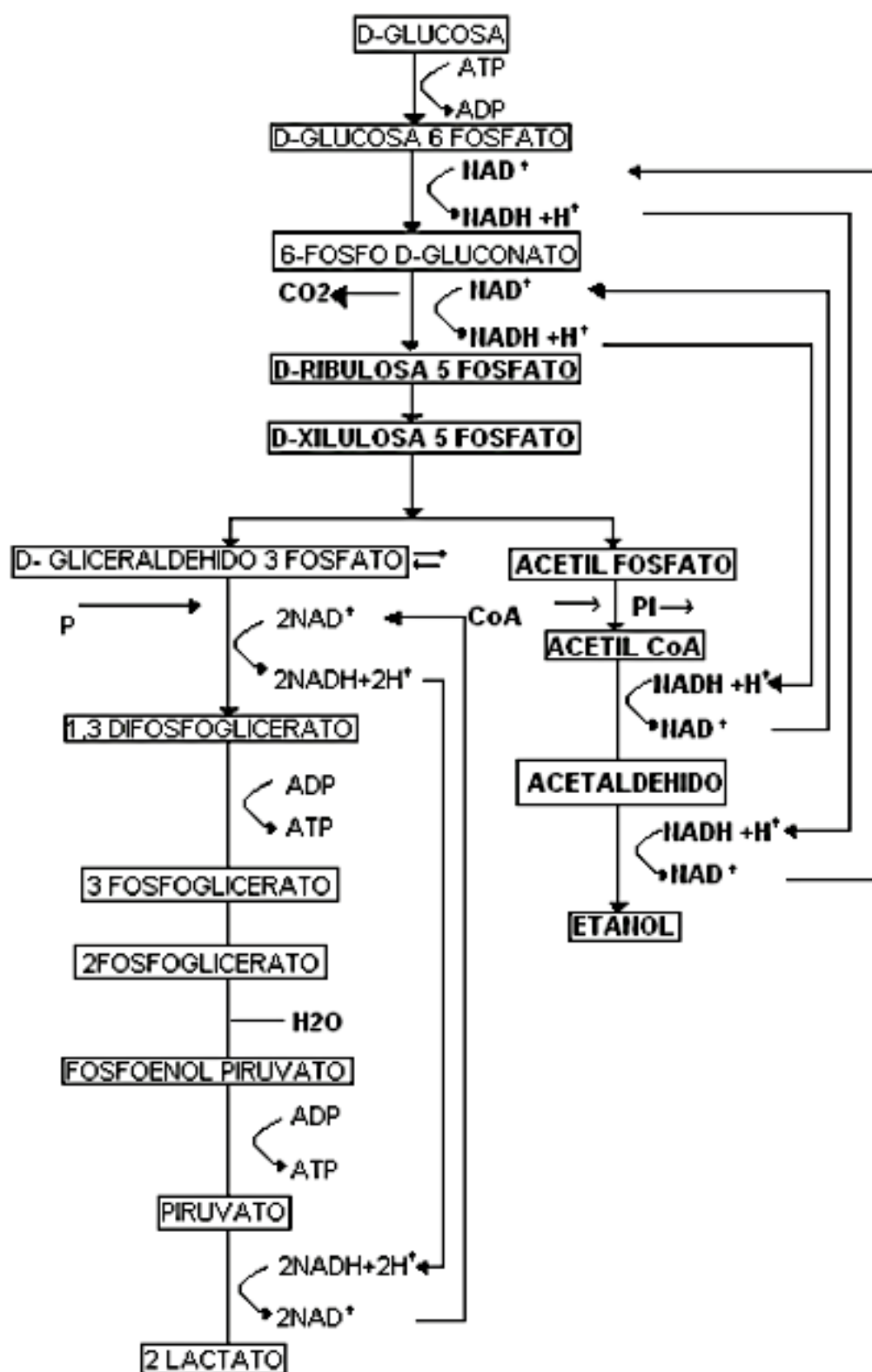


Figura 2.10. Fermentación heteroláctica.

2.5 Pretratamientos.

En la actualidad se utilizan diversos desechos agrícolas y de alimentos para la obtención de biocombustibles y productos de valor agregado que son importantes dentro de la industria farmacéutica, textil, de alimentos, médica, entre otras.

Los objetivos de los pretratamientos son mejorar las propiedades de superficie de los desperdicios de comida que permitan una buena interacción microbiana, reducir o eliminar compuestos tóxicos, hidrolizar lípidos, proteínas y azúcares para mejorar el acceso a los monómeros de estas biomoléculas (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018).

2.5.1 Pretratamientos físicos y mecánicos.

El objetivo de los pretratamientos físicos es la reducción de tamaño de la partícula para incrementar el área de superficie y facilitar el contacto entre el sustrato y las enzimas/bacteria (Alvira *et al.*, 2010).

Existen diversos métodos mecánicos cuya función además de la reducción del tamaño de partícula del sustrato aportan algún otro efecto, como por ejemplo: picado, prensa de tornillo, cizallamiento, homogenización a alta presión, lisis por centrifugación, sonicación, maceración y licuefacción. Todos ellos se pueden utilizar para mejorar las propiedades físicas y mecánicas de los desechos de comida (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018).

2.5.2 Pretratamientos Químicos.

Estos tipos de pretratamientos consisten en agregar agentes químicos, ya sean ácidos o bases que modifican las propiedades físico-químicas y biológicas de los residuos de comida. Para alcanzar el resultado deseado, la relación de los desechos de comida con el ácido/base debe optimizarse en función al contenido total de sólidos y a la concentración del ácido/base utilizado. (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018).

Existen diversos métodos químicos como; la ozonización (Ariunbaatar *et al.*, 2014), pretratamiento con peróxido de hidrógeno (Gundupalli y Bhattacharyya, 2017), y el pretratamiento líquido iónico (Haghighi Mood *et al.*, 2013), pero su uso no aplica a los desperdicios/desechos de comida (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018).

2.5.2.1 Pretratamiento ácido.

El principal objetivo de este tipo de pretratamientos es solubilizar (hidrolizar) la hemicelulosa que forma parte de la biomasa lignocelulósica y hacer que la celulosa este disponible al efectuar una hidrólisis enzimática (Alvira *et al.*, 2010), es decir, solubiliza carbohidratos en forma de monosáridos.

El ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorhídrico (HCl), ácido fosfórico (H_3PO_4) y ácido nítrico (HNO_3) son ácidos que han sido probados y reportados en la literatura (Mosier *et al.*, 2005), no obstante, el ácido sulfúrico diluido es el que ha sido más estudiado y probado (Alvira *et al.*, 2010).

Existen dos formas de llevarlo a cabo; con ácido concentrado o ácido diluido, aunque el primero de ellos presenta mayores desventajas en cuanto a toxicidad, corrosividad de equipos, recuperación del ácido, degradación de los monosacáridos y producción de 5-hidroxi-2-metil-furfural (HMF) y furfurales; que son inhibidores para los microorganismos encargados del proceso de fermentación, así como también inhiben la hidrólisis enzimática (Haghighi Mood *et al.*, 2013). Por tales motivos un pretratamiento con ácido concentrado es el menos favorable para aplicaciones industriales (Alvira *et al.*, 2010).

Por otra parte, un pretratamiento con ácido diluido se realiza empapando el material a tratar con esta solución a concentraciones usualmente por debajo del 4% en peso. Debido a que es un método más barato y efectivo en comparación con el uso del ácido concentrado (Galbe y Zacchi, 2007) presenta mayor interés de estudio y aceptación para realizar a escala comercial y operacional (Wyman, 1996).

2.5.2.2 Pretratamiento alcalino.

La lignina, los grupos acetilo y las diferentes sustituciones del ácido urónico que se encuentran presentes en la biomasa limitan la fase de la sacarificación puesto que impiden el acceso a la celulosa. La mayor ventaja de un pretratamiento alcalino es eliminar todos estos compuestos (Li, Kim y Nghiem, 2010) e incrementar la porosidad de la biomasa (Sun y Cheng, 2002).

Estos pretratamientos se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente con tiempos que van desde horas hasta días. Otras ventajas en comparación con los pretratamientos de ácidos, es su mayor efectividad en los residuos agrícolas sobre los residuos de madera, además, provoca una menor degradación de azúcares (Kumar y Wyman, 2009), solubilización de proteínas así como una posible saponificación de lípidos (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018).

Los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio han sido utilizados en este tipo de pretratamientos (Alvira *et al.*, 2010), sin embargo el método más utilizado y reportado es el hidróxido de sodio.

El mayor inconveniente de este método es su formación de sales y en ocasiones se suma a esto una larga duración de tiempo de residencia (Haghighi Mood, *et al.*, 2013).

2.5.3 Pretratamiento térmico.

Este tipo de pretratamientos se clasifican en: secos y húmedos (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018). El método más estudiado es el térmico tipo húmedo y tiene aplicaciones a escala industrial (Ariunbaatar *et al.*, 2014). Generalmente los desechos de comida son pretratados con este método ya que ayuda a la solubilización (hidrólisis) de los azúcares y otros compuestos orgánicos contenidos, así como también se reduce la

carga bacteriana eliminando patógenos (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018; Marin, Kennedy y Eskicioglu, 2010).

Todos estos fenómenos relacionados al calor, reducen la viscosidad de la materia prima, contribuyendo a mejorar el proceso de la digestión anaerobia (Carlsson, Lagerkvist y Morgan-Sagastume, 2012).

El pretratamiento térmico ha sido estudiado en un rango amplio de temperaturas (50-250 °C) para diferentes tipos de sustratos, sin embargo también es posible alcanzar una buena solubilización de azúcares y materia orgánica con bajas temperaturas pero alargando los tiempos de exposición (Ariunbaatar *et al.*, 2014).

La más grande desventaja de este método es la obtención de compuestos recalcitrantes como el furfural y el 5-hidroxi-2-metil-furfural a temperaturas mayores de 150 °C con cortos tiempos de retención; y a 100 °C con largos tiempos de retención (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018). Estos dos compuestos a ciertas concentraciones pueden inhibir la hidrólisis enzimática y/o el paso de la fermentación.

