

ÁCIDO LÁCTICO: UNA REVISIÓN SOBRE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN Y PURIFICACIÓN

LACTIC ACID: A REVIEW ON DETERMINATION AND PURIFICATION METHODS

María Guauque Torres ¹

Sandra Liliana Gómez

RESUMEN

La utilización de polímeros derivados del petróleo, aunque ha mejorado la calidad de vida, tiene un impacto ambiental considerable. Esto ha hecho que se busquen alternativas para el reemplazo de estos polímeros aprovechando fuentes renovables y teniendo presente que las reservas de petróleo son limitadas. Entre los precursores de polímeros biodegradables se encuentra el ácido láctico, el cual se puede obtener por síntesis química o por fermentación de materias primas renovables, siendo esta última opción la más empleada, pero, es difícil su recuperación y purificación debido principalmente a las impurezas que contiene la materia prima y a los productos de la ruptura celular. Debido a la importancia en la industria del ácido láctico, esta revisión se enfoca en las diferentes técnicas de separación: las más utilizadas y las más modernas haciendo énfasis en la cromatografía de intercambio iónico por su eficiencia. También, se hace una exploración de los métodos de cuantificación del mismo resaltando a los enzimáticos por su bajo costo, buena sensibilidad y reproducibilidad.

Palabras Clave: Ácido láctico, fermentación, cromatografía, oxidoreductasas.

ABSTRACT

Polymers derived from petroleum have improved the quality of life but also have a considerable environmental impact. For this reason, it is important to research new alternatives to replace these polymers using renewable sources and keeping in mind that oil reserves are limited. Lactic acid is one of the precursors of biodegradable polymers, which can be obtained by chemical synthesis or by fermentation of renewable raw materials. This last technique is the most used but, it is difficult to recover and purify due to impurities contained in raw material and by-products of cell breakdown. Due to the importance of the lactic acid industry, this review focuses on the different separation techniques: the most used and the most modern ones, emphasizing ion-exchange chromatography for its efficiency. Finally, the present review explores the methods of quantification and highlight the enzymatic ones by his low cost, good sensitivity, and reproducibility.

Keywords: Lactic acid, fermentation, chromatography, oxidoreductases.

¹ Contacto: pilar.guauque@unilibre.edu.co

1 INTRODUCCIÓN

En el último tiempo y debido a la preocupación por un medio ambiente más limpio, se ha tomado más en cuenta los postulados de la química verde para mejorar procesos con materias primas de fuentes renovables. Esto ha hecho más atractiva la producción microbiana de sustancias químicas y entre la gran cantidad que hay, los ácidos orgánicos tienen una importancia especial por ser claves en los diversos procesos que tienen lugar en las biorrefinerías. Sin embargo, los procesos microbianos son más costosos que los procesos de síntesis química y lo son a causa de las etapas de cuantificación del metabolito de interés y en especial de los procesos de separación y purificación, por lo que se encuentran múltiples esfuerzos de la comunidad internacional para mejorar el rendimiento de dichas etapas (1).

Desde que el petróleo tomó relevancia en la industria, la mayoría de las sustancias orgánicas provienen de materias primas derivadas de fuentes fósiles a través de diversas rutas de síntesis en las que es común apreciar rendimientos bajos y reactivos tóxicos. Como resultado de la escasez de fuentes fósiles y el desarrollo de la biorrefinería, las rutas biológicas que producen compuestos orgánicos se han vuelto cada vez más competitivas. Para comprender mejor esta nueva industria es necesario conocer su significado. Según la American National Renewable Energy Laboratory (NREL), “biorrefinería es una estructura productiva que integra procesos de conversión de biomasa y equipamiento adecuado para producir combustibles, energía y productos químicos de valor agregado” (2). Este concepto ayuda a explorar mejor la definición dada por la International Energy Agency (IEA): “una biorrefinería es el procesamiento sustentable de biomasa en un espectro de productos comercializables y energía” (3). Teniendo en cuenta lo anterior, es innegable el valor que han ido adquiriendo las fuentes renovables como la biomasa, ya que a partir de ella se puede obtener una variedad de productos como son los ácidos orgánicos, claves en la elaboración de nuevos materiales, y que son menos tóxicos para las células hospederas que los alcanos, aldehídos o alcoholes. Otra ventaja de los ácidos orgánicos tiene que ver con su naturaleza altamente oxidable ya que en su biosíntesis hay mayor economía atómica que para el caso de otros compuestos porque se forman co-productos como el adenosin trifosfato (ATP) y el trifosfopiridina nucleótido (NADPH) que pueden ser consumidos por los microorganismos (1).

Uno de los ácidos orgánicos con mayor interés hoy por hoy es el ácido láctico que fue encontrado por primera vez, analizando leche agria, por el químico sueco Karl Wilhelm Scheele en 1780 (4). Desde entonces la identificación y separación de ácido láctico es un tema de interés tanto para la industria alimenticia (producción de derivados lácteos, vinos y productos fermentados) (5,6) como para la industria farmacéutica (identificación de lactato en sangre) (7,8) y últimamente la polimérica usándolo como monómero para la producción de polilactato, un polímero biodegradable (9). La valoración del poder prebiótico de algunos alimentos implica la identificación de ácidos grasos de cadena corta como indicador de productos potencialmente promisorios, mientras que su presencia en otros productos

(fermentos) puede estar asociada con resultados no deseados en su valoración final; de igual forma que no se espera su presencia fuera de los rangos normales en el ámbito de la salud. Esta importancia del ácido láctico como indicador de otros procesos o como producto final se ve reflejada en la gran cantidad de protocolos y estrategias para su identificación, cuantificación, separación y purificación.

Los niveles normales de ácido láctico en sangre son 4.5-19.8mg/dL (0.5-2.2mmol/L) (7) mientras que los niveles esperados de ácido láctico en las aplicaciones industriales variarán con respecto a los casos particulares a ser analizados. Dado que el uso de ácido láctico como analito de interés ha ocupado el interés científico de más de una centuria, las tecnologías requeridas para su determinación, cuantificación, separación y purificación son múltiples. El criterio de selección de los artículos incluidos en la presente revisión estuvo orientado a buscar las mejores condiciones de trabajo con ácido láctico en matrices complejas que contienen otros ácidos y alcoholes orgánicos como posibles interferentes. Estas condiciones se presentan fácilmente en todos los procesos fermentativos en donde se pretende hacer un análisis inicial del metabolito de interés.

2 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

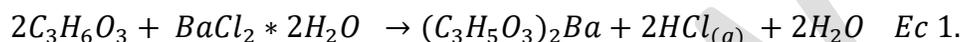
El proceso fermentativo de producción de ácido láctico debe ser optimizado en términos de las variables operativas para mejorar el crecimiento de microorganismos y la producción del metabolito de interés. Al mismo tiempo, la determinación (presencia/ausencia) y cuantificación (concentración) de ácido láctico, también debe ser optimizada como técnica analítica cuyo rango de linealidad y respuesta pueda ser reproducible y confiable. En la presente sección se hablará de algunas de estas técnicas con el objetivo de mostrar al lector desde las más sencillas hasta las más complejas.

2.1 Métodos gravimétricos y colorimétricos

Existen reportes de determinación cualitativa y cuantitativa de ácido láctico desde finales del S.XIX (1890). George Pease (1937) hace una revisión del problema de identificación del analito dado que los métodos colorimétricos usando reactivos como guayacol, tiofeno, resorcinol, pirocatecol (que identifican el aceltadehído proveniente de lactato) son cualitativos y aquellos que se acercan a la identificación de concentraciones (tiocianato de potasio o veratrol) pueden tener rangos de respuesta alejados de los rangos requeridos en aplicaciones particulares. El mismo autor, resume las problemáticas asociadas a la determinación del analito por titulometría toda vez que el proceso fermentativo genera ácidos orgánicos de concentración variable que podrían alterar el valor real de la cantidad de ácido láctico generado en dicho proceso. De esta forma plantea múltiples protocolos de determinación de ácido láctico teniendo en cuenta los adelantos científicos de su época (10). Vale la pena destacar sin embargo que para aplicaciones particulares como en la industria

láctea, la determinación de acidez (potenciometría y/o titulación) siguen siendo los métodos recomendados por la AOAC para su cuantificación y por ello, se siguen usando para nuevos desarrollos en un rango de determinación de 8.19-20.83g/L del analito (11).

