
	<b>PROCESO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO</b>	<b>CÓDIGO: ID-F-65</b>
	<b>PROPUESTA PROYECTO DE TESIS O PASANTÍA</b>	<b>VERSIÓN 2</b>
		<b>Fecha de Aprobación 06/09/2017</b>

<b>Fecha de diligenciamiento</b>	◀ 14 de marzo de 2018 ▶
----------------------------------	-------------------------

<b>1. Descripción:</b>	
<b>Nivel de Tesis o pasantía</b>	Pregrado ___ Maestría ___ Doctorado <u>x</u> ___
<b>Tema de la Tesis o pasantía</b>	
<b>Duración del proyecto de tesis o pasantía</b>	Pregrado: ___ hasta 10 meses Maestría: ___ hasta 18 meses Doctorado: <u>x</u> hasta 36 meses
<b>Perfil del estudiante solicitado que realizará el proyecto de tesis o pasantía</b>	Doctorado en Ingenierías área química, biotecnología, bioprocesos.
<b>Proponente (Investigador Co-director)</b>	Layanis Mesa Garriga
<b>Centro de Investigación-Sede</b>	Departamento de Bioproductos. Sede Central
<b>Macroproyecto y Producto de la AQ al cual se relaciona (Cuando aplique)</b>	Proyecto de Producción de un aditivo Microbiano (ya aprobado) comienza en Julio
<b>2. Resumen del proyecto de tesis o pasantía:</b>	
<p>La obtención de un aditivo para conservación de cultivos forrajeros del trópico alto de forma económicamente sustentable, basado en la acción sinérgica de bacterias ácido lácticas para disminuir el pH aceleradamente y así evitar las pérdidas de nutrientes del cultivo a la hora de la conservación, constituye un problema a solucionar y una oportunidad de una Oferta Tecnológica para CORPOICA generando un impacto positivo en el sector agropecuario. Este proyecto prevé el diseño y optimización de un medio de cultivo, para el que se busca aprovechar como fuente de carbono, subproductos de otros procesos agroindustriales. También se ha propuesto el estudio y optimización de las condiciones de operación para alcanzar adecuadas concentraciones y rendimiento de biomasa bacteriana (3 bacterias ácido lácticas) con la más alta viabilidad posible, así como la obtención de otros coproductos de interés agroindustrial. Asimismo, se valorarán alternativas de configuración de procesos en batch y fed-batch con el objetivo de maximizar las concentraciones, rendimientos y eficiencia del proceso. Los resultados a obtener brindarán una propuesta tecnológica económicamente sustentable.</p>	

 <small>Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria</small>	<b>PROCESO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO</b>	<b>CÓDIGO: ID-F-65</b>
	<b>PROPUESTA PROYECTO DE TESIS O PASANTÍA</b>	<b>VERSIÓN 2</b>  <b>Fecha de Aprobación 06/09/2017</b>

### 3. Justificación:

La elaboración de ensilajes es una práctica que cada día se extiende más en los sistemas de producción ganadera, siendo preponderante en los sistemas especializados de leche de trópico alto Colombiano. Según las prácticas internacionales, la utilización de ensilajes ha resultado ser positiva para animar la productividad de los animales, principalmente en periodos de restricción de alimento. No obstante, en el sector productivo colombiano, así como en los círculos de las asociaciones de ganaderos existe preocupación acerca de la calidad de ensilajes que actualmente se producen y/o se distribuyen en el país debido principalmente a la baja tecnificación y conocimientos de implementación por parte de los ganaderos. Este panorama es más desolador en la medida que existe una limitada o nula normatividad referente a la evaluación de la calidad nutritiva y microbiológica. Este escenario es una realidad preocupante y plantea la necesidad de intervenir en aspectos relacionados con la producción de ensilajes. Corpoica ha avanzado en frentes como el desarrollo de variedades de avena forrajera y metodologías básicas de la producción de ensilajes de Avena. Sin embargo, para obtener un buen ensilaje se requiere de un aditivo microbiano eficiente e identificar y actuar sobre áreas críticas del desarrollo de preservación de forrajes de forma extensiva a todos los ganaderos. Existen en la región productores “elite” que se esfuerzan en obtener un buen producto y que recurren al uso de aditivos microbianos, importados de países septentrionales, que les garanticen un buen ensilaje.