2.5.4 Pretratamiento biológico.

Se basa en el uso de enzimas derivadas de microorganismos. Es un proceso lento con tiempos de retención largos, además de ser un proceso costoso que requiere altas concentraciones para lograr un pretratamiento eficiente (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018).

CAPÍTULO III:

METODOLOGÍA

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

La metodología propuesta para desarrollar esta investigación y alcanzar los objetivos establecidos es la siguiente:

3.1 Desperdicios de Alimentos.

3.1.1 Recolección e Identificación.

En este estudio se recolectaron 21 kg de desperdicios de alimentos del Centro Gastronómico de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Michoacán, México. Los desperdicios se obtuvieron de un día normal de actividad escolar (7am a 5pm) durante el mes de Octubre eligiendo tres locales representativos de un total de 18: un local de jugos y dos locales de comida tradicional. Posteriormente, se identificaron los tipos de alimentos encontrados en la muestra. Para poder realizar la caracterización de los desperdicios de alimentos, éstos se sometieron a un proceso de molienda utilizando una licuadora convencional de cocina con una proporción de agua potable a temperatura ambiente de 1:1.5. A la mezcla homogénea resultante se le nombro licuado (desperdicios de alimentos + agua potable). Se guardaron en frascos de vidrio bajo congelación.

3.2 Pretratamientos Exploratorios.

Se obtuvo una fase líquida y sólida del licuado con una filtración a vacío. El licuado y las fases sólido y líquido se sometieron a dos pretratamientos; uno ácido y otro alcalino. En el caso de la fase sólida, se repuso el porcentaje de humedad con agua destilada para someterse al pretratamiento correspondiente.

40 g de los desperdicios de alimentos en licuado, sólidos y líquidos fueron sometidos a un pretratamiento alcalino utilizando 20 g de NaOH 0.5% (p/p) y otro

pretratamiento ácido con 20 g de H_2SO_4 2% (p/p). Después, los desperdicios de alimentos fueron introducidos a una autoclave durante 30 minutos a una temperatura de 121 °C y 15 psi. De estos experimentos, se pudieron elegir las condiciones para un Diseño Central Compuesto (DCC) que permitiera encontrar las condiciones óptimas de pretratamiento.

3.3 Condiciones Óptimas de Pretratamiento Ácido Diluido.

3.3.1 Diseño de Experimentos.

Se aplicó un Diseño Central Compuesto (DCC) para investigar la combinación del efecto de la concentración de ácido y tiempo para obtener las condiciones óptimas a las cuales es posible recuperar la máxima concentración de azúcares reductores. La Tabla 3.1 muestra las concentraciones de H_2SO_4 (X_1 , % p/p) y los tiempos (X_2 , min) que fueron utilizados en el diseño de experimentos. La variable de respuesta es la concentración de azúcares reductores (Y , g/L). Se utilizó el programa MINITAB versión 18 para obtener el diseño, el análisis, las gráficas y el punto de condiciones óptimas. Se obtuvo un diseño factorial completo con una serie de 15 corridas, 2 factores, 3 réplicas y 3 puntos centrales como se muestra en la Tabla 3.2.

Las 15 corridas se llevaron a cabo con 30 g de licuado y 30 g de H_2SO_4 que fueron introducidos a una autoclave a una temperatura de 121 °C, 15 psi y las correspondientes condiciones de tiempo y concentración de ácido.

Tabla 3.1. Valores codificados y descodificados del Diseño Central Compuesto (DCC).

Variable		Niveles		
		-1	0	1
H ₂ SO ₄ (%p/p)	X ₁	0	1	2
Tiempo (min)	X ₂	0	30	60

Tabla 3.2. Matriz del diseño experimental.

No.	Tiempo (min)	H ₂ SO ₄ (% p/p)
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	60	0
5	60	0
6	60	0
7	30	1
8	30	1
9	30	1
10	0	2
11	0	2
12	0	2
13	60	2
14	60	2
15	60	2

3.3.2 Hidrolizado de Desperdicios de Alimentos.

Del diseño de experimentos se obtuvieron las condiciones óptimas de tiempo y H₂SO₄, 31 minutos y 1.6% (p/p), respectivamente; con las cuales se podrían obtener 32

g/L de azúcares reductores. Los desperdicios de alimentos pretratados fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos para separar la fase sólida y líquida.

3.4 Producción de *D*- Ácido Láctico.

3.4.1 Microorganismo.

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* JU15. Proporcionada amablemente por el Dr. Alfredo Martínez, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus ubicado en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

3.4.2 Inóculos para Cultivos.

A partir de la cepa *E. coli* JU15 en placa con medio sólido Luria Bertani (LB) y 3 μ L antibiótico (kanamicina 30 mg/L) se sembraron tubos estériles con 3 ml de medio LB y kanamicina 30 mg/L, y se incubaron a 37 °C de 5 – 7 h sin aireación con agitación lineal a 250 rpm. A partir de este precultivo se sembraron 50 μ L en un matraz Erlenmeyer de 125 ml al que se agregaron 15 ml de medio LB y kanamicina 30 mg/L, y se incubó a 37 °C de 8 – 10 h sin aireación con una agitación orbital de 150 rpm. Finalmente, a partir de este precultivo, se inocularon 0.1 DO₆₀₀ = 0.37 g_{DCW}/L y se adaptó en 150 ml de medio mineral AM1 con 30 g/L de glucosa como fuente de carbono en un matraz Erlenmeyer de 250 ml a 37 °C con agitación orbital de 150 rpm durante 12 horas sin aireación.

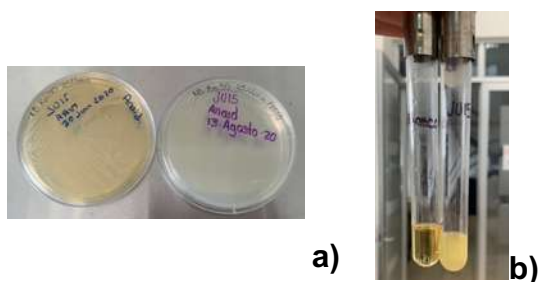


Figura 3.1. Cepa JU15 en medio LB a) sólido y b) líquido.



Figura 3.2. Pre inóculo.



Figura 3.3. Adaptación en medio mineral AM1.

3.4.3 Medios de Cultivo.

La composición del medio AM1 (Martínez et al., 2007) fue: 2.63 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.87 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.0 ml/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 M), 1.5 ml/L elementos traza, 1.0 ml/L KCl (2 M), 1.0 ml/L betaina HCl (1 M). Los elementos traza contienen (g/L): 1.6 FeCl_3 , 0.2 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 CuCl_2 , 0.2 $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 Na_2MoO_4 , 0.05 H_3BO_3 y 0.33 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Al medio se adicionó 30 g/L de glucosa en el caso de la adaptación, mientras que el hidrolizado simulado fue suplementado con glucosa, fructosa y arabinosa, 20 g/L, 8 g/L y 2 g/L, respectivamente. El medio Luria Bertani (LB) (Sezonov et al., 2007) para un litro contiene: 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl.

3.4.4 Condiciones de Cultivo.

Se realizaron los cultivos de la cepa JU15 en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 150 ml de hidrolizado simulado, iniciando con 0.1 DO_{600} . Las condiciones de pH y temperatura fueron controladas a 37 °C y el pH a 7.0 mediante la adición manual de KOH 6N. La velocidad de agitación orbital se mantuvo en 150 rpm. El hidrolizado de los desperdicios de alimentos, proveniente de la hidrólisis termoquímica, fue adaptado a las condiciones de cultivo, ajustando el pH a 7.0 con adición de KOH 6N. Finalmente el hidrolizado fue complementado con las sales del medio AM1 para la fermentación para poder realizar el proceso de fermentación. La fermentación inició con 0.1 DO_{600} bajo las mismas condiciones antes mencionadas. La fermentación fue monitoreada durante 48 horas. Todos los experimentos se efectuaron por triplicado en cada caso.

3.5 Métodos Analíticos.

3.5.1 Análisis Químico de los Desperdicios de Alimentos.

En el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH se realizó un análisis proximal; determinando humedad, proteína, cenizas, grasas totales y fibra cruda de acuerdo a los procedimientos:

método 934.01 AOAC (2000). Determinación por calentamiento directo; método oficial AOAC 2011.11. Proteína cruda por método Kjeldahl; NMX-F-607-NORMEX-2002; NMX-F-615-NORMEX-2004; NMX-F-090-S-1978, respectivamente. En el caso de los carbohidratos totales, estos fueron determinados por diferencia.

3.5.2 Crecimiento Bacteriano.

La densidad óptica fue determinada a 600nm en un espectrofotómetro (Modelo 7305, Jenway, Stone, Staffs, UK). Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras cada 4 horas durante las 48 horas de la fermentación.

3.5.3 Cuantificación de Azúcares y *D* – Ácido Láctico

Para medir la concentración de azúcares reductores totales antes y después de los pretratamientos se empleó el método de DNS, de acuerdo a una curva de calibración (Apéndice 1). Para la identificación y cuantificación de glucosa, fructosa, arabinosa y sacarosa antes y después de los pretratamientos se empleó el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El *D* - ácido láctico producto de la fermentación también fue identificado y cuantificado por HPLC. Se utilizó una cromatografía isocrática con H₂SO₄ 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 ml/min y 85 °C en una columna Rezex ROA-Organic Acid (300 x 7.8 mm). En la detección de los compuestos se utilizaron simultáneamente un detector IR a 410 nm (Modelo 350, Varian Inc., USA) y un detector UV-Vis (Modelo 310, Varian Inc., USA). Se inyectaron 10 μ L de muestra que fueron filtrados con membranas de nylon de 0.2 μ L y se inyectaron automáticamente. Para poder confirmar la identificación de los azúcares (glucosa, fructosa y arabinosa) y el *d* – ácido se utilizaron estándares.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Composición de los Desperdicios de Alimentos.