Es por lo anteriormente expuesto que se plantea que la identificación de ácido láctico dentro de una matriz compleja (diferente a la industria láctea) que posee otros ácidos orgánicos y analitos posiblemente interferentes, supone un necesario proceso preliminar de separación para mejorar la sensibilidad de la prueba y con ello la cuantificación del mismo. Entre los métodos de separación, se plantea la reactividad con sales de Bario que permitan su identificación como Lactato de Bario siguiendo la reacción



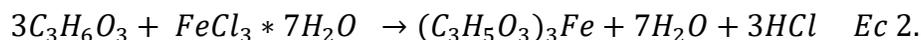
El proceso previo de separación parte del principio de solubilidad diferencial de las sales de bario (citratos, tartratos entre otras) en etanol (75%) y extracción de azúcares y otras sustancias insolubles por extracción con éter y destilación con vapor. El proceso mediado por la adición de hidróxido de bario fue postulado por Moslinger 1901 y modificado ligeramente años después. Por su parte, Kuns en 1901 hizo un procedimiento similar usando Ba(OH)₂ pero usando un posterior tratamiento con HCl y Na₂(SO₄) para finalmente pesar el precipitado de sulfato de bario y relacionarlo con la cantidad de láctico en el medio de reacción (10). El mismo autor plantea otros métodos para la determinación tales como la oxidación de láctico a oxálico usando permanganato de potasio, gasometría, oxidación a ácido acético con dicromato de potasio entre otros. La comparación entre la efectividad de los métodos por titulación y por oxidación reveló que existe asociación parcial entre moléculas de ácido que no siempre están disponibles para titulación con base y por lo tanto se observaron respuestas más ajustadas a las esperadas por el método de oxidación (10).

Otro de los métodos usados para la determinación de ácido láctico es el colorimétrico en donde el analito es oxidado con H₂SO₄ a acetaldehído para posibilitar la reacción con p-hidroxifenilo en presencia de iones de Cobre. La absorción se mide a 560nm y se espera una relación lineal entre el aumento de la absorbancia a esa longitud de onda y la concentración del analito en la muestra (7).

Los métodos que involucran bisulfitos/sulfatos (12) o coloración con hidroxifenilo (13) en presencia de iones metálicos normalmente requieren eliminación preliminar de proteínas y carbohidratos que puedan interferir en la medida. Para ello se usan reactivos que requieren manejo especial, como oxidantes o metales pesados que pueden generar residuos contaminantes (14).

Se ha planteado que la reacción colorimétrica entre iones lactato y Tricloruro férrico (Ec.2) con medición a 390nm puede ser un método eficiente y económico para la determinación del analito. Las condiciones óptimas establecidas son 0.2% p/v FeCl₃ y 15 min de reacción. El rango de linealidad se conserva desde 0.3-10g/L con un coeficiente de correlación de 0.999. La presencia de impurezas tales como etanol, glicerol, y albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés) en concentraciones de 100g/L reporta un máximo error de 2% de la

determinación de ácido láctico, lo que implica un bajo efecto de dichas impurezas en el método. Así mismo la determinación cuantitativa de ácido láctico, en medios de cultivo y productos lácteos, comparada con la concentración hallada por HPLC sólo difiere un 3% en estos últimos (14). Teniendo en cuenta que el método espectrofotométrico requiere menores costos de equipamiento y mayor accesibilidad, esta técnica se reconoce como promisorio para la determinación cuantitativa de rutina de ácido láctico para soluciones que contengan más de 0.3g/L del analito.



2.2 Resonancia magnética nuclear de protones

El método permite identificar moléculas particulares a partir del spin de los átomos presentes en la molécula (típicamente 1H y ^{13}C) usando el programa de pulsos doble quantum que permite identificar algunos spines fuertemente acoplados. La técnica es especialmente interesante para usos médicos, como lo plantearon Hurd & Freeman (1989) quienes presentaron un método para identificación de lactato en solución y en tejidos con presencia de lípidos y agua operando con una frecuencia de 85.56MHz y usando un solenoide de radiofrecuencia de 4vueltas y 2cm de diámetro. Los datos fueron adquiridos con dos adquisiciones por bloque y un tiempo de reciclo de 1.5s. Para la excitación selectiva del lactato se usó un pulso $1\bar{3}3\bar{1}$ con un interpulso de 2-ms de retraso. De esta forma, se pudieron identificar niveles de ácido láctico (2.5mM) en sistemas patogénicos en muy poco tiempo y eliminando las interferencias con lípidos y agua (15). En el presente se sigue usando la técnica con fines diagnósticos debido a su alta sensibilidad pudiendo determinar con certeza la presencia de ácido láctico en pacientes sanos o con enfermedad (maligna o no) en hígado y tracto biliar comprobando su efectividad como método diagnóstico para enfermedades hepatobiliares (16). Para los procesos de fermentación, también es una herramienta de interés en especial cuando permite diferenciar la contribución de diferentes ácidos orgánicos. La cuantificación de ácido láctico y acético en sidra presentó una señal de doblete a 1.42 y 2.09ppm respectivamente usando un derivado sililado de ácido propiónico como referencia y estándar interno para las medidas de H-RMN. La pendiente de la curva fue 1.05 con intercepto en 0.27 para la determinación de ácido láctico con un 95% de confianza obteniendo un método sensible, directo y rápido (17).

2.3 Cromatografía de gases acoplada a masas

La complejidad de la matriz para identificación puede comprometer las columnas de separación en presencia de residuos no volátiles que quedan adheridos a la misma. Para mejorar este comportamiento y asegurar la obtención de los picos de interés es necesario derivatizar el ácido láctico con sililantes (7,18,19) que si bien mejoran la determinación implican mayor manipulación de la muestra y en ocasiones el uso de reactivos tóxicos. Sin embargo, el muestreo por micro-extracción en fase sólida del espacio de cabeza de la muestra

(HS-SPME) puede disminuir estos riesgos. Justamente, el estudio de la calidad de café luego de procesos fermentativos provee una herramienta de medición con esta técnica, usando un detector de ionización de llama y una columna DB wax (30m x 0.25mm i.d x 0.25 μ m) con temperatura de horno de 50°C durante 5min y posterior aumento hasta 190°C en una rampa de 3°C/min y tiempo de residencia en la temperatura final de 10min. La temperatura del inyector se fijó en 230°C mientras que en el detector fue de 240°C. El gas de arrastre fue N₂ con flujo de 1.2mL/min. Los compuestos volátiles fueron identificados de acuerdo con sus tiempos de retención y el ácido láctico pudo ser diferenciado de acético, propiónico, succínico y otros en rangos de 0.02-1.37g/kg (20).

2.4 Cromatografía líquida de alta presión

Múltiples protocolos de determinación por HPLC han sido descritos, pero se recopilarán aquí sólo aquellos más relevantes para la determinación cuantitativa de ácido láctico en una matriz compleja de ácidos orgánicos. Usando una columna de intercambio catiónico (Aminox HPx87-H; 300mm x 7.8mm i.d.) operada a 65°C, eluída con una fase móvil de H₂SO₄ 0.013N (0.8mL/min) y monitoreada con detector UV a 210nm, es posible identificar ácido láctico en vinos (rojo y blanco) y mostos con sobreestimación de tan solo 0.15g/L si se compara con la estimación enzimática específica. La técnica es capaz de diferenciar la contribución de diferentes ácidos orgánicos como cítrico, tartárico, málico y acético (21). Por otra parte, la evaluación de producción de ácido láctico usando una cepa de *Thermoanaerobacter sp.* sobre cepas de *Aloe Vera* mostró rendimientos mejorados con la cepa en cuestión que alcanzan la concentración de 178mM de ácido láctico en 26h de fermentación. La técnica de identificación implicó el uso de un equipo HPLC con columna 300 x 8mm Shodex SH1011, usando como fase móvil H₂SO₄ 0.01N (1mL/min – 50°C) y un detector con arreglo de diodos (22). La técnica también ha sido usada para evaluar la exitosa capacidad de inhibición de crecimiento del hongo *Aspergillus ochraceus* usando un fermento de kéfir de agua que contiene bacterias acidolácticas que disminuyen el pH del medio y reducen el crecimiento del hongo. Puntualmente, se evaluó el ácido láctico separando con una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H usando H₂SO₄ 0,008N (0.6mL/min - 35°C) como fase móvil y usando un detector UV-Visible en un rango de hasta 15,5 mmol/L del analito (23).