El uso de aditivos microbianos a base de bacterias ácido lácticas (BAL) para la conservación de ensilajes, es de lejos uno de los métodos más utilizados para conservación de ensilajes. Entre los aditivos de ensilaje, se han estudiado bacterias lácticas homofermentativas como inoculantes para mejorar la conservación del ensilado durante el almacenamiento anaeróbico y la exposición al aire (Ávila *et al.*, 2014). También, en los últimos años se han incluido en los aditivos, BAL heterofermentativas debido a su capacidad para producir ácido acético (Elferink *et al.*, 2001) (Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. & Spoelstra, 2003). El ácido acético es un compuesto antifúngico (Danner *et al.*, 2003) capaz de disminuir la producción de etanol y mejorar la estabilidad aeróbica de los ensilajes (Li *et al.*, 2016) (Wilkinson and Davies, 2013). También, las BAL ofrecen como ventaja la protección de los forrajes del deterioro provocado por hongos que presentan un riesgo potencial a la salud humanos y animales, lo cual se debe principalmente a la producción de compuestos antifúngicos, como ácidos carboxílicos, ácidos grasos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Además de esto, LAB también puede contribuir positivamente al sabor, la textura y el valor nutritivo de los forrajes. (Pawlowska *et al.*, 2012)

Sin embargo, las BAL tienen un gran potencial como organismos de producción para varios compuestos, como ácido láctico, manitol y 1,3-propanodiol, y bacteriocinas y algunas de sus características están surgiendo como particularmente interesantes para las biotransformaciones. (Sauer *et al.*, 2017)

Las BAL producen una variedad de bacteriocinas de diferentes tamaños, estructuras, propiedades fisicoquímicas y espectro inhibitorio. Las bacteriocinas son pequeños péptidos o proteínas que exhiben actividades antimicrobianas y son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y algunos parásitos que compiten entre sí. Se clasifican según su estructura química, masa molecular, mecanismo de acción, termoestabilidad, especificidades antimicrobianas y modificaciones postraduccionales. En general, se dividen en bacteriocinas clase I (péptidos modificados, lantibióticos), clase II (péptidos no modificados, que no contienen lantionina) y clase III (proteínas más grandes, inestables al calor). Hasta el momento, se han informado y aislado más de 230 bacteriocinas de bacterias del ácido láctico. La mayoría de los estudios actuales tratan con bacteriocinas aisladas de alimentos y productos lácteos tradicionalmente fermentados. La conservación de los alimentos tiene una larga tradición y sigue siendo la principal aplicación de las bacterias y bacteriocinas del ácido



**PROCESO  
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**

**CÓDIGO: ID-F-65**

**VERSIÓN 2**

**PROPUESTA PROYECTO DE TESIS O  
PASANTÍA**

**Fecha de Aprobación  
06/09/2017**

láctico. Más recientemente, se han considerado otros beneficios para la salud de humanos y animales y ahora se estudian varias aplicaciones alternativas.(Sauer *et al.*, 2017)

Además, las BAL han sido ampliamente usadas en la industria alimentaria como conservantes naturales, debido a su capacidad para producir compuestos antibacterianos como las bacteriocinas. Del mismo modo, las industrias farmacéuticas han mejorado el uso de estos péptidos bacterianos, con actividad antibacteriana, tratando de reducir el uso indiscriminado de antibióticos en productos alimenticios para el consumo humano y animal. (da Silva Sabo *et al.*, 2014) Por lo que las BAL, a parte de ser utilizadas como cultivo iniciador para la conservación de forrajes aumentando la vida útil y la seguridad de este producto, también en el proceso fermentativo se obtienen gran cantidad de sustancias de alto valor agregado a partir de ellas, como las bacteriocinas y el ácido láctico, lo que la obtención en conjunto contribuiría a la economía del proceso.

