

Revisión sistemática del estado del arte sobre el mejoramiento genético de cepas de
Lactobacillus para mejorar la producción de ácido láctico.

David Fernando Gómez Pacheco y Tatiana Fiallo Maldonado

Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

Juan Carlos González Téllez

Ingeniero Químico, M.Sc.

Codirectora

Viviana Sánchez Torres

Ingeniera Química, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2023

Tabla de contenido

Introducción	10
1 Objetivos	12
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos.....	12
2 Marco conceptual	13
2.1 Ácido láctico.....	13
2.2 Mutagénesis aleatoria	14
2.3 Evolución adaptativa en laboratorio.....	15
2.4 Ingeniería metabólica	15
2.4.1 Ingeniería racional	16
2.4.2 Ingeniería evolutiva.....	17
3 Metodología.....	19
3.1 Búsqueda de estudios primarios	19
3.2 Selección y gestión de documentos.....	20
3.3 Extracción de información	21
4 Resultados	21
4.1 Resultados de búsqueda y selección de publicaciones	21
4.2 Evolución y estado actual de las investigaciones	22
4.3 Tecnologías de modificación genética de cepas <i>Lactobacillus</i>	24
4.3.1 Mutagénesis aleatoria en la producción de ácido láctico	24
4.3.2 Evolución adaptativa en laboratorio en la producción de ácido láctico	27

4.3.3 Ingeniería metabólica en la producción de ácido láctico.....	29
4.4 Condiciones experimentales en las técnicas de modificación genética.....	31
4.4.1 Mutagénesis aleatoria	31
4.4.2 Evolución adaptativa	33
4.4.3 Ingeniería metabólica	34
5 Conclusiones	35
Referencias bibliográficas	37
Apéndices	44

Lista de tablas

Tabla 1. Bacterias homo y hetero fermentativas del género <i>Lactobacillus</i>	14
Tabla 2. Efecto del método de mutagénesis en la producción de ácido láctico	25
Tabla 3. Efectos de la evolución adaptativa en la producción de ácido láctico	27
Tabla 4. Métodos de producción de ácido láctico por ingeniería metabólica	29

Lista de Figuras

Figura 1. Isómeros del ácido láctico.....	13
Figura 2. Esquema de la redirección de ruta y aumento de la expresión genética.....	16
Figura 3. Esquema de la expresión genética heteróloga	17
Figura 4. Esquema de la mezcla de genomas.....	18
Figura 5. Esquema de etapas metodológicas.....	19
Figura 6. Esquema proceso de selección.....	22
Figura 7. Distribución de artículos por año.....	23
Figura 8. Distribución a nivel mundial de los artículos seleccionados	24
Figura 9. Halos transparentes formados por las cepas en la placa de medio selectivo	32

Listas de Apéndices

Apéndice A. Ecuaciones de búsqueda y resultados	44
Apéndice B. Vía metabólica del carbono en la fermentación del ácido láctico	45
Apéndice C. Mapa conceptual de información a extraer de los artículos	46
Apéndice D. Condiciones experimentales método de mutagénesis	46

Glosario

Electroporación: la electroporación se define como una técnica para aumentar la permeabilidad de la membrana celular a moléculas hidrofílicas bajo un campo eléctrico aplicado.

MRS: el termino Man, Rogosa y Sharpe desarrolla principalmente el medio para el cultivo de *Lactobacillus* que muestra una buena productividad para casi todas las bacterias del ácido láctico.

Protoplastos: célula desnuda, rodeada por su membrana plasmática, potencialmente capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse.

Reacción en cadena de la polimerasa: la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés es una reacción química que los biólogos moleculares utilizan para amplificar fragmentos de ADN.

Resumen

Título: Revisión sistemática del estado del arte sobre el mejoramiento genético de cepas de *Lactobacillus* para mejorar la producción de ácido láctico*

Autor: David Fernando Gómez Pacheco, Tatiana Fiallo Maldonado**

Palabras claves: *Lactobacillus*, ácido láctico, mutagénesis, ingeniería metabólica, evolución adaptativa.