Con el objetivo de optimizar la producción de suero costeño, se desarrolló una investigación tendiente a establecer la proporción adecuada de cepas de *Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis* usando HPLC con una columna Zorbax SBAq (4.6 x 150 mm, 5 μ m de fase reversa) y en rangos de determinación de 0-14mg/g (24). El análisis del poder prebiótico de algunos alimentos es de interés para la industria alimenticia y por ello, la identificación de la producción de ácidos grasos de cadena corta es un indicador válido para el reconocimiento de productos potencialmente promisorios. La identificación de ácido láctico en una matriz que contiene albedo de naranja, bacterias productoras de ácido láctico y nutrientes arrojó valores de 0.003-4.280g/L del analito cuando se usó la técnica de HPLC con una columna Resex Organic Acids (7.8 x 300 mm), eluída con H₂SO₄ 0.5mN (0.6mL/min

-50°C) y usando un detector de índice de refracción (25). Para maximizar la producción de ácido láctico es posible usar la técnica de fermentación extractiva *in situ* que se refiere a la presencia de una fase orgánica en el medio de cultivo que permite la separación del analito, desde el medio de cultivo. La determinación de ácido láctico en fase acuosa se puede llevar a cabo usando una columna de intercambio iónico, cuya fase móvil es H₂SO₄ 0.005N (0.5mL/min – 25°C) y un detector UV-Vis (214nm). Para el ácido láctico presente en la fase orgánica es necesaria una titulación por retroceso en donde la adición de NaOH 0.1N logra desalojar el ácido y el exceso de base se titula con HCl 0.1N (26)

En una investigación tendiente a evaluar la cinética de producción de ácido láctico, usando zeolita y alginato de calcio como material de soporte para las bacterias productoras, se cuantificó la concentración del analito con HPLC usando una precolumna K-G y una columna Shodex KC-811, con una fase móvil acuosa (1.2mL/min – 30°C) y un detector de índice de refracción. La técnica permite identificar concentraciones de ácido láctico en el rango de 0.5-3.5g/L (27). En otro estudio, la determinación por HPLC de ácido láctico en pulpa de café y en mucílago de café fermentados, se realizó con una columna Eurokat H (300mm x 8mm x 10µm) eluída isocráticamente con H₂SO₄ 0.005M (0.8mL/min) y usando un detector de índice de refracción. La fracción de isómeros ópticos fue determinada usando una columna Chiralpak[®] MA(+) (50mm x 4.6mm x 3µm) y detector UV usando una fase móvil que contiene CuSO₄ (2mM-0.8mL/min). De esta forma se logró identificar ácido láctico en concentraciones de 4 y 5 g/L*h obtenidas después de la fermentación de pulpa y mucílago (respectivamente) con *Bacillus coagulans* (28,29).

2.5 Métodos colorimétricos con separación química previa

Los métodos cromatográficos suelen emplear equipamiento de alto costo, requerir personal especializado y previa purificación de la muestra. Es por ello que se ha planteado la posibilidad de mejorar la sensibilidad de los métodos colorimétricos (de menor costo).

Una posible mejora al proceso de separación cuando el ácido láctico proviene de matrices aún más complejas como las obtenidas en procesos de ensilaje, es el uso de precipitación química como lactato de zinc y posterior determinación con FeCl₃. Para ello, se plantea homogeneizar 16mL de muestra con 284mL de agua, 120mL BaCl₂ (9.88% p/v) que permita la extracción de lactato como sal de bario, 120mL NaOH (0.66N) y 60mL Zn(SO₄) (22.5% p/v) que permite la transferencia de cationes para formar el lactato de Zinc y precipitar Sulfato de Bario (blanco). La mezcla se centrifuga para separar el sobrenadante y adicionar el reactivo de FeCl₃ en una proporción 1:10 para la formación del lactato ferroso que puede ser leído a 425nm (30).

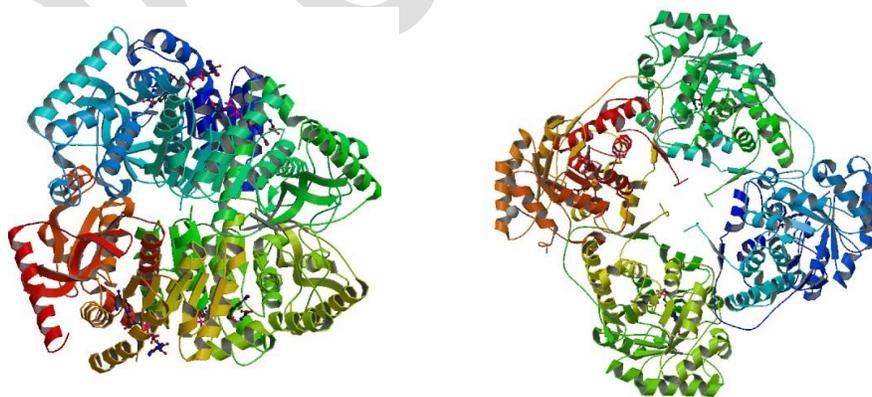
2.6 Métodos enzimáticos

2.6.1. Espectrofotométrico: Usando la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NAD⁺) como coenzima, el lactato es oxidado a piruvato al tiempo que la coenzima es reducida a NADH que normalmente es observada por su absorbancia a 340nm. Si bien la determinación es indirecta se asume equimolaridad en el proceso y por lo tanto permite evidenciar proporcionalidad entre absorbancia y concentración de lactato en un rango de 5.72-6.10mM (31). Si bien, el método es altamente específico y permite diferenciar entre L y D isómeros, se requiere una enzima purificada y minuciosidad en la determinación para una correcta medición del analito. Los kits disponibles para la determinación pueden ser altamente costosos lo que compromete su aplicabilidad en diferentes contextos industriales (14).

2.6.2. Fluorescencia: Existen diferentes kits para determinación de lactato en suero sanguíneo, medios de cultivo y de fermentación usando la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que permite la cuantificación de lactato por excitación a 535nm y emisión a 587nm. Los rangos de detección oscilan entre 1-2 mmol/L (32).

Si bien LDH es una enzima altamente selectiva, en algunos casos la oxidación de la coenzima a altos voltajes puede hacer reversible la reacción y por lo tanto disminuir el pico de NADH para cuantificación. Es por ello, que en general se acepta mejor la enzima lactato oxidasa (LOx) que en presencia de oxígeno puede oxidar al ácido láctico y producir H₂O₂ para que reaccione colorimétricamente en una reacción subsiguiente. En la Figura 1 se presentan las estructuras cristalinas de las dos enzimas LDH y LOx.

Figura 1. Estructura cristalina de a) Lactato deshidrogenasa de *Thermus Thermophilus* HB8 - 2V7P (33) b) Lactato Oxidasa de *Aerococcus viridans* 2J6X (34)



Fuente: Elaboración de los autores

2.6.3. Colorimétrico: La enzima LOx actúa como catalizador en la oxidación aeróbica de lactato con la consiguiente liberación de H₂O₂ que en contacto con 4-aminoantipirina y otra enzima (peroxidasa-HRP) genera un cromógeno que puede ser identificado a 565nm y que

es directamente proporcional a la cantidad de lactato en la muestra (35). El ensayo puede hacerse también en microplaca para minimizar consumo de reactivos y optimizar parámetros como cantidad de enzima, tiempo de reacción, pH óptimo y volumen de muestra. Bajo las condiciones ensayadas el método mostró un rango de linealidad de 1.88-60mg/dL de lactato con medidas a 30min en tan solo 5µL de muestra (36).

Teniendo en cuenta la importancia industrial del mejoramiento genético de cepas productoras de ácido láctico (BAL por sus siglas en inglés) se han desarrollado sistemas de alto rendimiento para el seguimiento a la producción del analito de interés usando indicador de pH (verde de bromocresol) y LOx, para algunas cepas mutantes. La determinación de ácido láctico implica el cambio de pH inicial con la posterior oxidación del lactato para producir H₂O₂ que reacciona con 4-aminoantipirina. La reacción se lleva a cabo con un volumen total de 200µL y debe ser incubada por 37°C durante 10min para observar cambios en la absorbancia a 500nm. El rango de medición alcanza los 120g/L del analito. Los resultados del método fueron comparados con los obtenidos por HPLC con un coeficiente de correlación de 0.993 mientras que la comparación con un sensor comercial (SBA-40E) generó un coeficiente de correlación de 0.997(37).