Los desperdicios de alimentos fueron recolectados del gastronómico de Ciudad Universitaria, como se muestra en la Tabla 4.1. En ésta se muestran los pesos recolectados en cada uno de los locales, obteniendo de 21 kg de desperdicios de alimentos. La Figura 4.1 muestra una imagen de los desperdicios al momento de ser recolectados.

Tabla 4.1. Registro de los desperdicios de alimentos recolectados.

CÉDULA DE ENCUESTA DE CAMPO PARA EL MUESTREO DE GENERACIÓN DE DESPERDICIOS DE ALIMENTOS				
¿Qué hace con los residuos de alimentos que se generan en su local?				
Se entregan los residuos de alimentos a los camiones de basura que pasan por la zona, cuya disposición final es el relleno sanitario de la ciudad de Morelia.				
No.	Fecha	Día	Peso de los Residuos Orgánicos Recolectados	Observaciones
1	Octubre 07 de 2019	Lunes	11.42 kg	Local de Jugos
2	Octubre 07 de 2019	Lunes	5.35 kg	Comida Tradicional
3	Octubre 07 de 2019	Lunes	4.08 kg	Comida Tradicional



Figura 4.1. Desperdicios de comida recolectados.

La Figura 4.2 muestra los desperdicios que se recuperaron; entre ellos bagazo de zanahoria, tortilla, flor de jamaica, lechuga, tallos de flor de calabaza, jitomate, cebolla, chile, desperdicios de carne de pollo, res y puerco, así como cáscaras de naranja, de limón, de tomate, de pepino, huesos, entre otros. Los desperdicios de alimentos fueron clasificados de acuerdo a su origen en tres grupos: vegetal, harinas (granos) y animal, como lo muestra la Tabla 4.2 y se encontró que la mayoría son de origen vegetal (frutas y verduras), seguido por los derivados de harinas (granos) y finalmente por derivados de carne; coincidiendo con la clasificación y proporción reportada por Moon *et al.*, en el (2009).

Tabla 4.2. Tipos de desperdicios de alimentos recolectados.

Desperdicios de Frutas y Verduras	83.78%
Desperdicios de Harinas	14.28%
Desperdicios de Carnes	1.92%



Figura 4.2. Desperdicios de alimentos recuperados: a) cáscaras de naranja, b) bagazo de zanahoria, c) flor de jamaica, d) cáscara de limón, e) carne de pollo y res, f) varios, g) pico de gallo, h) lechuga y i) tortilla.

De los alimentos que fueron recolectados - jitomate, cebolla, chile (pico de gallo), tortilla, lechuga y desperdicios de carne - no solo pueden clasificarse como desperdicios de alimentos de acuerdo a la definición de la FAO en 2011, sino también pueden catalogarse como desperdicios comestibles según Sarjahany y Johnson (2009) y Silvennoinen *et al.* (2015). Definiendo así que el 29% de los alimentos son desperdicios comestibles. Se encontró que las razones por las que estos alimentos fueron desechados fue: i) debido a que su fecha de caducidad había expirado, es decir, ya no eran aptos para su consumo considerando que son productos perecederos y ii) alimentos dejados en los platos por los usuarios. El resto de los alimentos que representan un 71% de lo recolectado – cáscaras, huesos y tallos - están excluidos de la definición dada por la FAO

(2011) pero pueden catalogarse como desperdicios orgánicos no comestibles (Sarjahany y Johnson, 2009; Silvennoinen *et al.*, 2015). Todos los desperdicios recolectados fueron sometidos a un proceso de molienda para obtener una mezcla homogénea que permitiera y facilitara su caracterización. Hafid *et al.*, (2015) reportaron el pretratamiento físico de molienda utilizando una proporción de volumen de agua 1:1 con respecto a los desperdicios de alimentos con la finalidad de reducir el tamaño de partícula para favorecer la hidrólisis de los azúcares durante el pretratamiento termoquímico.

4.1.1 Análisis Proximal.

Para evaluar y conocer la composición química del licuado se utilizó un análisis proximal utilizando diversas metodologías, estos resultados se muestran en la Tabla 4.3 en % peso seco. En el caso de la humedad de los desperdicios de alimentos, se determinó antes y después del proceso de molienda, 70% y 89%, respectivamente. El porcentaje de humedad de los alimentos (70%) fue similar al porcentaje de humedad reportado por algunos autores en sus trabajos sobre desperdicios de alimentos como materia prima en la obtención de bioproductos (Liu *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2008; Vavouraki *et al.*, 2013; Hafid, *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2008). La muestra recolectada de desperdicios de alimentos (licuado) de este trabajo estaba constituida principalmente de carbohidratos 53.68% y proteínas 33.37%. Mientras que el contenido de grasas totales, cenizas y fibra cruda se encontraron en menor proporción, 5.02%, 4.32% y 3.59%, respectivamente. El porcentaje en peso seco de los carbohidratos y de los lípidos, se encontró dentro del rango reportado, 30- 60% y 10 - 40%, respectivamente. Los lípidos presentes en los desperdicios de alimentos son principalmente triglicéridos derivados de semillas de girasol y grasas animales (Cheng, *et al.*, 2020). En el caso de las proteínas se tiene un elevado porcentaje con respecto a lo reportado, 3.5 - 21.9% (Leung *et al.*, 2012; Pleissner *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013) debido posiblemente a la presencia de desperdicios de carnes y cáscaras de naranja, que son los productos que principalmente aportaron a este indicador con 22% (Ahmad *et al.*, 2018) y 2.5 – 9% (Matharu *et al.*, 2016), respectivamete.

En general, en este tipo de desperdicios existe una gran heterogeneidad que hace impredecible su composición. Algunos factores que influyen son las zonas geográficas, estaciones del año, niveles socioeconómicos y costumbres culturales (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018). A pesar de esta gran diversidad, los desperdicios de alimentos contienen principalmente carbohidratos, proteínas y grasas, conteniendo una pequeña cantidad de celulosa y hemicelulosa (fibra cruda) (Hu *et al.*, 2014), lo que los convierte en un sustrato apropiado para la obtención de azúcares reductores como fuente de carbono para la producción de diversos bioproductos (Hafid *et al.*, 2015).

Tabla 4.3. Caracterización de los desperdicios de alimentos recolectados.

Determinación	% Peso Seco
Carbohidratos Totales	53.68% $\pm$ 0.05
Proteína	33.37% $\pm$ 0.02
Grasas Totales	5.02% $\pm$ 0.03
Fibra Cruda	3.59% $\pm$ 0.02
Cenizas	4.32% $\pm$ 0.05

4.2 Pretratamientos Termoquímicos Exploratorios.

Se obtuvieron los valores de concentración de azúcares reductores totales antes y después de los pretratamientos exploratorios, como lo indica la Tabla 4.4. La concentración inicial de azúcares reductores fue de 21 g/L para los casos de líquido y licuado de una concentración máxima teórica de azúcares de 43 g/L. Para el caso de los sólidos, no se puede aplicar el método del DNS antes de los pretratamientos, pero se realizó un lavado con agua destilada. La cantidad de azúcares en la parte líquida disminuyó de 21 g/L a 16 g/L con un pretratamiento ácido, mientras que los azúcares se perdieron casi completamente con el pretratamiento alcalino, obteniéndose solo 3 g/L de los 21 g/L iniciales. En cuanto a la concentración de azúcares para el caso de los sólidos se obtuvieron 7 g/L iniciales cuando se repuso el porcentaje de líquido con agua destilada. Posteriormente, al someterse al pretratamiento ácido se lograron obtener 37 g/L y 1 g/L

con el pretratamiento básico. Para los casos del licuado se observó un aumento en la concentración de azúcares con el pretratamiento ácido de 42 g/L; ocurriendo lo opuesto con el pretratamiento alcalino 5 g/L

Tabla 4.4. Concentración de azúcares reductores antes y después de los pretratamientos.

Muestra	Concentración de Azúcares (g/L)		
	Sin Pretratamiento	NaOH 0.5%	H ₂ SO ₄ 2%
Líquido	21	3	16
Sólidos	7 (lavado)	1	37
Licuado	21	5	42

En la Figura 4.3 se observan los pretratamientos con NaOH 0.5 % (p/p) y H₂SO₄ 2% (p/p) para los tres casos: licuado, sólido y líquido antes de ser sometidos a condiciones de tiempo y temperatura dentro de la autoclave y en la Figura 4.4 se observan después del pretratamiento. Las muestras presentaron un color marrón desde claro hasta oscuro después de los pretratamientos, indicando la posible presencia de melanoidinas producidas a temperaturas prolongadas mayores de 100 °C como producto de la reacción de Maillard (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018). Sin embargo, el color es más intenso con el pretratamiento alcalino indicando una mayor concentración de melanoidinas. Wang, et al., (2011) describe a las melanoidinas como compuestos nitrogenados de color café – marrón que son producidas en una reacción de pardeamiento no enzimática llamada Maillard. Esta reacción ocurre entre los grupos funcionales carbonilos de los azúcares reductores y el grupo funcional amino de los aminoácidos, péptidos o proteínas. En el caso de los pretratamientos con NaOH 0.5% (p/p) también se observó una consistencia gelatinosa en los hidrolizados que posiblemente se debió a que las proteínas se solubilizaron y se favoreció la saponificación de los lípidos en el medio alcalino (Parthiba Karthikeyan *et al.*, 2018).



Figura 4.3. Muestras de desperdicios de alimentos con NaOH/H₂SO₄ antes de someter a pretratamiento térmico en autoclave.



Figura 4.4. Muestras de desperdicios de alimentos después del pretratamiento termoquímico.