Descripción:

Las fermentaciones bacterianas son un enfoque prometedor para la elaboración de productos de valor agregado a partir de sustratos renovables como los residuos agroindustriales. Sin embargo, las bacterias productoras de ácido láctico presentan altos requerimientos nutricionales, inhibición por sustrato y estrés térmico que afectan su productividad, por lo que se han desarrollado estrategias biotecnológicas para mejorar las cepas y obtener el fenotipo deseado.

En el presente trabajo, se estudiaron las investigaciones relacionadas con la modificación genética de cepas de *Lactobacillus* para mejorar la producción de ácido láctico y las condiciones experimentales empleadas en cada una de ellas. Lo anterior, se realizó a través de una revisión sistemática de la literatura empelando una metodología de búsqueda, selección y análisis que dio como resultado un total de 64 artículos.

Se estableció que las principales técnicas de modificación genética de cepas de *Lactobacillus* que aumentan la capacidad productiva de ácido láctico son mutagénesis aleatoria, evolución adaptativa en laboratorio e ingeniería metabólica.

Finalmente se realizó una identificación de condiciones y cualidades que afectan cada técnica de modificación genética, esto permitió esclarecer y concluir que la ingeniería metabólica requiere un gran nivel de información de las rutas metabólicas lo que va asociado a tecnologías de alto costo; por otro lado, la mutagénesis aleatoria tiene un menor alcance y control de los resultados, pero es la base en varios experimentos asociados al mejoramiento genético. En cuanto a la evolución adaptativa se posiciona como la técnica más cómoda y asequible para experimentar condiciones de estrés de pH, temperatura o concentración de manera progresiva.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director Juan Carlos González Téllez. Codirector Viviana Sánchez Torres.

Abstract

Title: Systematic review of the state of art about genetic modification of *Lactobacillus* strains to improve lactic acid production.*

Author: David Fernando Gómez Pacheco, Tatiana Fiallo Maldonado**

Keywords: *Lactobacillus*, lactic acid, mutagenesis, metabolic engineering, adaptive evolution.

Description:

Bacterial fermentations are a promising approach for the elaboration of value-added products from renewable substrates such as agro-industrial waste. However, lactic acid-producing bacteria present high nutritional requirements, inhibition by substrate and thermal stress that improves their productivity, so biotechnological strategies have been developed to improve the strains and obtain the desired phenotype.

In this research, the investigations related to the genetic modification of *Lactobacillus* strains to improve the production of lactic acid and the experimental conditions used in each of them were studied. This was done through a systematic review of the literature using a search, selection and analysis methodology that resulted in a total of 64 articles.

It will be established that the main techniques of genetic modification of *Lactobacillus* strains that increase the productive capacity of lactic acid are random mutagenesis, adaptive evolution in the laboratory, and metabolic engineering.

Finally, an identification of conditions and qualities that disconnect each genetic modification technique was carried out, this allowed clarifying and concluding that metabolic engineering requires a high level of information on metabolic pathways, which is associated with high-cost technologies; On the other hand, random mutagenesis has less scope and control of the results, but it is the basis in several experiments associated with genetic improvement. In terms of adaptive evolution, it is positioned as the most comfortable and affordable technique to progressively experience pH, temperature or concentration stress conditions.

* Bachelor Thesis

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director Juan Carlos González Téllez. Codirector Viviana Sánchez Torres.

Introducción

El ácido láctico es un producto de alto interés en la industria por su gran variedad de aplicaciones comerciales que incluyen alimentos, cosméticos, fármacos y plásticos biodegradables. La demanda de ácido láctico crece anualmente un 16,2% y se espera que su producción mundial supere las 1.960 kilotoneladas para el año 2025 (Abedi & Hashemi, 2020). En cuanto a nivel nacional, la encuesta anual manufacturera realizada por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2020) muestra que Colombia produjo 18,98 toneladas de ácido láctico en el año 2020, un dato que tiene bastante contraste al ser comparado con las importaciones nacionales de este producto para el mismo año, que según las cifras publicadas por el Centro de Comercio Internacional (ITC, 1999-2019) alcanzó las 1.999 toneladas. Esto evidencia que la producción nacional no alcanza para cubrir la demanda de ácido láctico en el país.