2.6.4. Biosensores: En los últimos años, el amplio uso de enzimas y su mayor disponibilidad en el mercado, ha posibilitado el desarrollo de biosensores para la detección del lactato tanto en suero como en derivados lácteos y otras matrices. Para ello se han usado diferentes enzimas solas como LDH, LOx y lactato monooxigenasas (LMO); así como también parejas moleculares de reconocimiento constituidas por LOx/LDH, citocromo b₂/LDH entre otras (38). Un electrodo amperométrico usando LOx acoplada a un polímero y una capa de óxido de indio y estaño puede catalizar la oxidación de ácido láctico para generar H₂O₂ que puede ser medido con una reacción secundaria en un electrodo de referencia (Pt). El electrodo mostró buenos resultados a 42°C con respuesta lineal a concentraciones variables de 0.1 - 5.5mM y una sensibilidad de 1.18µA/mM del analito. Si bien la enzima presentó inhibición en presencia de 8-hidroxiquinolina (64%), el electrodo fue usado 150 veces durante 26 días sin pérdida considerable de actividad cuando fue almacenado a 4°C (38).

De hecho, la multinacional Merck posee en el mercado un análisis rápido usando tiras reactivas que contienen LDH y NADH que en presencia de una enzima deshidrogenasa (diaforasa) genera la reducción de sales de tetrazolio para formar el colorante formazan que puede ser identificado reflectométricamente (39). El kit ha sido probado en la determinación de ácido láctico para identificar la efectividad de antibióticos y antimicrobianos sobre *Lactobacillus* en la etapa de fermentación para la producción de etanol en tres ingenios del

Valle del Cauca en un rango de 40-5400mg/L del analito (40). La relevancia del estudio se centra en la disminución de la productividad toda vez que la presencia de *Lactobacillus* disminuye las fuentes de carbono disponibles para la conversión a etanol además de inhibir el crecimiento de las levaduras responsables del proceso productivo; lo que se traduce en una pérdida de dos moléculas de etanol por cada molécula de ácido láctico producido (41).

Para identificar los isómeros D/L la multinacional Bio-pharm ha desarrollado el kit enzimático Enzytec™ que posee LDH selectiva para el isómero L-Lactato y que aprovecha el aumento en la absorbancia a 340nm por presencia de NADH como coenzima de la reacción (42). El kit fue usado para evaluar la capacidad de *Thermoanaerobacter sp.* USBA-018 para la producción selectiva del isómero L-Lactato (22).

Como se observa en la Tabla 1 la evolución en el tiempo de las estrategias de determinación de ácido láctico ha permitido disponer de diferentes métodos de identificación y cuantificación con rangos de operación diferenciales y requerimientos tecnológicos particulares. La elección, por tanto, del mejor método de identificación deberá pasar por un análisis detallado del rango de detección esperado en el proceso fermentativo particular y las herramientas tecnológicas disponibles para el seguimiento del proceso.

En síntesis, dentro de las desventajas de los métodos colorimétricos se puede identificar su baja especificidad y sensibilidad además de su cuestionada reproducibilidad. En cuanto a H-RMN, si bien es altamente eficiente en identificar la presencia del analito, no puede proveer concentraciones exactas del mismo. Para el caso de los métodos cromatográficos, la separación de los isómeros es complicada y si bien es sensible tiene baja resolución (7). El uso de enzimas purificadas como aquellas que permiten la identificación de los isómeros L/D suele ser costoso y la determinación puede requerir preparación previa de la muestra. Este comportamiento se viene revirtiendo a partir del uso de ingeniería genética para la producción a escala industrial de las enzimas que permitan generar precios competitivos en el mercado.

Por su parte, las ventajas en el uso de los métodos colorimétricos o voltamétricos son su simplicidad y bajo costo, mientras que el análisis por H-RMN es rápido, reproducible y no invasivo lo que pone esta herramienta a la vanguardia de los métodos de diagnóstico *in vivo*. Por su parte, los métodos enzimáticos y cromatográficos son altamente específicos, sensibles, precisos y reproducibles. Entre estos dos, los métodos enzimáticos requieren equipamiento de menor costo por lo que se prefieren como herramienta de identificación y cuantificación.

Tabla 1. Métodos para la determinación de ácido láctico.

Método	Descripción	Rango de detección	Aplicación	Referencia
Titulometría	AOAC 947.05	8,10 - 20,83 g/L	Producción quesos	(11)
Colorimetría - Gravimetría.	Homogeneizar 16mL de muestra + 284mL de agua + 120mL BaCl ₂ (9.88%p/v) => Lactato de Bario Adicionar 120mL NaOH (0.66N) + 60mL Zn(SO ₄) (22.5% p/v) => lactato de Zinc + Ba ₂ (SO ₄) Centrifugar y adicionar FeCl ₃ al sobrenadante (1:10Vol)=> lactato ferroso que puede ser leído a 425nm	0,3 - 10g/L	Ensilaje	(30)
Resonancia magnética nuclear de protones	Frecuencia 85,56MHz Tiempo reciclo 1,5s Pulso 1331 Interpulso 2-ms	0,22g/L	Diagnóstico médico	(15)
Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	Aminox HPx87-H (300 x 7.8mm i.d.) Temperatura horno 65°C Fase móvil H ₂ SO ₄ 0,013N (0.8mL/min) Detector UV a 210nm	0,15g/L	Producción vinos	(21)
	Shodex SH1011 (300 x 8mm) Temperatura horno 50°C Fase móvil H ₂ SO ₄ 0,01N (1mL/min) Detector Arreglo de diodos	16g/L	Fermentación a partir de residuos agroindustriales	(22)
	Eurokat H (300mm x 8mm x 10µm) Fase móvil H ₂ SO ₄ 5mM (0.8mL/min) Detector de índice de refracción	4 - 5g/L*h	Fermentación a partir de residuos agroindustriales	(28)

Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS)	Detector de ionización de llama Columna DB wax (30m x 0.25mm i.d x 0.25 µm) Temperatura de horno = 50°C (5min) Rampa temperatura= 190°C rampa 3°C/min Tiempo de residencia 10min. La Temperatura del inyector= 230°C Temperatura inyector= 240°C. Gas de arrastre N2 = 1.2mL/min	0.02-1.37g/kg	Fermentación café	(20)
Enzimáticos	Lactato deshidrogenasa (LDH / NADH) Espectrofotometría 340nm	0,51 - 0,55g/L	Diagnóstico médico	(31)
	LDH Fluorescencia (Ex 535nm; Em 587nm)	0,1 - 0,2 g/L	Diagnóstico médico / Fermentación	(32)
	Lactato Oxidasa (LOx) Absorbancia 565nm Volumen muestra 5uL Tiempo incubación 30min	0,02-0,6g/L	Diagnóstico médico	(36)
	Lactato Oxidasa / Peroxidasa (LO x/HRP) Absorbancia 500nm Volumen muestra 200uL Tiempo incubación 10min	120g/L	Producción industrial de ácido láctico	(37)

Fuente: Elaboración de los autores

3 PURIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

La principal dificultad en la biosíntesis de ácidos orgánicos tiene que ver con su recuperación que, además, es costosa. Al igual que en la síntesis química, en la síntesis microbiana se persigue la pureza de los productos y que no se formen co-productos. En la **Error! Reference source not found.** se puede visualizar de forma general la separación del caldo fermentativo en el que los ácidos orgánicos son principalmente, productos extracelulares. La precipitación, destilación, membranas de separación, extracción y ultrafiltración son las técnicas más utilizadas en una primera fase de purificación y la cromatografía y la cristalización en la fase de refinamiento de los ácidos orgánicos (43,44).

Para lograr la obtención de nuevos productos y que se puedan comercializar, es imprescindible que se junten concertadamente diversas operaciones unitarias con el objetivo que el proceso sea eficiente. Una de las etapas clave, es la recuperación de la sustancia de interés por lo que es necesaria la puesta en marcha de una serie de técnicas llamadas en conjunto como “downstream procesing” (28,29,45). En dichas técnicas se contemplan todos los procedimientos que requiere el caldo fermentativo para lograr que el producto de interés presente pureza y actividad deseadas. Entre las diversas técnicas se encuentran la filtración, el ablandamiento, la electrodiálisis, “polishing” y la destilación. Una vez se inactiva el caldo de cultivo se procede a la filtración (ultra y/o nano filtración), en el ablandamiento se remueven cationes (calcio o magnesio), en la electrodiálisis se concentra el ácido orgánico, en “polishing” se trata de esterilizar el producto y de eliminar trazas de contaminantes y en cuanto a la destilación, es al vacío. Recientemente se publicaron estudios sobre downstream en los que a partir del jugo dulce de sorgo se logró la formación del enantiómero L-ácido láctico. En el proceso downstream se realizó la filtración, remoción de cationes, electrodiálisis mono y bipolar, en “polishing” la eliminación del color por cromatografía de intercambio iónico y finalmente, la evaporación al vacío a 55°C, 0.05 bar y 200 rpm (45).