Las BAL muestran numerosas actividades antimicrobianas, debido principalmente a la producción de ácidos orgánicos, pero también de otros compuestos, como las bacteriocinas y los péptidos antifúngicos. Varias bacteriocinas con potencial industrial han sido purificadas y caracterizadas. La cinética de producción de bacteriocinas por BAL en relación con los factores de proceso se ha estudiado en detalle a través de modelos matemáticos y biología de sistemas.(De Vuyst and Leroy, 2007)

La utilización de bacteriocinas producidas por BAL como conservante natural de carnes y productos cárnicos ha recibido una atención considerable. Estos productos son perecederos y susceptibles a la contaminación microbiana, lo que lleva a un mayor riesgo para la salud de los consumidores, así como a la pérdida económica en la industria de la carne. La adición directa de bacteriocina como aditivo alimentario es preferible en cuando la inoculación de las células vivas de LAB ya que no pueden producir bacteriemia en el sistema de carne real. La incorporación de bacteriocinas en el empaquetado es, de alguna manera, mejorar la seguridad de la carne. La utilización de bacteriocinas puede contribuir eficazmente a la seguridad alimentaria, especialmente cuando se integran en conceptos disminución por obstáculos(Woraprayote *et al.*, 2016)(Calo-Mata *et al.*, 2008)(De Vuyst and Leroy, 2007).

El ácido láctico tiene diversas aplicaciones en los alimentos, industrias de cerámica, cuero y textiles. Dado que el ácido láctico tiene una alta reactividad debido a que contiene grupos hidroxilo (-OH) y carboxilo (-COOH), juega un papel principal como materia prima química capaz de convertirse en diversos productos químicos tales como ácido acrílico, propilenglicol, acetaldehído y 2,3-pentanediol.

El aumento continuo en la demanda de ácido láctico se ha debido a sus aplicaciones crecientes en la preparación de polímeros biodegradables, suturas médicas y solventes verdes. El ácido láctico se produce industrialmente por síntesis química o por fermentación microbiana. El método biológico tiene la ventaja de que se puede obtener un ácido láctico ópticamente puro eligiendo una cepa de bacterias lácticas, mientras que la síntesis química siempre da como resultado una mezcla racémica de ácido láctico.(Oh *et al.*, 2005)

Para la obtención de forma económicamente sustentable del aditivo microbiano en base a BAL, se han estudiado varios factores que influyen en el proceso tecnológico. Las condiciones de fermentación como el pH, la temperatura y el tamaño del inóculo se consideraron factores importantes para el crecimiento celular, la productividad y el rendimiento de las BAL.(Wang, Tashiro and Sonomoto, 2015) Dado que BAL son bacterias mesófilas, estas pueden crecer a una temperatura máxima de aproximadamente 50 ° C. No obstante, las tasas de crecimiento de las BAL difieren en función de la temperatura de fermentación.(Wang, Tashiro and Sonomoto, 2015)(Sikder *et al.*, 2012; Abdel-Rahman, Tashiro and Sonomoto, 2013; Valerio *et al.*, 2016)

La eficiencia y la economía de la producción de BAL es un problema desde muchos puntos de vista. El obstáculo más serio para la producción de BAL, esencialmente es la disponibilidad y el costo de la materia prima para la fermentación (Liang, McDonald and Coats, 2015)(Sauer *et al.*, 2017). En particular, las fuentes de carbono son importantes, deben ser consumidas por las BAL y se dividen en