La razón por la que se identificaron más azúcares reductores en el pretratamiento ácido con H₂SO₄ 2% (p/p) se debe a la forma en que actúa un medio ácido con los azúcares es a través de una reacción de hidrólisis. La hidrólisis en las cadenas de oligosacáridos/polisacáridos presentes en los residuos de alimentos se lleva a cabo como se observa en la Figura 4.5 para obtener monosacáridos. El hidrógeno del ácido protona al oxígeno del carbono anomérico de la molécula del azúcar (glucosa). El grupo hidroxilo queda con una carga positiva que puede dejar a la molécula del azúcar separada del resto, es decir, se rompe el enlace glucosídico y finalmente se reemplaza el grupo hidroxilo de la molécula del agua liberando un ión de H⁺ (Solomon y Fryhle, 2011).

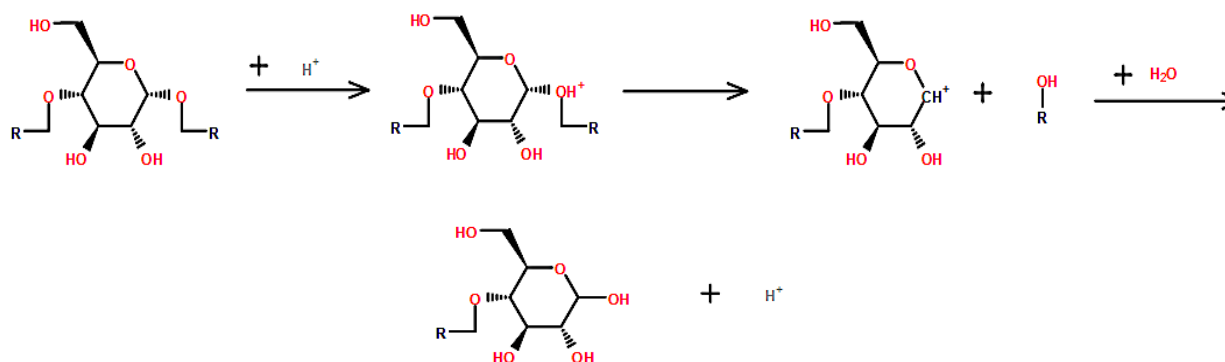


Figura 4.5 Reacción de una hidrólisis ácida en azúcares.

4.3 Pretratamiento Ácido Diluido.

El pretratamiento se realizó de acuerdo al diseño experimental mostrado en la metodología. Los resultados de azúcares recuperadas, determinadas por DNS yHPLC se muestran en la Tabla 4.5. Para el caso de los resultados con DNS, la concentración inicial de azúcares fue de 21 g/L, equivalente a 1.2 g de azúcar y de acuerdo a la Tabla 4.5, la mayor cantidad de azúcares se obtienen con una concentración de ácido H_2SO_4 1% (p/p) por 30 minutos.

Tabla 4.5. Cuantificación de azúcares por DNS y HPLC de cada uno de los experimentos.

No.	Tiempo (min)	H ₂ SO ₄ (% p/p)	DNS		HPLC	
			g/L	g de azúcar obtenidos	g/L	g de azúcar obtenidos
1	0	0	8	0.6	10	0.7
2	0	0	10	0.7	9	0.6
3	0	0	8	0.6	9	0.7
4	60	0	9	0.6	10	0.7
5	60	0	9	0.6	10	0.7
6	60	0	9	0.6	10	0.7
7	30	1	27	1.5	19	1
8	30	1	27	1.5	28	1.5
9	30	1	28	1.5	20	1
10	0	2	24	1.3	25	1.4
11	0	2	25	1.5	25	1.5
12	0	2	23	1.3	25	1.3
13	60	2	25	1.4	31	1.7
14	60	2	25	1.4	29	1.6
15	60	2	27	1.5	30	1.7

Estadísticamente, de acuerdo con el análisis del diseño, en el caso de DNS se obtuvieron los valores de los coeficientes, $\beta_0 = 8.667$, $\beta_1 = 0.7056$, $\beta_2 = 7.667$, $\beta_3 = -0.011667$, $\beta_4 = 0.01111$ y la ecuación:

$$Y = 8.667 + 0.7056X_2 + 7.667X_1 - 0.011667X_2^2 + 0.01111X_1X_2$$

Los resultados mostraron un valor de R^2 para una máxima recuperación de azúcares del 99.23%. Para el caso de los valores obtenidos por HPLC, el análisis del diseño, mostró los valores de los coeficientes, $\beta_0 = 9.33$, $\beta_1 = 0.272$, $\beta_2 = 7.5$, $\beta_3 = -0.00435$, $\beta_4 = 0.0417$ y la ecuación:

$$Y = 9.33 + 0.272X_2 + 7.5X_1 - 0.004357X_2^2 + 0.0417X_1X_2$$

Para este caso, los resultados mostraron un valor de R^2 94.9%. La correlación entre las dos variables se puede observar en las gráficas de superficie de respuesta correspondientes, Figura 4.6 – 4.7. Tanto el tiempo como la concentración de H₂SO₄ tienen un efecto significativo sobre la concentración de azúcares reductores.

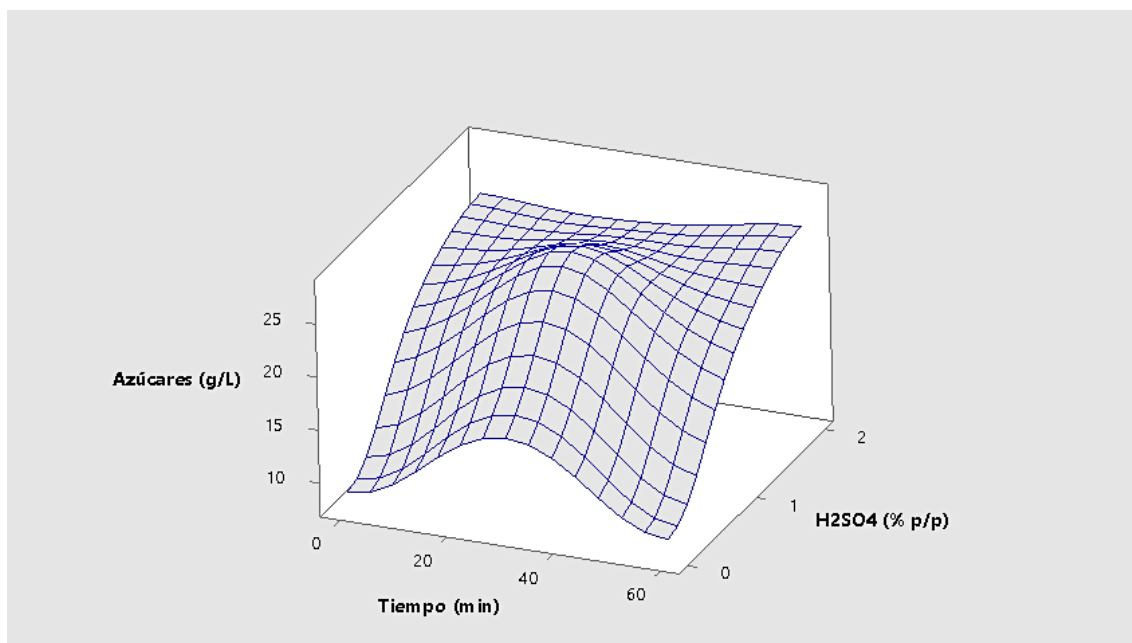


Figura 4.6. Gráfica de superficie de concentración de azúcares Vs. Ácido, Tiempo. Resultados DNS.

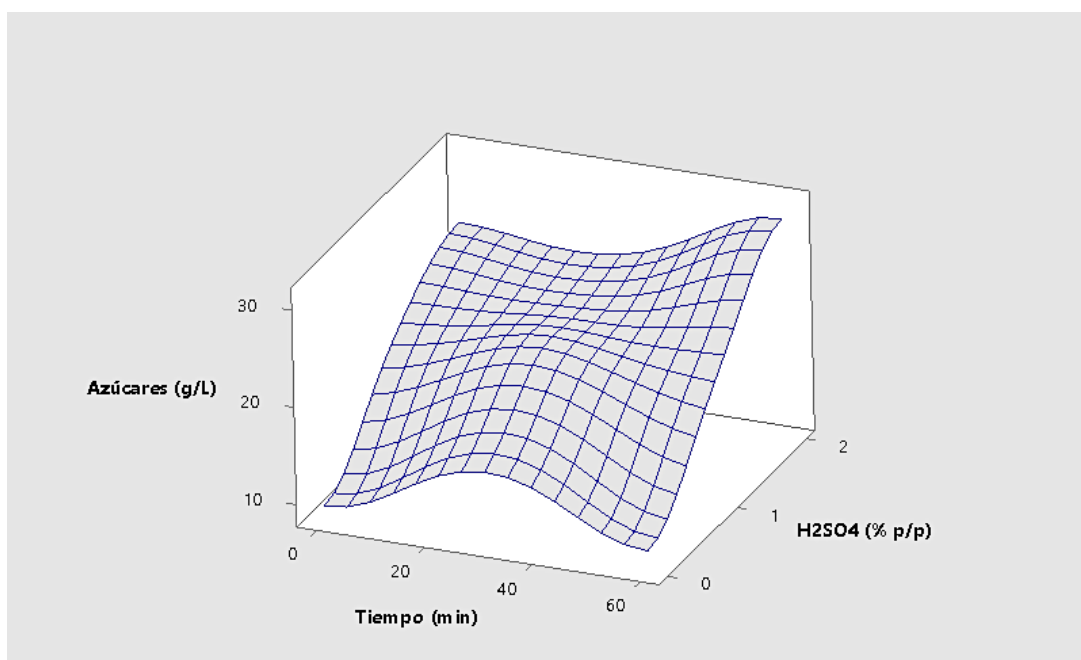


Figura 4.7. Gráfica de superficie de concentración de azúcares Vs. Ácido, Tiempo. Resultados HPLC.

Las corridas donde se obtuvieron bajas concentraciones de azúcares reductores puede deberse a la conversión de los azúcares a otros productos de inhibición del proceso de fermentación como lo son los furfurales u otros ácidos orgánicos.