En la última década y gracias a la biotecnología, se ha podido transformar la biomasa en productos comerciales de mucha importancia, como el ácido láctico, debido a la gran variedad de aplicaciones entre las que se encuentran: en farmacia, cosmética, alimentos y biopolímeros. Dependiendo del tipo de biomasa, se puede requerir pretratamientos y si se usan microorganismos específicos y condiciones apropiadas de fermentación, es posible obtener ácido láctico D o L ópticamente puro. La purificación del ácido láctico es una etapa relevante ya que el caldo de fermentación puede contener impurezas como azúcares reductores, nutrientes y otros ácidos orgánicos. Por ello, es necesario separar el ácido del caldo fermentativo y recurrir a posteriores purificaciones que deben ser cuidadosamente escogidas para evitar la pérdida del ácido, minimizar el consumo de energía y el gasto de reactivos (46).

Hay una gran variedad en las metodologías de separación y purificación del ácido láctico. Todas presentan diferentes grados de pureza y entre las que se destacan se encuentran: precipitación (47,48), destilación (47,49,50), extracción con solventes (51,52), adsorción (52), procesos con membranas (51,53–56) y cromatografía de intercambio iónico (57–62). A nivel industrial, aún se tienen inconvenientes en su implementación por los costos elevados en equipos, la poca recuperación de los solventes utilizados y un elevado consumo en energía. Luego de la fermentación y otras operaciones, el ácido láctico aún contiene numerosas impurezas orgánicas e inorgánicas como los sulfatos de calcio y sodio, azúcares, sustancias coloridas, dextrinas y proteínas. Sin purificar, es muy complejo que el ácido láctico pueda ser empleado en la industria de alimentos y en la de los plastificantes ya que son rigurosos en las especificaciones del ácido (63,64). En resumen, es muy importante la etapa de purificación del ácido láctico porque tiene una gran influencia en su calidad y en su precio (57).

Las principales complicaciones en la separación y purificación del ácido láctico se deben a su solubilidad con el agua, además de presentar baja volatilidad. En una gran cantidad de casos, el ácido láctico se obtiene en forma de lactato de calcio. Dependiendo del grado de pureza que se desee, existen varias opciones, entre las que se destacan: pretratamiento empleando carbón activado seguido de la purificación con resinas de intercambio iónico y, por último, extracción con solventes, destilación e hidrólisis (65).

3.1 Precipitación

Uno de los procesos de separación convencionales, más utilizados como purificación primaria en la producción de ácido láctico por fermentación es la precipitación. En este método se adiciona en exceso el hidróxido o el carbonato de calcio al caldo de fermentación con el fin de neutralizar el ácido producido manteniendo un pH entre 5 y 6, de esta forma se obtiene la sal de calcio del ácido o lactato de calcio. Luego, se agrega ácido sulfúrico para precipitar el sulfato de calcio o yeso el cual es filtrado quedando el ácido láctico libre y puro (66).

Además del uso de hidróxido de calcio en el proceso de precipitación, también se ha utilizado hidróxido de amonio e hidróxido de sodio como agentes neutralizadores pero, son más costosos (67). Kwak y colaboradores, emplearon metanol durante la acidificación del lactato de amonio para disminuir la solubilidad del sulfato de amonio en el caldo de fermentación y de esta forma, poder ser filtrado más fácilmente. En esta fermentación se usó como sustrato glucosa y como microorganismos *Lactobacillus paracasei* (68). En el 2009 se realizó un estudio en el que a partir de sacarosa se logró obtener ácido láctico que fue purificado vía lactato con posterior acidificación, adsorción con carbón activado y ozonificación; así fue

recuperado el ácido láctico, aunque se logró establecer que el carbón activado no solo retiene el color sino también el ácido (48).

3.2 Destilación

La destilación convencional molecular o evaporación tipo recorrido corto se ha convertido en una alternativa para la purificación de moléculas que son inestables térmicamente como el ácido láctico (49). En un estudio se analizó la influencia de la variación del flujo de alimentación, la agitación, la temperatura del condensador y del evaporador en la purificación de más del 89% de ácido láctico. Se pudo concluir que se llevó a cabo la recuperación de ácido láctico utilizando un sistema híbrido de evaporación como una técnica factible por la presión a la que operó (1000 Pa) en un solo paso lo que se traduce en una reducción en los costos de un sistema normal (50). En cuanto a la destilación de tipo reactivo, ha demostrado ser una técnica promisoriosa brindando la recuperación de ácido láctico con una alta pureza y rendimiento. En este proceso, la reacción química y la separación por destilación son realizadas simultáneamente en un aparato de destilación fraccionada y se ha convertido en una alternativa atractiva al proceso convencional debido a factores como: mejoramiento en la conversión de reactivos, reducción de costos, mejoramiento en la selectividad de los productos de interés, reducción de catalizadores, de productos colaterales, entre otros (47).

3.3 Extracción con solventes

La extracción con solventes o extracción líquido-líquido ha sido propuesta como una posibilidad mejorada al proceso clásico de precipitación. En general, este tipo de extracción es un método en el que uno o más solutos son removidos de una mezcla líquida. Esta mezcla presenta una diferencia en la solubilidad al adicionar un solvente por lo que se forman dos fases en la que el soluto o solutos son más afines al solvente. Algunos factores a tener en cuenta serían: la fácil separación de las fases formadas al añadir el solvente, la selectividad del solvente y la selección del solvente. Es necesario que el solvente cumpla con algunas características, entre las que se destacan: selectividad, estabilidad química, que en lo posible no sea tóxico o viscoso y que se pueda recuperar una vez separados los analitos (51,52).

Se han realizado diversos experimentos para la extracción del ácido láctico con solventes como éter etílico, acetato de etilo, hexanol, alcohol isoamílico y furfural. Estos solventes fueron escogidos debido a que presentan una afinidad alta al ácido láctico y poca o nula afinidad al agua. Las alquilaminas también han sido usadas como solventes en la extracción del ácido láctico por su efectividad para remover ácidos carboxílicos de soluciones acuosas, uno de los más utilizados es el denominado alanina 336, el cual es una mezcla de trioctilamina y tridodecilamina. Su inconveniente es la viscosidad por lo que se puede diluir con metil isobutil cetona, hexano, decano, dodecano o queroseno (51).

3.4 Procesos con membranas

El proceso de separación con membranas se refiere a la transferencia de solutos a través de una barrera física permeable que separa dos fases, restringiendo el paso de componentes de una fase a otra. Las membranas son materiales que pueden ser homogéneos o heterogéneos, simétricos o asimétricos, sólidos o líquidos, cargados (positiva o negativamente) o neutros. Entre los factores a tener en cuenta se tiene lo relacionado con el transporte de moléculas si se da por fenómenos de convección o difusión y si puede ser causado por diferenciales originados por campos eléctricos o por diferencias en concentración, presión o temperatura (54). A las membranas se les puede clasificar dependiendo del tipo de material o de la estructura. Según el tipo de material pueden ser orgánicos o inorgánicos, siendo estos últimos los que registran mayor estabilidad térmica y química (56).

Desde los años 60's se ha venido explorando esta técnica y surgió debido a que la precipitación es un método costoso que genera una gran cantidad de residuos sólidos lo que conlleva a problemas de tipo ambiental (54). Hoy en día se utilizan tecnologías basadas en membranas como microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, electrodiálisis y ósmosis inversa en la recuperación de productos de fermentación (51,54).

3.4.1 Microfiltración (MF): es un proceso de filtración en los que se emplea una membrana porosa para la separación de partículas con diámetros entre 0.1 μm y 10 μm . Es posible separar con esta tecnología coloides, emulsiones, suspensiones y microorganismos con presiones entre 0.5 y 3 bar. En el caso de la recuperación de ácido L(+)-láctico, en el año 2012, se usó una membrana de microfiltración en cerámica la cual resultó ser tolerante a la temperatura, a la presión y al ácido (69).