PROCESO  
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

CÓDIGO: ID-F-65

VERSIÓN 2

PROPUESTA PROYECTO DE TESIS O  
PASANTÍA

Fecha de Aprobación  
06/09/2017

2 grupos: azúcares purificados como glucosa, xilosa, sacarosa y materiales que contienen azúcar. Sin embargo, el uso de azúcares purificados como materia prima para la producción de las BAL es muy costoso. Desde la perspectiva de la economía de la materia prima en términos de su disponibilidad geográfica, se prefieren los materiales renovables nacionales como los residuos y los recursos no utilizados de la agroindustria debido a su disponibilidad y bajo costo. Actualmente, los esfuerzos de investigación se centran en descubrir nuevas y efectivas fuentes de nutrición y en utilizar nuevas técnicas de fermentación progresiva, lo que permite lograr una alta conversión de sustrato y alta productividad. (Oh *et al.*, 2005)

En cuanto a los sistemas de fermentación se han investigado los modos para la producción de BAL utilizando azúcares purificados y materiales renovables como sustratos, incluyendo la fermentación batch, la fermentación fed-batch, la fermentación semicontinua / batch repetida, entre otros tipos. La fermentación batch ha sido el método más utilizado industrialmente para la producción de BAL. Sin embargo, la mayor desventaja de la fermentación batch es que tanto la concentración de BAL como la productividad disminuyen debido a la inhibición por la alta concentración de sustrato, que es una característica general de la fermentación batch (Hujanen *et al.*, 2001). Un cultivo fed-batch es un cultivo batch alimentado de manera continua o secuencial. Este tipo de proceso generalmente es más eficiente que los procesos batch y continuos, y es especialmente beneficioso cuando los cambios en la concentración de nutrientes afectan la productividad y la biomasa del producto deseado (Iyer and Lee, 1999).

Las bacterias ácido lácticas actúan como fábricas celulares (cell factories) a partir de las cuales pueden obtenerse la biomasa y otros coproductos de alto valor agregado, que deben obtenerse de forma integrada y optimizada para aumentar la rentabilidad del proceso.

### Referencias Bibliográficas

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. (2013) 'Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 31(6), pp. 877–902. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

Ávila, C. L. S. *et al.* (2014) 'The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 97(2), pp. 940–951. doi: 10.3168/jds.2013-6987.

Calo-Mata, P. *et al.* (2008) 'Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products', *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), pp. 43–63. doi: 10.1007/s11947-007-0021-2.

Danner, H. *et al.* (2003) 'Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions.', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), pp. 562–567. doi: 10.1128/AEM.69.1.562.


Elferink, S. J. W. H. O. *et al.* (2001) 'Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1, 2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri* Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and', *Applied and environmental microbiology*, 67(1), pp. 125–132. doi: 10.1128/AEM.67.1.125.

Hujanen, M. *et al.* (2001) 'Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), pp. 126–130. doi: 10.1007/s002530000501.

Iyer, P. V and Lee, Y. Y. (1999) 'Product inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid', *Time*, pp. 371–373.

Li, X. *et al.* (2016) 'Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw', *Animal Nutrition*. Elsevier Ltd, 2(3), pp. 229–233. doi: 10.1016/j.aninu.2016.04.003.

Liang, S., McDonald, A. G. and Coats, E. R. (2015) 'Lactic acid production from potato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixed culture', *Waste management (New*

 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria	<b>PROCESO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO</b>	<b>CÓDIGO: ID-F-65</b>
	<b>PROPUESTA PROYECTO DE TESIS O PASANTÍA</b>	<b>VERSIÓN 2</b>  <b>Fecha de Aprobación 06/09/2017</b>

York, N.Y.). Elsevier Ltd, 45, pp. 51–56. doi: 10.1016/j.wasman.2015.02.004.

Oh, H. *et al.* (2005) 'Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials', *Bioresource Technology*, 96(13), pp. 1492–1498. doi: 10.1016/j.biortech.2004.11.020.

Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H. & Spoelstra, S. (2003) 'Microbiology of ensiling', in Buxton, D.R. Muck, R. E. & Harrison, J. H. (ed.) *Silage Science and Technology*. Madison, p. 31–93.

Pawlowska, A. M. *et al.* (2012) 'Green Preservatives': *Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria*. 1st edn, *Advances in Food and Nutrition Research*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7.

Sauer, M. *et al.* (2017) 'The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 35(8), pp. 756–769. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.05.002.

Sikder, J. *et al.* (2012) 'Techno-economic analysis of a membrane-integrated bioreactor system for production of lactic acid from sugarcane juice', *Biochemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 63, pp. 81–87. doi: 10.1016/j.bej.2011.11.004.

da Silva Sabo, S. *et al.* (2014) 'Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 64, pp. 527–536. doi: 10.1016/j.foodres.2014.07.041.

Valerio, F. *et al.* (2016) 'Improvement of the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of phenylpyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 222, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.011.

De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007) 'Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), pp. 194–199. doi: 10.1159/000104752.

Wang, Y., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. (2015) 'Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits', *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier Ltd, 119(1), pp. 10–18. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.06.003.

Wilkinson, J. M. and Davies, D. R. (2013) 'The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments', *Grass and Forage Science*, 68(1), pp. 1–19. doi: 10.1111/j.1365-2494.2012.00891.x.

Woraprayote, W. *et al.* (2016) 'Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products', *Meat Science*. Elsevier Ltd, 120, pp. 118–132. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.04.004.

#### 4. Objetivos

<b>Objetivo general</b>	Evaluar alternativas tecnológicas para la obtención de un principio activo a base de bacterias ácido lácticas para conservación de cultivos forrajeros del trópico alto y otros coproductos de interés basados en la optimización de las condiciones tecnológicas de producción
<b>Objetivos específicos</b>	1. Determinar mediante la vigilancia tecnológica las alternativas tecnológicas viables para la obtención de un aditivo microbiano basado en bacterias ácido lácticas y otros coproductos utilizando sustratos residuales.





**PROCESO  
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**


**CÓDIGO: ID-F-65**

**VERSIÓN 2**

**PROPUESTA PROYECTO DE TESIS O  
PASANTÍA**

**Fecha de Aprobación  
06/09/2017**

	<p>2. Evaluar las posibilidades de la producción de BAL y coproductos a partir de sustratos residuales como materia prima, a través de su impacto técnico y económico.</p> <p>3. Determinar las mejores condiciones de fermentación para la obtención de biomasa y coproductos a través de parámetros cinéticos y la actividad metabólica de las cepas.</p> <p>4. Evaluar diferentes configuraciones del proceso fermentativo (batch, fed batch) a través de parámetros cinéticos.</p>	
<b>Actividades</b>	Realizar revisión y análisis de la literatura especializada	
	Planificar y ejecutar los experimentos necesarios	
	Analizar los resultados de los experimentos	
	Realizar sesiones científicas en cada semestre	
	Colaborar con otras actividades del proyecto	
	Participar en Congresos nacionales e internacionales	
	Publicar como mínimo dos artículos científicos en revistas WoS	
<b>Presupuesto</b>	Viajes	<Número estimado de viajes valor>
	Materiales requeridos (descripción)	Reactivos Utensilios Vidriería Materiales planificados en el presupuesto del proyecto
	Otros	

	<b>PROCESO INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO</b>	<b>CÓDIGO: ID-F-65</b>
		<b>VERSIÓN 2</b>
	<b>PROPUESTA PROYECTO DE TESIS O PASANTÍA</b>	<b>Fecha de Aprobación 06/09/2017</b>



**Leyanis Mesa Garriga**

Nombre y firma del proponente

<b>APROBACIÓN/AVAL</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>OBSERVACIÓN</b>
<i>Red de innovación</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<i>Comité para el Fortalecimiento y Desarrollo de Capacidades del Talento Humano (Aprueba).</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	