Los valores óptimos de X_1 y X_2 bajo las condiciones de 121 °C en autoclave y 15 psi, para los casos de DNS y HPLC, concentración de H_2SO_4 1.6% (p/p) y 31 minutos; concentración de H_2SO_4 2% (p/p) y 41 minutos, respectivamente. El punto óptimo obtenido para DNS, confirma lo observado en la gráfica de la Figura 4.6, el punto para obtener la mayor cantidad de azúcares reductores se encuentra dentro del área de estudio, entre 25 y 35 minutos, con una concentración de ácido entre 1% y 2% (p/p). De acuerdo con los resultados de la caracterización, para la carga de licuado pretratado, la concentración máxima teórica de azúcares esperada es de 32 g/L, por ellos, las condiciones óptimas fueron establecidas para obtener dicha concentración de azúcares. Las diferencias observadas entre los datos obtenidos por DNS y HPLC se deben a que en este caso con el método de DNS se cuantificaron todos los azúcares reductores contenidos en las muestras, mientras que con el método de HPLC sólo se identificaron y cuantificaron sacarosa, glucosa, arabinosa y fructosa, Tabla 4.6. La concentración inicial de azúcares fue de 26.8 g/L, que equivale a 1.6 g de azúcares, en su mayoría glucosa.

Tabla 4.6. Identificación de azúcares en cada tratamiento por HPLC.

No.	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Total de azúcares (g/L)
Control	3.4	19.8	0	3.6	26.8
1	0.9	4.4	0	4.5	9.8
2	0	4.3	0	4.4	8.7
3	0.9	4	0	4.1	9
4	0.9	4.2	0	4.6	9.7
5	0.9	4.2	0	4.4	9.5
6	1	4.4	0	4.7	10.1
7	0	16.8	1.9	0	18.7
8	0	19.2	2	6.6	27.8
9	0	18.2	2	0	20.2
10	0	17.6	2.2	5.4	25.2
11	0	18.5	2.2	4.6	25.3
12	0	15.3	2	5.1	22.4
13	0	29.1	2.5	0	31.6
14	3.6	22.5	2.3	0	28.4
15	0	26.7	2.3	1.3	30.3

En esta misma tabla, se observa que las muestras que no contienen ácido, son las que muestran mayores cantidades de sacarosa, mientras que conforme las muestras son sometidas al ácido (1–2%) la concentración de sacarosa disminuye y se presentan mayores cantidades de glucosa principalmente; indicando así una hidrólisis.

Por el contrario, para el caso de la fructosa; los pretratamientos con ausencia de ácido o tiempo presentan mayor cantidad que los pretratamientos con ácido. Debido a que bajo condiciones ácidas y temperatura, la fructosa tiende a deshidratarse y transformarse en hidroximetilfurfural (Watanabe *et al.*, 2005).

La mejor correlación se obtuvo con los datos por DNS que por HPLC, por lo que los hidrolizados óptimos de desperdicios de alimentos fueron tratados bajo las condiciones de H₂SO₄ 1.6% (p/p) y 31 minutos, Figura 4.8. La concentración de azúcares reductores en los hidrolizados por DNS fue de 31.5 g/L de los 32 g/L teóricos

Esto significa un 50% más de azúcares comparado con los desperdicios de alimentos sin pretratamiento. Por HPLC en los hidrolizados se identificó: glucosa (19.38 g/L), fructosa (1.11 g/L) y arabinosa (2.06 g/L).



Figura 4.8. Hidrolizado de desperdicios de alimentos empleados en este trabajo.

4.4 Producción de *D* - Ácido Láctico.

La mayoría de las bacterias ácido lácticas no son capaces de utilizar xilosa como fuente de carbono, sin embargo, *E. coli* es capaz de metabolizarla para producir diversos bioproductos, incluyendo el ácido láctico (Orencio-Trejo *et al.*, 2010). Las rutas metabólicas que se conocen para transportar la xilosa en *E. coli* son dos: i) transportadores ABC codificados por los genes *xylF*, *xylG* y *xylH*, mostrando bajos rendimientos debido al consumo de dos ATP; ii) simportador de protones/xilosa codificado por el gen *xylE* (Sumiya *et al.*, 1995). Por lo anterior, la cepa *E. coli* JU15 fue producida a partir de la cepa *Escherichia coli* CL3. CL diseñada para producir D-lactato eliminando los genes *pflB*, *adhE* y *frdA* de la cepa *Escherichia coli* MG1655. CL3 es capaz de crecer en condiciones anaerobias utilizando xilosa como única fuente de carbono, sin embargo, esta cepa tiene las desventajas de mostrar una baja velocidad de crecimiento y productividad de ácido láctico utilizando glucosa como fuente de carbono, con respecto

a los evidenciados. Por lo tanto, la cepa JU1 fue desarrollada eliminando los genes *xylF*, *xylG* y *xylH*, correspondientes al transportador de xilosa dependiente de ATP, mostrando un incremento en la velocidad de crecimiento del 50%. Para mejorar las desventajas de la velocidad de crecimiento y la productividad del lactato mostradas en la cepa JU1, se desarrollaron diversas series utilizando la técnica de adaptación evolutiva. La 15va transferencia fue la que mostró las mejores condiciones de crecimiento y productividad, por lo que fue nombrada JU15. Los genes encargados de utilizar la xilosa como fuente de carbono en la cepa JU15 son *GatC* y *GatCS184L*, lo que la convierte en una cepa que puede ser utilizada con hidrolizados de material lignocelulósico como materia prima. Estas modificaciones le dan la capacidad a la cepa JU15 de metabolizar pentosas y hexosas como fuentes de carbono presentes en hidrolizados para la producción de ácido láctico (Parra-Ramírez *et al.*, 2018). La cepa JU15 ha sido probada en hidrolizados del bagazo azúcar de caña y rastrojo de maíz (Utrilla *et al.*, 2016).

4.4.1 Fermentación del Hidrolizado Simulado (AM1) Suplementado con Glucosa, Fructosa y Arabinosa con *E. coli* JU15.

Se ha demostrado que la velocidad de crecimiento, la productividad y el rendimiento de la cepa JU15, se ven favorecidas al utilizar el medio mineral AM1 (Utrilla *et al.*, 2012). Para poder comprobar que la cepa es capaz de utilizar glucosa, fructosa y arabinosa como fuentes de carbono, se utilizó un hidrolizado simulado con esta mezcla de azúcares, a concentraciones iniciales de 24.37 g/L, 5.26 g/L y 2.22 g/L, respectivamente; Figura 4.9. Esta composición de azúcares fue la que se identificó por HPLC en los pretratamientos del diseño de experimentos de este trabajo. Se encuentran reportados la presencia de glucosa y fructosa en hidrolizados de desperdicios de alimentos (Demichelis *et al.*, 2017; Hafid *et al.*, 2015).



Figura 4.9. Fermentaciones en medio mineral AM1 adicionado con glucosa fructosa y arabinosa (hidrolizado simulado).

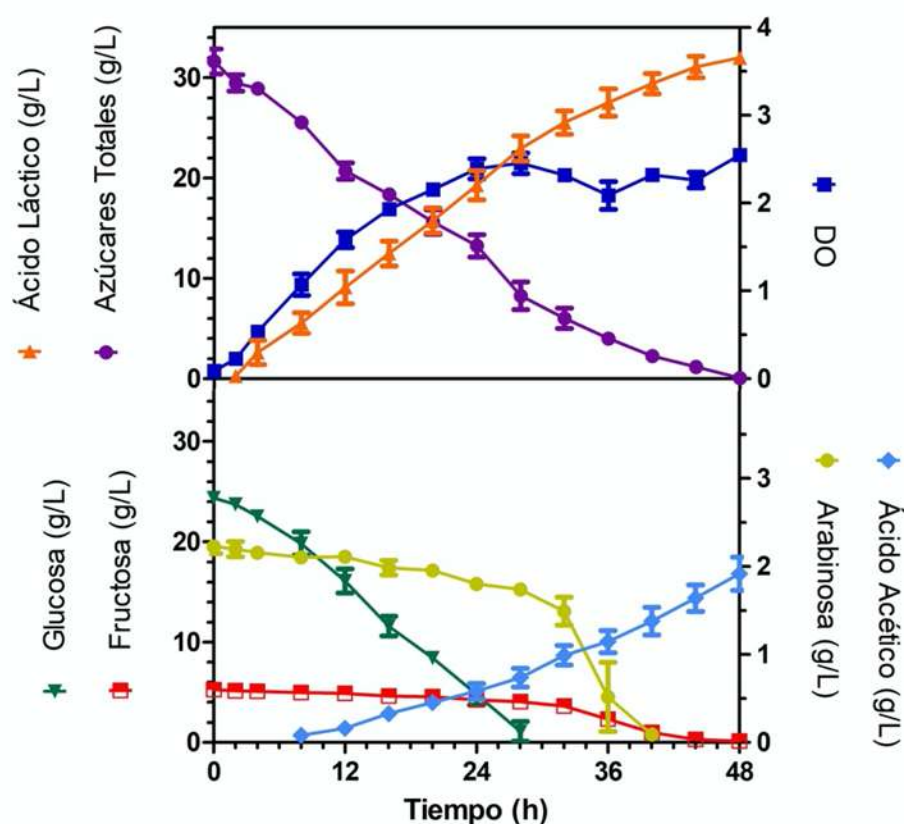
Los resultados de las fermentaciones mostrados en la Figura 4.10, indican que la cepa JU15 es capaz de producir ácido láctico a partir de esta mezcla de azúcares. La velocidad específica de crecimiento fue de $0.38 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ y la velocidad volumétrica de producción de D – ácido láctico de $0.7 \text{ (g}_{D-AL}/L \cdot h)$, Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo, velocidad específica de producción, velocidad volumétrica de producción, rendimiento de ácido láctico y rendimiento de biomasa de la cepa JU15 en hidrolizado simulado.