3.4.2 Ultrafiltración (UF): la membrana se caracteriza por el peso de las moléculas y no por el tamaño de sus poros como en el caso de la microfiltración. Esta técnica se puede emplear para moléculas con pesos entre 1000 Da y 10000 Da. La composición de las membranas es anisotrópica ya que los poros en la membrana varían de tamaño: en la superficie se encuentran los más finos. Esto trae como consecuencia que la mayor parte de la separación se da en la superficie mientras que para la zona en donde los poros son más grandes pueden dar soporte mecánico. Entre los factores a tener en cuenta, además del tamaño de poro, está lo relacionado con la configuración espacial y las interacciones entre la carga eléctrica de las moléculas y la carga del material de la membrana a un pH en particular. Existe una gran variedad de materiales para este tipo de membrana como: acetato de celulosa, polisulfona y materiales inorgánicos como combinaciones de óxido de aluminio, óxido de titanio y zircón (70). Este tipo de técnica se emplea para la separación de biomoléculas como proteínas y polisacáridos además de polímeros y partículas de tipo coloidal o micelar y de otro tipo de componentes de tamaño mucho menor (55).

3.4.3 Nanofiltración (NF): la membrana es semipermeable y la separación se produce por el peso de las moléculas entre 200 Da a 1000 Da aunque el tamaño de poro se encuentra entre 1.5 nm y 2.5 nm. Debido a que las membranas son densas se requieren presiones entre 3 bar y 20 bar. Es importante tener presente, a la hora de utilizar esta técnica, que en la separación puede tener mayor efecto la interacción entre las cargas del material de la membrana y las cargas de las moléculas que se encuentran en la solución a filtrar (55). Una de las aplicaciones de este tipo de proceso es la separación de ácido láctico de una matriz de fermentación y para ello hay que tener presente si está en forma disociada o no. Esto depende del pH y de la constante de disociación del ácido láctico a la temperatura del proceso (71).

3.4.4 Electrodiálisis: es un método de separación que se fundamenta en el uso de membranas de intercambio catiónico y aniónico. Dichas membranas se reorganizan alternativamente entre el ánodo y el cátodo por la aplicación de un potencial eléctrico entre los electrodos en donde los cationes emigran al cátodo y los aniones al ánodo. Las membranas están constituidas de polímeros, no son porosas y tienen un grosor entre 10 μm y 500 μm . Entre las aplicaciones se encuentra la remoción de sales de soluciones o de sustancias iónicas concentradas (51). Teniendo en cuenta esto, se ha utilizado la doble electrodiálisis con éxito para remover cationes multivalentes y para concentrar sales de lactato dos o más veces (66).

3.4.5 Ósmosis reversa: se usa una membrana semipermeable, no porosa, que al aplicar presión el solvente pasa por difusión de una solución de menor concentración a una de mayor concentración. Entre las aplicaciones de este método está la concentración de solutos de bajo peso molecular o para la desmineralización del agua. Entre las variables a tener en cuenta están: la presión aplicada y del gradiente de concentración a ambos lados de la membrana (55).

3.5 Cromatografía de intercambio iónico

Otro proceso de separación bastante utilizado es la cromatografía, por su bajo costo, alta selectividad y facilidad de operación. Entre la variedad de técnicas cromatográficas, la de intercambio iónico presenta un menor tiempo de operación, mayor rendimiento en la recuperación del producto y generación de una cantidad mínima de desechos. Para diseñar con éxito el desarrollo de la purificación, es de suma relevancia ajustar parámetros como la selección de la resina, la eficiencia de unión o las condiciones de elución de moléculas objetivo (58).

La cromatografía de intercambio iónico permite la separación de moléculas debido a propiedades de carga eléctrica. Este tipo de cromatografía presenta dos fases: la estacionaria o intercambiador iónico y la móvil. La elección de la fase estacionaria es uno de los aspectos

más importantes y está basada en los siguientes tres aspectos: 1. la fuerza del intercambiador de iones, 2. el flujo y/o volumen de muestra y 3. las propiedades de la muestra. Los grupos funcionales de intercambio iónico presentan dos categorías, los cargados positivamente como dietilaminoetil (DEAE) y amonio cuaternario (Q) que son utilizados en cromatografía de intercambio aniónico y los cargados negativamente como carboximetil (CM), sulfometil (S) y sulfopropil (SP) que son usados en cromatografía de intercambio catiónico. Ambos grupos pueden ser fuertes o débiles. Los intercambiadores iónicos fuertes están totalmente ionizados sobre un vasto rango de pH y los débiles son tolerantes en términos de selectividad. También hay que tener presente el tamaño, la porosidad y la capacidad de unión de las partículas a la hora de escoger la fase estacionaria. Para decidir la fase móvil a emplear se requieren tener en cuenta algunos factores como la carga y la fuerza iónica del buffer y el pH (72).

En general, en la cromatografía de intercambio iónico, se da una competencia entre moléculas que difieren en su carga superficial por grupos cargados opuestamente, sobre una matriz o un adsorbente de intercambio iónico (fase estacionaria). Las interacciones hidrofóbicas reversibles entre los solutos son controladas para favorecer la unión o elución de moléculas específicas (72).

Existe una gran variedad de resinas comerciales debido a las diferentes estructuras y grupos funcionales lo que permite una amplia diversidad de propiedades fisicoquímicas que controlan su capacidad para un determinado propósito. Se ha logrado llegar a ese punto por numerosos estudios en los que han evaluado diferentes resinas. Tal es el caso de Arcanjo y colaboradores quienes revisaron la aplicación de la Amberlita IRA-67 y la Amberlita IRA-96 en la recuperación de ácido láctico, mostrando resultados satisfactorios pero, la resina Amberlita IRA-96 presentó mejores tasas de adsorción, desorción y recuperación (57).

En el 2015 reportaron un procedimiento novedoso y sencillo para la separación de ácido láctico del caldo de fermentación a partir del sustrato, *Zizyphus oenophlia*, basado en la cromatografía de intercambio iónico, el cual consistió de dos pasos: se usó una resina de intercambio aniónico débil (Amberlita IRA-96) para separar el ácido de otros aniones presentes en el caldo y luego, se empleó un intercambiador de cationes fuerte (Amberlita IRA-120) que eliminó el ácido y atrapó otros cationes presentes. Después de este proceso, se logró el 99.17 % de pureza del ácido con un rendimiento de recuperación del 98.9 % (58).

Quintero y colaboradores trabajaron para la recuperación de ácido láctico con un sistema de columnas en serie. Las resinas Amberlita IRA-400 y Amberlita IRA-120 fueron las evaluadas. La recuperación de ácido láctico fue de 77 % y 73 % cuando el sistema se ajustó a una temperatura de 25 °C y a un pH de 3 y 5, respectivamente (60).

En otro trabajo, la resina WA 30 presentó la mayor cantidad de concentración adsorbida de ácido láctico en comparación con las resinas de Amberlite IRA A 400, SA 10A, WK 10 y PK 228 por lo que fue la más adecuada para usarse en la adsorción de ácido láctico del caldo de fermentación a partir de Cassava bagasse. La cantidad de ácido láctico recuperado disminuyó con el aumento de la temperatura así que su separación debió realizarse a bajas temperaturas (61).

En la tabla 2 se pueden analizar las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de purificación contemplados en este documento.

Tabla 2. Análisis comparativo entre los diferentes métodos de separación de ácido láctico.

Proceso de separación	Ventajas	Desventajas
<i>Precipitación</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Fácil de aplicar en plantas industriales *Operación sencilla 	<ul style="list-style-type: none"> *Gran consumo de ácido sulfúrico *Generación de yeso (se requieren vertederos para su desecho) *El producto presenta un porcentaje de pureza bajo
<i>Destilación molecular</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Reducción del riesgo de descomposición térmica *El producto presenta un porcentaje de pureza alto *No se utilizan solventes *No se requiere purificación adicional 	<ul style="list-style-type: none"> *Es difícil llevarlo a escala industrial *Requiere condiciones de alto vacío
<i>Destilación reactiva</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Se puede integrar la reacción y la separación en el mismo equipo *El producto presenta un porcentaje de pureza alto *Bajo consumo de energía 	<ul style="list-style-type: none"> *El proceso es complejo *Se aplica específicamente para reacciones reversibles en fase líquida *Las aplicaciones son limitadas para sistemas en los cuales las velocidades de reacción son bastante altas y no hay desfase de temperaturas favorables para la reacción y separación *Corrosión y problemas de separación debido al uso de catalizadores homogéneos
<i>Extracción líquida-líquida</i>	<ul style="list-style-type: none"> *No produce yeso *Reducción del riesgo de descomposición térmica 	<ul style="list-style-type: none"> *Se requiere la recuperación del solvente o sustancia extractante. *La pureza del producto no es alta *Los agentes convencionales de extracción no presentan favorables coeficientes de reparto
<i>Procesos de membrana</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Gran flexibilidad en la escala de producción *Selectividad 	<ul style="list-style-type: none"> *Las membranas son costosas *La limpieza de las membranas es compleja *Presenta problemas de polarización

	<ul style="list-style-type: none"> *El producto presenta un porcentaje de pureza alto *Posibilidad de integración con fermentadores convencionales reduciendo el costo de inversión 	*Es difícil llevarlo a escala industrial
<i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Gran capacidad *Alta resolución *Se puede sembrar un gran volumen para luego eluirlo en un menor volumen *En una misma columna se pueden utilizar diferentes valores de pH y obtener diversos perfiles de elución 	*Las muestras deben estar desalinizadas antes de utilizar esta cromatografía

Fuente: Fuente: Tomado de Komesu y col 2017. (51)

4 CONCLUSIONES

El ácido láctico es un metabolito de interés como indicador o producto principal de diferentes procesos en la industria alimentaria (derivados lácteos, vinos y fermentos), farmacéutica (lactato en sangre) y polimérica (producción de polilactato). Su importancia ha motivado múltiples trabajos de investigación para su correcta identificación, cuantificación, separación y purificación marcando un camino de diversas posibilidades a analizar en cada uno de los procesos.

Teniendo en cuenta la identificación y cuantificación se postulan mecanismos tan diversos como colorimetría, gravimetría, H-RMN, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta presión y métodos enzimáticos. La elección de la mejor opción analítica deberá realizarse teniendo en cuenta los rangos de detección esperados y permitidos por cada técnica, así como las restricciones dadas por la complejidad del equipamiento y sus costos asociados. Puntualmente, los métodos enzimáticos parecen presentar una alternativa de bajo costo con una buena sensibilidad y reproducibilidad.

Para el caso de la separación y purificación de ácido láctico también se encuentran múltiples mecanismos posibles entre los que se destacan la precipitación, destilación, extracción con solventes, adsorción, procesos con membranas y cromatografía de intercambio iónico. Ya que su uso industrial está limitado a la rigurosidad de la industria alimentaria y polimérica, la purificación determina su calidad, aplicación y costo. El proceso es aún más complejo dadas sus propiedades fisicoquímicas de solubilidad en agua y baja volatilidad. Dada la eficiencia observada para los procesos de purificación con membranas de intercambio iónico, esta técnica se postula como una de las más promisorias para atender las altas exigencias del mercado de ácido láctico.

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Li Q-Z, Jiang X-L, Feng X-J, Wang J-M, Sun C, Zhang H-B, et al. Recovery Processes of Organic Acids from Fermentation Broths in the Biomass-Based Industry. *J Microbiol Biotechnol*. 2016 Jan;26(1):1–8.
2. Salazar RA, Cárdenas GJ. La bioeconomía y las biorrefinerías. 2013;34(3):31–4.
3. Luna N, Longoria A. Biorrefinería: de la biomasa a los biocombustibles y productos químicos. 2018;(January):30–1.
4. Kompanje EJO, Jansen TC, Van Der Hoven B, Bakker J. The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814-1869) in January 1843. Vol. 33, *Intensive Care Medicine*. 2007. p. 1967–71.
5. De Souza JC, Da Silva JL, Fabrão RM, Stradiotto NR, Zanoni MVB. Electroactive sugars, organic acids and sugar alcohol analysis in wine using anion-exchange chromatography with electrochemical detection. *Microchem J* [Internet]. 2019;147(January):972–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.010>
6. Caligiani A, Acquotti D, Palla G, Bocchi V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 2007;585(1):110–9.
7. Pundir CS, Narwal V, Batra B. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: A review. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2016;86:777–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.076>
8. Rathee K, Dhull V, Dhull R, Singh S. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 2016;5:35–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.010>
9. Jamshidian M, Tehrani EA, Imran M, Jacquot M, Desobry S. Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2010;9(5):552–71.
10. Pease GR. The determination of lactic acid [Internet]. University of Massachusetts; 1937. Available from: https://scholarworks.umass.edu/theses/1866/?utm_source=scholarworks.umass.edu%2Ftheses%2F1866&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages
11. Cury Regino K, Arteaga Márquez M, Martínez Flórez G, Luján Rhenals D, Durango Villadiego A. Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Rev Colomb Biotecnol*. 2014 Jun 1;16(1):137.
12. Friedemann T, Graeser J. The determination of lactic acid. *J Biol Chem* [Internet]. 1933;100:291–308. Available from:

<https://www.taylorfrancis.com/books/9781482218206>

13. Barnett AJ. The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochem J.* 1951;49(4):527–9.
14. Borshchevskaya LN, Gordeeva TL, Kalinina AN, Sineokii SP. Spectrophotometric determination of lactic acid. *J Anal Chem.* 2016;71(8):755–8.
15. Hurd RE, Freeman DM. Metabolite specific proton magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(12):4402–6.
16. Nishijima T. Measurement of lactate levels in serum and bile using proton nuclear magnetic resonance in patients with hepatobiliary diseases: its utility in detection of malignancies. *Jpn J Clin Oncol.* 1997 Feb 1;27(1):13–7.
17. Zuriarrain A, Zuriarrain J, Puertas AI, Dueñas MT, Berregi I. Quantitative determination of lactic and acetic acids in cider by ¹H NMR spectrometry. *Food Control.* 2015 Jun 1;52:49–53.
18. Vu DT, Kolah AK, Asthana NS, Peereboom L, Lira CT, Miller DJ. Oligomer distribution in concentrated lactic acid solutions. *Fluid Phase Equilib.* 2005 Sep 20;236(1–2):125–35.
19. Cocchi M, Lambertini P, Manzini D, Marchetti A, Ulrici A. Determination of Carboxylic Acids in Vinegars and in Aceto Balsamico Tradizionale di Modena by HPLC and GC Methods. *J Agric Food Chem [Internet].* 2002 Sep [cited 2019 Nov 13];50(19):5255–61. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0201551>
20. Reis Evangelista S, Ferreira Silva C, Pedrozo Da Cruz Miguel MG, De Souza Cordeiro C, Carla A, Pinheiro M, et al. Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. 2014 [cited 2019 Aug 23]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.033>
21. Schneider A, Gerbi V, Redoglia M. A Rapid HPLC Method for Separation and Determination of Major Organic Acids in Grape Musts and Wines. *Am J Enol Vitic.* 1987;38(2).
22. Gómez-Gómez JA, Giraldo-Estrada C, Habeych D, Baena S. Evaluation of biological production of lactic acid in a synthetic medium and in Aloe vera (L.) *Burm. f.* processing by-products. *Univ Sci.* 2015;20(3):369–85.
23. Caro Velez CA, León Peláez ÁM. Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de “panela” con gránulos de kefir de agua. *Rev Colomb Biotecnol.* 2015 Nov 1;17(2):22–32.
24. Acevedo D, Guzmán L, Rodríguez A. Cinética de la fermentación en la producción de suero costeño. *Rev UDCA Actual Divulg Científica.* 2013;16(2):427–33.
25. Díaz-Vela J, Mayorga-Reyes L, Totosaus AS, Pérez-Chabela M. Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas

- termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. *Vitae*. 2012;19(3):253–60.
26. Sánchez NR, Ramírez L DM, Zapata Z AD. Evaluación de un sistema de fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato. *Vitae*. 2007;14(2):27–34.
 27. Serrato BJC, Caicedo LA. Efecto de la concentración de material inerte en un biocatalizador de alginato de calcio con células inmovilizadas sobre la fermentación láctica * The effect on lactic fermentation of concentrating inert material with immobilised cells in a calcium alginate. *Ing e Investig*. 2005;25(2):78–82.
 28. Pleissner D, Neu AK, Mehlmann K, Schneider R, Puerta-Quintero GI, Venus J. Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016;218:167–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.078>
 29. Neu AK, Pleissner D, Mehlmann K, Schneider R, Puerta-Quintero GI, Venus J. Fermentative utilization of coffee mucilage using *Bacillus coagulans* and investigation of down-stream processing of fermentation broth for optically pure l(+)-lactic acid production. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016;211:398–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.122>
 30. Dirceu JS, César de Queiroz A. Capítulo 14. Determinação do pH, da acidez titulável e do ácido láctico da silagem. In: UFV, editor. *Análise de alimentos Métodos químicos e biológicos*. 3rd ed. Brasil; 2002. p. 235.
 31. Marbach EP, Weii MH. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. *Clin Chem*. 1967;13(4):314–25.
 32. Lactate assay kit (Product information)- Sigma-Aldrich. 2014.
 33. Coquelle N, Fioravanti E, Weik M, Vellieux F, Madern D. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenases adapted to extreme thermal environments. *J Mol Biol*. 2007;374:547–62.
 34. Leiros I, Wang E, Rasmussen T, Oksanen E, Repo H, Petersen SB, et al. The 2.1 Å Structure of *Aerococcus Viridans* L-Lactate Oxidase (Lox). *Acta Crystallogr, Sect F*. 2006;62:1185.
 35. Suman, Pundir CS. Determination of serum lactate with alkylamine glass bound lactate oxidase. *Indian J Biochem Biophys*. 2005;42(3):186–9.
 36. Lin C-Y, Chen S-H, Kou G-H, Kuo C-M. An Enzymatic Microassay for Lactate Concentration in Blood and Hemolymph. *Acta Zool Taiwanica*. 1999;10(2):91–101.
 37. Lv X, Song J, Yu B, Liu H, Li C, Zhuang Y, et al. High-throughput system for screening of high l-lactic acid-productivity strains in deep-well microtiter plates. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2016;39(11):1737–47.

38. Suman S, Singhal R, Sharma AL, Malthotra BD, Pundir CS. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors Actuators, B Chem.* 2005;107(2):768–72.
39. Test Ácido láctico | 116127 [Internet]. [cited 2019 Aug 26]. Available from: http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Lactic-Acid-Test,MDA_CHEM-116127#anchor_PI
40. Orozco JC, Martínez CA, Cubillos-Hinojosa JG. Efecto de antibióticos y un antimicrobiano sobre el control de bacterias ácido lácticas en la fermentación alcohólica. *Rev Colomb Biotecnol.* 2018 Jul 1;20(2):19–37.
41. Sossa-Urrego DP, Gonzalez LM, Vanegas MC. Isolation and identification of contaminant lactobacillus in a Colombian alcohol fermentation plant. *Rev UDCA Actual Divulg Científica* [Internet]. 2009;12(2):163–72. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v12n2/v12n2a17.pdf>
42. Enzytec™ L-Lactic Acid (en) - Food & Feed Analysis [Internet]. [cited 2019 Aug 26]. Available from: <https://food.r-biopharm.com/products/enzytec-l-lactic-acid/>
43. Heding LG, Gupta JK. Improvement of conditions for precipitation of citric acid from fermentation mash. *Biotechnol Bioeng.* 1975 Sep;17(9):1363–4.
44. Kumar R, Nanavati H, Noronha SB, Mahajani SM. A continuous process for the recovery of lactic acid by reactive distillation. *J Chem Technol Biotechnol.* 2006 Nov;81(11):1767–77.
45. Olszewska-Widdrat A, Alexandri M, López-Gómez JP, Schneider R, Mandl M, Venus J. Production and purification of L-lactic acid in lab and pilot scales using sweet sorghum juice. *Fermentation.* 2019;5(2):1–10.
46. Eş I, Mousavi Khaneghah A, Barba FJ, Saraiva JA, Sant'Ana AS, Hashemi SMB. Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Res Int.* 2018;107:763–70.
47. Komesu A, Martinez PFM, Lunelli BH, Filho RM, Maciel MRW. Lactic acid purification by reactive distillation system using design of experiments. *Chem Eng Process Process Intensif.* 2015;95:26–30.
48. Núñez A, Michelena G, Carrera E, Álvarez X. Estudios sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables. 2009;(January 2009).
49. Komesu A, Martins PF, Lunelli BH, Morita AT, De Coutinho PLA, Filho RM, et al. Lactic acid purification by hybrid short path evaporation. *Chem Eng Trans.* 2013;32:2017–22.
50. Komesu A, Martins PF, Lunelli BH, Oliveira J, Maciel Filho R, Wolf Maciel MR. Evaluation of lactic acid purification from fermentation broth by hybrid short path evaporation using factorial experimental design. *Sep Purif Technol.* 2014;136:233–

- 40.
51. Komesu A, Wolf Maciel MR, Maciel Filho R. Separation and Purification Technologies for Lactic Acid – A Brief Review. *BioResources*. 2017 Aug;12(3):1–4.
 52. Othman M, Ariff AB, Rios-Solis L, Halim M. Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. *Front Microbiol*. 2017;8(NOV):1–7.
 53. Danner H, Madzingaidzo L, Holzer M, Mayrhuber L, Braun R. Extraction and purification of lactic acid from silages. *Bioresour Technol*. 2000;75(3):181–7.
 54. Lee HD, Lee MY, Hwang YS, Cho YH, Kim HW, Park HB. Separation and Purification of Lactic Acid from Fermentation Broth Using Membrane-Integrated Separation Processes. *Ind Eng Chem Res*. 2017;56(29):8301–10.
 55. Murillo L. Recuperación y purificación de L(+)ácido láctico aplicando tecnologías de membrana a un caldo de piña (*Ananas comosus*) fermentado. 2013.
 56. Phanthumchinda N, Rampai T, Prasirtsak B, Thitiprasert S, Tanasupawat S, Assabumrungrat S, et al. Alternative reverse osmosis to purify lactic acid from a fermentation broth. *Chem Ind Chem Eng Q*. 2018;24(2):179–90.
 57. Arcanjo M, Fernandes F, Silva I. Separation of lactic acid produced by hydrothermal conversion of glycerol using ion-exchange chromatography. *Adsorpt Sci Technol*. 2015;33(2):139–51.
 58. Bishai M, De S, Adhikari B, Banerjee R. A platform technology of recovery of lactic acid from a fermentation broth of novel substrate *Zizyphus oenophlia*. *3 Biotech*. 2015;5(4):455–63.
 59. Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, Aqil T, Zulifqar Z, Tariq A, et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *J Radiat Res Appl Sci*. 2014;7(2):222–9.
 60. Quintero J, Acosta A, Mejía C, Ríos R, Torres AM. Purification of lactic acid obtained from a fermentative process of cassava syrup using ion exchange resins. *Rev Fac Ing*. 2012;(65):139–51.
 61. Yuwono SD, Nugroho RH, Mulyono, Buhani, Suharso, Sukmana I. Purification of lactic acid from cassava bagasse fermentation using ion exchange. *ARNP J Eng Appl Sci*. 2017;12(12):3853–7.
 62. Msuya N, Minja RJA, Katima JHY, Masanja E, Temu AK. Separation and Purification of Lactic Acid from Sisal Wastes. *Am J Chem [Internet]*. 2018;8(1):13–8. Available from: <http://journal.sapub.org/chemistry>
 63. González MI, Álvarez S, Riera F, Álvarez R. Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. *J Food Eng*. 2007 May;80(2):553–61.

64. González MI, Alvarez S, Riera FA, Álvarez R. Lactic acid recovery from whey ultrafiltrate fermentation broths and artificial solutions by nanofiltration. *Desalination*. 2008 Aug;228(1-3):84-96.
65. Serna-Cock; Rodríguez-de Stouvenel A. El ácido láctico y sus derivados como sales y ésteres. *El ácido láctico y sus Deriv como sales y ésteres* . 2005;5:54-65.
66. Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *J Chem Technol Biotechnol*. 2006 Jul;81(7):1119-29.
67. Nakano S, Ugwu CU, Tokiwa Y. Efficient production of d-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)₂ as a neutralizing agent. *Bioresour Technol*. 2012 Jan;104:791-4.
68. Kwak H, Hwang DW, Hwang YK, Chang JS. Recovery of alkyl lactate from ammonium lactate by an advanced precipitation process. *Sep Purif Technol*. 2012;93:25-32.
69. Lu Z, Wei M, Yu L. Enhancement of pilot scale production of l(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using membrane bioreactor. *Process Biochem*. 2012 Mar;47(3):410-5.
70. Li Y, Shahbazi A, Kadzere CT. Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *J Food Eng*. 2006 Aug;75(4):574-80.
71. Dey P, Linnanen L, Pal P. Separation of lactic acid from fermentation broth by cross flow nanofiltration: Membrane characterization and transport modelling. *Desalination*. 2012 Mar;288:47-57.
72. Mayolo-Deloisa K, Martínez LM, Rito-Palomares M. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Rev Mex Ing Química*. 2012;11(3):415-29.