Hidrolizado	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})	Velocidad específica de consumo (g azúcares totales / g biomasa h)	Velocidad específica de producción (g AL / g biomasa h)	Velocidad volumétrica de producción (g AL / L h)	Rendimiento de ácido láctico (g AL / gazúcares totales)	Rendimiento de biomasa (g biomasa / g azúcares totales)
Simulado	0.38 ± 0.062	0.86 ± 0.006	1.29 ± 0.085	0.7 ± 0.038	0.93 ± 0.029	0.079 ± 0.004

Además de producir D-ácido láctico, la cepa también produce pequeñas cantidades de ácido acético. El ácido acético fue producido (1.91 g/L) durante la fase de crecimiento exponencial y estacionaria, como lo reportan Utrilla *et al.*, (2016, 2012). Los

azúcares totales se consumieron durante 48 h. La cepa mostró una preferencia por la glucosa ya que fue consumida a las 28 horas, mientras que la arabinosa (pentosa) se agotó a las 40 horas, siendo la fructosa (hexosa) la última en ser consumida a las 48 horas. A pesar de que la fructosa es una hexosa la cepa mostró preferencia por la arabinosa, está posiblemente debido a que la concentración de la arabinosa fue mayor. Después de 48 horas de fermentación se obtuvieron 30.95 g/L de D - ácido láctico con un rendimiento de $0.93 \text{ } g_{D-AL}/g_{\text{azúcares totales}}$ (Figura 4.10) coincidiendo con lo reportado bajo condiciones de fermentación similares en medio simulado con una mezcla de xilosa, glucosa y arabinosa ($0.94 \text{ } g_{D-AL}/g_{\text{azúcares totales}}$) (Utrilla et al., 2016).



$$Y_{D-AL}(g_{D-AL}/g_{\text{azúcares totales}}) = 0.93 \pm 0.081$$

$$Q_{D-AL}(g_{D-AL}/L \cdot h) = 0.70 \pm 0.039$$

Figura 4.10. Cinéticas de fermentación con la cepa JU15. Hidrolizado de desperdicios de alimentos simulado: medio mineral AM1 adicionado con glucosa, fructosa y arabinosa: 24.37 g/L, 5.26 g/L y 2.22 g/L, respectivamente.

4.4.2 Fermentación del Hidrolizado de Desperdicios de Alimentos con *E. coli* JU15.

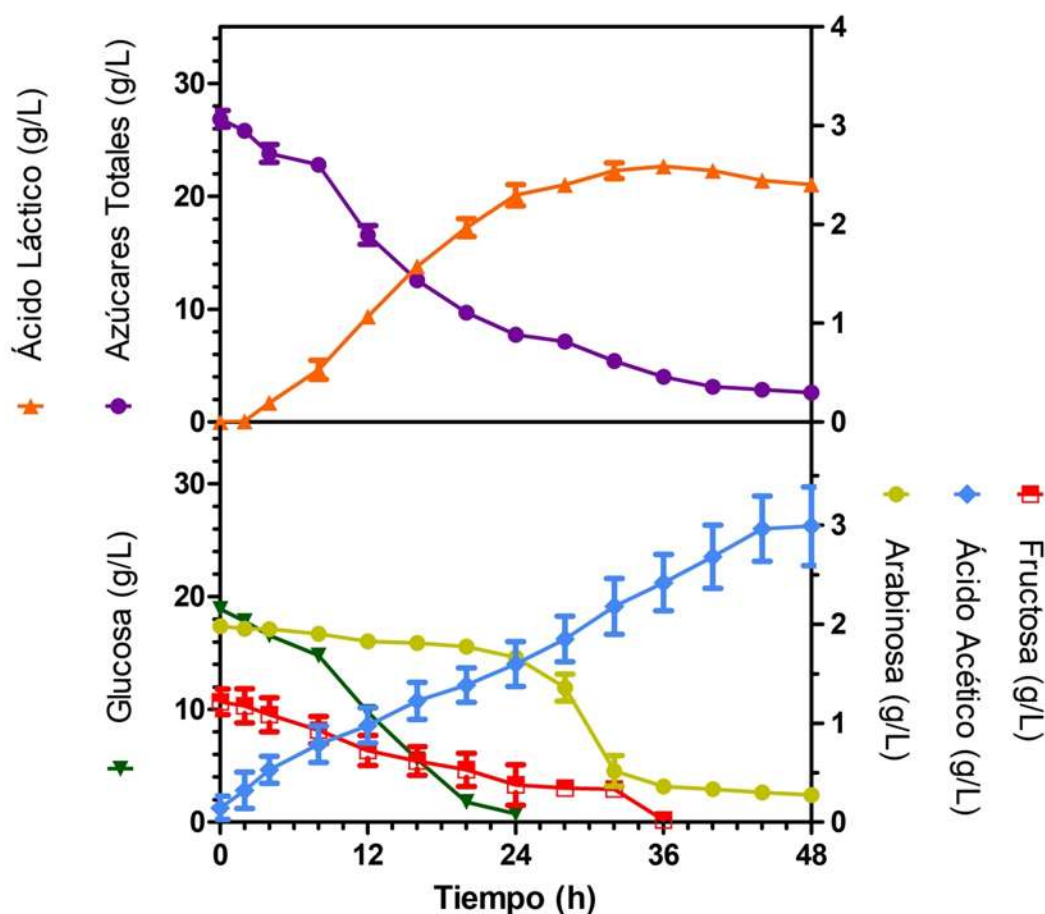
Esta cepa no ha sido probada anteriormente en hidrolizados de desperdicios de alimentos. Para poder utilizar el hidrolizado de los desperdicios de alimentos con mejores condiciones de crecimiento para la cepa JU15, se adicionó medio mineral AM1. La concentración inicial de azúcares totales del hidrolizado de desperdicios de alimentos disminuyó de 31.5 g/L a 26.85 g/L. Se cuantificaron las concentraciones de glucosa, fructosa y arabinosa, 18.89 g/L, 1.21 g/L y 1.97 g/L, respectivamente, Figura 4.11.



Figura 4.11. Fermentaciones en hidrolizado de alimentos complementado con medio mineral AM1.

La Figura 4.12 muestra los resultados de las fermentaciones durante 48 h, donde se observa que la cepa JU15 es capaz de producir ácido láctico (21.04 g/L) a partir de este hidrolizado de desperdicios de alimentos. Adicional a la producción de ácido láctico, también se observó la presencia de ácido acético, con una concentración final de 2.98 g/L. Después de que la glucosa se agotó completamente (24 h), se observó que la cepa tuvo una preferencia por la fructosa (36 h) que es también una hexosa, mientras que una pequeña concentración de arabinosa (0.27 g/L) permaneció a las 48 h. De esta manera

se demuestra que la cepa JU15 es capaz de consumir fructosa (hexosa) como fuente de carbono y que tiene una mayor preferencia por este azúcar sobre la arabinosa (pentosa) en este tipo de hidrolizado. Es importante mencionar, que no hay antecedentes publicados acerca del consumo de fructosa por la cepa JU15. El rendimiento del D – ácido láctico se basó sólo en el consumo de glucosa, fructosa y arabinosa, por lo que mostró un rendimiento más alto que el teórico, $1.12 \text{ } g_{D-AL}/g_{\text{azúcares totales}}$. El 12% de rendimiento en exceso podría deberse al consumo de los azúcares que no fueron identificados ni cuantificados.



$$Y_{D-AL}(g_{D-AL}/g_{\text{azúcares totales}}) = 1.12 \pm 0.28$$

$$Q_{D-AL}(g_{D-AL}/L \cdot h) = 0.47 \pm 0.022$$

Figura 4.12. Cinéticas de fermentación con la cepa JU15. Hidrolizado de desperdicios de alimentos complementado con medio mineral AM1.

La velocidad volumétrica de producción de D – ácido láctico fue de $0.47 \text{ (g}_{D-AL}/L \cdot h)$. Esta velocidad de producción es mucho menor que las reportadas en otros trabajos de producción de ácido láctico a partir de desperdicios de alimentos: $2.61 \text{ (g}_{AL}/L \cdot h)$ (Kwan *et al.*, 2016); $1.01 \text{ (g}_{AL}/L \cdot h)$ (Kwan *et al.*, 2011) y $3.38 \text{ (g}_{AL}/L \cdot h)$ (Demichelis *et al.*, 2017). Por otro lado, el valor de la productividad más bajo se reportó ($0.28 \text{ g}_{AL}/L \cdot h$) para el caso de la producción de ácido láctico utilizando un consorcio microbiano (Tang *et al.*, 2016). La baja productividad en este caso podría ser atribuida a la presencia de furanos y compuestos fenolicos (Martinez *et al.*, 2000) que no fueron identificados ni cuantificados en este trabajo.

Es importante mencionar que a las 24 h se observó la máxima producción de ácido láctico en el simulado real ($0.84 \text{ g}_{AL}/L \cdot h$), este valor se encuentra por encima del obtenido para el caso del hidrolizado simulado a las 24 h y 48 h, $0.7(\text{g}_{AL}/L \cdot h)$, para ambos casos (Figura 4.13). Esto se debe a que en el caso del hidrolizado real después de las 24 horas ya no hubo producción de ácido láctico como se puede observar en la Figura 4.12; mientras que en el caso del hidrolizado simulado, la producción de ácido láctico se mantuvo durante las 48 horas en las que se monitoreo la fermentación.

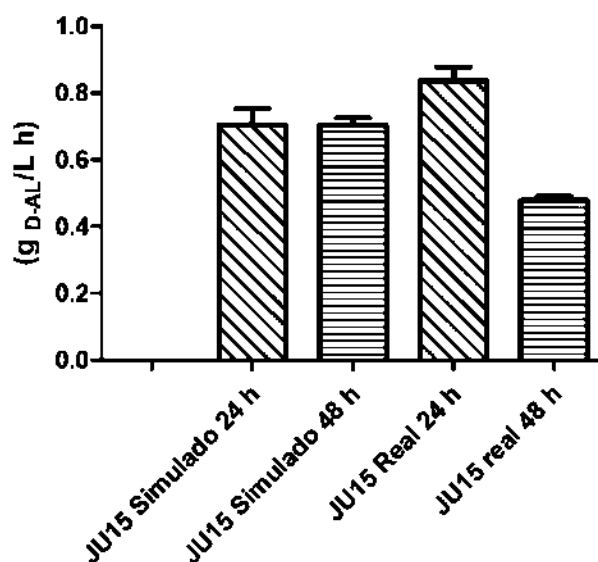


Figura 4.13. Velocidad volumétrica de producción de D – ácido láctico a 24 h y 48 h.

CONCLUSIONES

- El 71% de los desperdicios de alimentos que se recuperaron fueron alimentos no comestibles, principalmente cáscaras de frutas y verduras. Siendo de esta manera no ser aptos para consumo humano. Para lo cual en este trabajo se propuso su valorización a través de la obtención de un bioproducto, descartando su reciclaje en un proceso de composta, digestión anaerobia o de pirólisis.
- El 54% peso seco de los desperdicios de alimentos esta constituido de azúcares totales. Coincidiendo con las concentraciones reportadas en diversas bibliografías para ser utilizados en la obtención de diversos bioproductos.
- Las condiciones óptimas para una máxima recuperación de azúcares reductores se encontraron utilizando un Diseño Central Compuesto: H_2SO_4 1.6% (p/p) y 31 minutos, utilizando una autoclave a una temperatura de 121°C y 15 psi.
- De acuerdo a las cinéticas realizadas se observó que la cepa JU15 tiene la capacidad de producir ácido láctico utilizando hidrolizados de desperdicios de alimentos, mostrando una máxima velocidad de producción de ácido láctico a las 24 horas de $0.84 \text{ g}_{AL}/L \cdot h$. Además, se notó que la cepa JU15 puede consumir la fructosa utilizándola como fuente de carbono.

REFERENCIAS

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., y Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093
- Ábrego, U., Chen, Z., y Wan, C. (2017). Consolidated Bioprocessing Systems for Cellulosic Biofuel Production. *Advances in Bioenergy*, 143–182. doi:10.1016/bs.aibe.2017.01.002
- Ahmad, R. S., Imran, A., & Hussain, M. B. (2018). Nutritional Composition of Meat. *Meat Science and Nutrition*.
- Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Management*, 36, 147–155. doi:10.1016/j.wasman.2014.11.019
- Ariunbaatar, J., Panico, A., Esposito, G., Pirozzi, F., y Lens, P. N. L. (2014). Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Applied Energy*, 123, 143–156. doi:10.1016/j.apenergy.2014.02.035
- Ballesteros, M., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., y Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39(12), 1843–1848. doi:10.1016/j.procbio.2003.09.011
- Benninga, H. (1990). *A history of lactic acid making: A chapter in the history of biotechnology*. Países bajos: Springer Science & Business Media.
- Burke, D. G., Cotter, P. D., Ross, R. P., y Hill, C. (2013). Microbial production of bacteriocins for use in foods. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*, 353–384. doi:10.1533/9780857093547.2.353
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., Dominguez, J. M. (2004). Production of fermentable media from vinetrimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), 466 - 472.
- Carlsson, M., Lagerkvist, A., y Morgan-Sagastume, F. (2012). The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management*, 32(9), 1634–1650. doi:10.1016/j.wasman.2012.04.016

- Cheng, J., Yue, L., Hua, J., Dong, H., Zhou, J., & Li, Y.-Y. (2020). Hydrothermal alkali pretreatment contributes to fermentative methane production of a typical lipid from food waste through co-production of hydrogen with methane. *Bioresource Technology*, 123164.
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., y Tomás-Pejó, E. (2018). Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 12 (2), 290–303.
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., y Tomás-Pejó, E. (2018). Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 12 (2), 290–303.
- Cui, F., Li, Y., y Wan, C. (2011). Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1831–1836. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.063
- Datta, R. & Henry, M. (2006). Lactic Acid: Recent Advances in Products, Processes and Technologies -a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 81, pp. 1119-1129.
- Demichelis, F., Pleissner, D., Fiore, S., Mariano, S., Navarro Gutiérrez, I. M., Schneider, R., & Venus, J. (2017). Investigation of food waste valorization through sequential lactic acid fermentative production and anaerobic digestion of fermentation residues. *Bioresource Technology*, 241, 508–516.
- Ding, S., y Tan, T. (2006). L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41(6), 1451–1454.
- Fan, Y., Zhou, C., y Zhu, X. (2009). Selective Catalysis of Lactic Acid to Produce Commodity Chemicals. *Catalysis Reviews*, 51(3), 293 – 324. doi:10.1080/01614940903048513
- Galbe, M. and Zacchi, G. (2007) Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 41-65.
- Gao, C., Ma, C., y Xu, P. (2011). Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29(6), 930 – 939. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.022
- Giroto, F., Alibardi, L. y Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: a review. *Waste Management*, vol. (45), pp. 32-41.

- Groot, W, Krieken, J. Sliekersl, O. Y De Vos, S. (2010). Chemistry and Production of Lactic Acid, Lactide, and Poly (Lactic Acid). John Wiley & Sons, Inc. (Ed.), *Poly (Lactic Acid) Synthesis, structures, properties, processing, and application* pp. (3-16). Hoboken, New Jersey, USA: Wiley.
- Guntupalli, M.P., Bhattacharyya, D. (2007). Recovery of Reducing Sugar from Food Waste: Optimization of Pretreatment Parameters Using Response Surface Methodology. En: Suresh, S., Kumar, A., Shukla, A., Singh, R., Krishna, C. (Eds.), *Biofuels and Bioenergy (BICE2016). Springer Proceedings in Energy Springer*, Cham, pp. 161–172.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R. y Meybeck, A., (2011). "Global food losses and food waste. Extent, causes and prevention". Roma, Italia.
- Hafid, H. S., Rahman, N. A., Md Shah, U. K., y Baharudin, A. S. (2015). Enhanced fermentable sugar production from kitchen waste using various pretreatments. *Journal of Environmental Management*, 156, 290–298. doi:10.1016/j.jenvman.2015.03.045
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. doi:10.1016/j.rser.2013.06.033
- Hanc, A., Novak, P., Dvorak, M., Habart, J., Svehla, P., 2011. Composition and parameters of household bio-waste in four seasons. *Waste Manage.* 31, 1450– 1460.
- Herryman Munilla, M., y Blanco Carracedo, G. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, vol. 39 (1), pp. 49-59.
- Hodges, R. J., Buzby, J. C. y Bennett, B. (2010). Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: opportunities to improve resource use. *Journal of agricultural science*, vol. (149), pp. 37-45.
- Hofvendahl, K. y Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factor Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. (26), pp. 87-107.
- Holten, C. H., Müller, A., y Reh binder, D. (1971). Lactic Acid. *Verlag Chemie, Weinheim*.
- Hu, C. C., Giannis, A., Chen, C.-L., & Wang, J.-Y. (2014). Evaluation of hydrogen producing cultures using pretreated food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19337–19342.

- Hujanen, M., y Linko, Y. Y. (1996). Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)- lactic acid production by *Lactobacillus Casey*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 45 (3), pp. 307-313. doi:10.1007/s002530050688
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., y Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 524 – 534. doi:10.1007/s00253-006-0779-6
- Krishna, B. S., Nikhilesh, G. S., Tarun, B., V., N., Gopinadh, R. (2018). Industrial production of lactic acid and its applications. *International Journal of Biotech Research*, 1(1), 42 - 54.
- Kumar, S. (2012). *Textbook of microbiology*. Nueva Delhi, India. Jaypee brothers medical publishers.
- Kwan, T. H., Hu, Y., & Lin, C. S. K. (2016). Valorisation of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. *Bioresource Technology*, 217, 129–136.
- Lee, J., Lee, S. Y., Park, S., y Middelberg, A. P. J. (1999). Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Advances*, 17(1), 29–48. doi:10.1016/s0734-9750(98)00015-9
- Leung, C.C.J., Cheung, A.S.Y., Zhang, A.Y., Lam, K.F., Lin, C.S.K., 2012. Utilisation of waste bread for fermentative succinic acid production. *Biochem. Eng. J.* 65, 10– 15.
- Li, P., Zeng, Y., Xie, Y., Li, X., Kang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Xie, T., y Zhang, Y. (2017). Effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of kitchen waste for xanthan production. *Bioresource Technology*, 223, 84–90. doi:10.1016/j.biortech.2016.10.035
- Li, X., Kim, T. H., y Nghiem, N. P. (2010). Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresource Technology*, 101(15), 5910–5916. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.015
- Lichfield, J. (1996). Microbial production of lactic acid. *Applied Microbiology*, vol. 42, pp. 45-95.
- Litchfield, J. H. (2009). Lactic acid, microbially produced. En: SchaechterMosel O., editor. *Encyclopedia of microbiology*. Oxford: Academic Press; p. 362 - 372.
- Liu, X., Wang, W., Gao, X., Zhou, Y., y Shen, R. (2012). Effect of thermal pretreatment on the physical and chemical properties of municipal biomass waste. *Waste Management*, 32(2), 249–255.

- Marin, J., Kennedy, K. J., y Eskicioglu, C. (2010). Effect of microwave irradiation on anaerobic degradability of model kitchen waste. *Waste Management*, 30(10), 1772–1779. doi:10.1016/j.wasman.2010.01.033
- Martinez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K. Martinez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O., 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol. Lett.* 29, 397–404.
- Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O., 2000. Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 526–536.
- Martínez, V. y García, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. *Dirección General de Investigación y Desarrollo, Armada Argentina*. doi: 10.13140/RG.2.1.2415.9844
- Marulanda, V. A., Gutierrez, C. D. B., y Alzate, C. A. C. (2019). Thermochemical, Biological, Biochemical, and Hybrid Conversion Methods of Bio-derived Molecules into Renewable Fuels. *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts*, 59–81. doi:10.1016/b978-0-12-817941-3.00004-8
- Matharu, A. S., de Melo, E. M., y Houghton, J. A. (2016). Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes. *Bioresource Technology*, 215, 123–130. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.039
- Moon, H. C., Song, I. S., Kim, J. C., Shirai, Y., Lee, D. H., Kim, J. K., Chung, S. O., Kim, D. H., Oh, K. K., y Cho, Y. S. (2009). Enzymatic hydrolysis of food waste and ethanol fermentation. *International Journal of Energy Research*, 33(2), 164–172. doi:10.1002/er.1432
- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee Y. Y, Holtzapple M. y Ladisch M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96 (6), 673–86. doi:10.1016/j.biotech.2004.06.025
- Narayanan, N., Roychoudhury, P., y Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2).
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., y Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 413 – 423. doi:10.1007/s00253-009-2280-5

Orencio-Trejo, M., Utrilla, J., Fernández-Sandoval, M.T., Huerta-Beristain, G., Gosset, G., Martinez, A., 2010. Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 121, 71–107.

Pachapur, V. L., Sarma, S. J., Brar, S. K., y Chaabouni, E. (2016). *Platform Chemicals. Platform Chemical Biorefinery*, 1–20.

Papargyropoulou, E., Lozano, R., Steinberger, J. K., Wright, N. Y Ujang, Z. (2014). The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *Journal of Cleaner Production*, vol. (30), pp. 1-10.

Parra Huertas, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuarios y Agroindustrial*, 8(1), 93 - 105.

Parra-Ramírez, D., Martínez, A., y Ariel Cardona, C. (2018). Lactic acid production from glucose and xylose using the lactogenic *Escherichia coli* strain JU15: Experiments and techno-economic results. *Bioresource Technology*.

Parthiba Karthikeyan, O., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J. W. C., y Carrere, H. (2018). Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. *Bioresource Technology*, 249, 1025–1039. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.105

Pfaltzgraff, L. A., De Bruyn, M., Cooper, E. C., Budarin, V., y Clark, J. H. (2013). Food waste biomass: a resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*. RSC Publishing. doi: 10.1039/c2gc36978h

Pleissner, D., Kwan, T.H., Lin, C.S., 2014. Fungal hydrolysis in submerged fermentation for food waste treatment and fermentation feedstock preparation. *Bioresour. Technol.* 158, 48–54.

Sara, M., Brar, S. K., y Blais, J. F. (2016). Production of Drop-In and Novel Bio-Based Platform Chemicals. *Platform Chemical Biorefinery*, 249–283. doi:10.1016/b978-0-12-802980-0.00014-6

Sarjahani, A., Serrano, E. L., y Johnson, R. (2009). Food and Non-Edible, Compostable Waste in a University Dining Facility. *Journal of Hunger & Environmental Nutrition*, 4(1), 95–102. doi:10.1080/19320240802706874

Savadogo, A., Cheik, O., Bassole, I., y Traore, A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5, 678 - 683.

- Schall, J., (1992). Does the Solid Waste management Hierarchy Make Sense? A technical, Economic and Environmental Justification for the Priority of Source Reduction and Recycling. Working paper #1, Program on Solid Waste Policy, Yale University.
- Sengupta, S., Das, P., y Datta, S. (2019). Fermentative Production of Optically Pure Lactic Acid From Renewable Materials. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.11012-4
- Serna C., L., Rodríguez de S., A., & Albán A., F. (2003). Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Ingeniería y Competitividad*, vol. 5 (1), pp. 16-26. doi:10.25100/iyv.v5i1.2301
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749.
- Silvennoinen, K., Heikkilä, L., Katajajuuri, J.-M., y Reinikainen, A. (2015). Food waste volume and origin: Case studies in the Finnish food service sector. *Waste Management*, 46, 140–145. doi:10.1016/j.wasman.2015.09.010
- Solomon, T.W.G., y Fryhle, C. B. Organic chemistry, 10th edition. 2011: John Wiley & Sons.
- Sumiya, M., Davis, E.O., Packman, L.C., McDonald, T.P., Henderson, P.J., 1995. Molecular genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene xylF, in *Escherichia coli*. *Receptors Channels* 3, 117–128.
- Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. doi:10.1016/s0960-8524(01)00212-7
- Taherzadeh, M.J. y Karimi, K. (2007). Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* 2, 707-738.
- Takagi M, Abe S, Suzuki S, Emert GH, Yata N. A method for production of ethanol directly from cellulose using cellulase and yeast. In: Ghose TK, editor. *Proceedings of Bioconversion Symposium, Delhi, 1977*. p. 551–71.
- Tang, J., Wang, X., Hu, Y., Zhang, Y., Li, Y., 2016. Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: effects of pH, temperature and high OLR. *Waste Manage.* 52, 278–285.
- Tang, Y.-Q., Koike, Y., Liu, K., An, M.-Z., Morimura, S., Wu, X.-L., & Kida, K. (2008). Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Biomass and Bioenergy*, 32(11), 1037–1045.

- Thi, N. B. D., Kumar, G. y Lin, C. Y. (2015). An overview of food waste management in developing countries: current status and future perspective. *Journal Environmental Management*, vol (157), pp. 220-229.
- Utrilla, J., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. K., & Martinez, A. (2012). Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for d-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic Engineering*, 14(5), 469–476.
- Wang, H.-Y., Qian, H., & Yao, W.-R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573–584.
- Wang, Q., Ma, H., Xu, W., Gong, L., Zhang, W., & Zou, D. (2008). Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 604–610.
- Wang, X., Wang, Q., Wang, X., Ma, H., 2011. Effect of different fermentation parameters on lactic acid production from kitchen waste by *Lactobacillus* TY50. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 25 (4), 433–438
- Watanabe, M., Aizawa, Y., Iida, T., Aida, T. M., Levy, C., Sue, K., & Inomata, H. (2005). Glucose reactions with acid and base catalysts in hot compressed water at 473K. *Carbohydrate Research*, 340(12), 1925–1930.
- Wyman, C. E. (1996). *Handbook on bioethanol: Production and utilization*. Washington, DC: Taylor & Francis.
- Xin, F., Dong, W., Dai, Z., Jiang, Y., Yan, W., Lv, Z., y Jiang, M. (2019). Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 207–232. doi:10.1016/b978-0-444-64085-7.00009-5
- Yang, T. C., Kumaran, J., Amartei, S., Maki, M., Li, X., Lu, F., y Qin, W. (2014). Biofuels and Bioproducts Produced through Microbial Conversion of Biomass. *Bioenergy Research: Advances and Applications*, 71–93. doi:10.1016/b978-0-444-59561-4.00005-x
- Zhang, A.Y., Sun, Z., Leung, C.C.J., Han, W., Lau, K.Y., Li, M., Lin, C.S.K., 2013. Valorisation of bakery waste for succinic acid production. *Green Chem.* 15 (3), 690–695.
- Wang, H.-Y., Qian, H., & Yao, W.-R. (2011). Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573–584.

Wang, Q., Ma, H., Xu, W., Gong, L., Zhang, W., & Zou, D. (2008). Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 604–610.

Wang, X., Wang, Q., Wang, X., Ma, H., 2011. Effect of different fermentation parameters on lactic acid production from kitchen waste by *Lactobacillus* TY50. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 25 (4), 433–438

Watanabe, M., Aizawa, Y., Iida, T., Aida, T. M., Levy, C., Sue, K., & Inomata, H. (2005). Glucose reactions with acid and base catalysts in hot compressed water at 473K. *Carbohydrate Research*, 340(12), 1925–1930.

Wyman, C. E. (1996). *Handbook on bioethanol: Production and utilization*. Washington, DC: Taylor & Francis.

Xin, F., Dong, W., Dai, Z., Jiang, Y., Yan, W., Lv, Z., y Jiang, M. (2019). Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 207–232. doi:10.1016/b978-0-444-64085-7.00009-5

Yang, T. C., Kumaran, J., Amartei, S., Maki, M., Li, X., Lu, F., y Qin, W. (2014). Biofuels and Bioproducts Produced through Microbial Conversion of Biomass. *Bioenergy Research: Advances and Applications*, 71–93. doi:10.1016/b978-0-444-59561-4.00005-x

Zhang, A.Y., Sun, Z., Leung, C.C.J., Han, W., Lau, K.Y., Li, M., Lin, C.S.K., 2013. Valorisation of bakery waste for succinic acid production. *Green Chem.* 15 (3), 690–695.

APÉNDICE 1. MÉTODO DE ESTIMACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS).

Reactivo DNS

Mezclar:

• Agua destilada	1416 ml
• 3, 5 - ácido dinitrosalicílico	10.6 gr
• NaOH	19.8 gr

Disolver lo anterior, y luego agregar:

• Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (sal de Rochelle)	306 gr
• Fenol (derretir a 50 °C)	7.6 ml
• Metabisulfito de sodio	8.3 gr

Curva Estándar

Estándar de glucosa: 2 g/L de glucosa

Procedimiento :

En tubos de cristal de 10 ml se adicionan 0.5 ml de muestra y 0.5 ml del reactivo de DNS. Los tubos se colocan en baño de agua a 100 °C por 5 min. Se enfrían en baño de agua a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente se añaden 5 ml de agua destilada. Se agita y se realiza la lectura a 540 nm en un espectrofotómetro.

Diluir las muestras en caso de ser necesario con el fin de que la transmisión de la luz en el espectrofotómetro sea entre 20% y 80%. Incluir estándar compuesto de glucosa y diluido como muestra.

Leer el absorbancia a 540 nm contra un blanco de DNS - agua a 100% T y graficar (absorbancia vs concentración).

Esta debería interceptar la absisa a 4 mg de glucosa. Los 4 mg representan la pérdida de glucosa por oxidación.

Para una determinación más exacta a bajas concentraciones agregar 0.1 g de glucosa a cada muestra. Las soluciones concentradas de azúcar deben diluirse de forma que las muestras contengan máximo 0.8 g/L de azúcares reductores.

Comentarios: Este método es no específico a un azúcar reductor. Si glucosa es usada como estándar, los valores de celobiosa serán 15% más bajos, y los valores de xilosa 15% más altos en peso base. Las muestras hervidas pueden ser dejadas un tiempo razonable antes de ser leídas . Las muestras no hervidas se deterioran gradualmente.