La producción de ácido láctico se puede realizar por ruta química o biotecnológica. La vía fermentativa tiene la ventaja de formar el isómero D (-) o L (+) ácido láctico ópticamente puro cuando se selecciona el microorganismo apropiado, por ello alrededor del 90% del ácido láctico producido en el mundo es elaborado por la ruta fermentativa (Alves De Oliveira et al., 2018). Además, la ruta biotecnológica también posee otros beneficios como la utilización de sustratos renovables baratos, bajas temperaturas de producción y bajo consumo de energía.

Pero no todo es positivo, también existen problemas asociados con la producción de ácido láctico por fermentación como el estrés ácido, térmico y osmótico al cual son sometidas las bacterias y productos tóxicos que afecta la actividad metabólica de las células y su productividad (Zhu et al., 2018).

Teniendo en cuenta lo anterior, el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA de la Universidad Industrial de Santander, trabaja en el procesamiento de lactosuero para ser usado en la fermentación láctica, encontrándose ahora en etapas de escalado del

proceso, y de evaluación de fuentes de nitrógeno alternativas. En este momento es de especial interés el mejoramiento de cepas, en cuanto a una mayor resistencia a la salinidad del medio, asimilación de fuentes de nitrógeno de bajo costo, y tolerancia a mayores niveles de acidez. Por estas razones toma gran valor una revisión estructurada del estado del arte, en cuanto a técnicas de modificación genética del género *Lactobacillus* que mejoren la producción de ácido láctico y reduzca los costos asociados a los requerimientos nutricionales de las bacterias.

1 Objetivos

1.1 Objetivo general

Realizar una revisión sistemática del estado del arte sobre las investigaciones relacionadas con la modificación genética de cepas de *Lactobacillus* para mejorar la producción de ácido láctico.

1.2 Objetivos específicos

Describir las tecnologías de modificación genética de cepas de *Lactobacillus* que aumentan la capacidad productiva de ácido láctico.

Identificar las condiciones experimentales empleadas para las diversas técnicas de modificación genética de cepas de *Lactobacillus*.

Clasificar según su función genética las mutaciones de cepas *Lactobacillus* que han generado las mayores mejoras en la producción de ácido láctico.

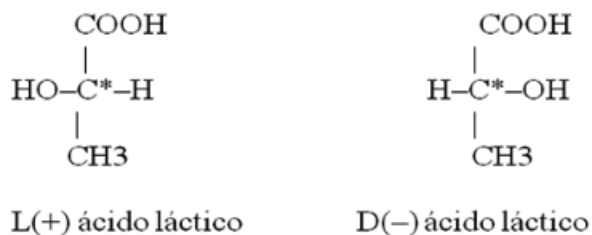
2 Marco conceptual

2.1 Ácido láctico

El ácido láctico es un compuesto orgánico de baja volatilidad conocido como ácido 2-hidroxiopropanico, posee un carbono asimétrico del cual se derivan dos isómeros ópticos el D (-) láctico y el L (+) láctico (Figura 1), y una forma racémica, además de tener un carácter ácido en medio acuoso y versatilidad de reacción por sus grupos funcionales (Castillo Martinez et al., 2013). Cuando dos enantiómeros se encuentran en cantidades análogas se denomina racémico, sin importar el estado en que se encuentren (McMurry, 2018). La mezcla DL no se utiliza para la elaboración de productos alimenticios, farmacéuticos o de consumo debido a que el isómero D es nocivo para el organismo humano, puede causar deficiencias metabólicas e intoxicaciones (Abdel-Rahman & Sonomoto, 2016).

Figura 1

Isómeros del ácido láctico



Nota. Tomado de Revisión de literatura producción de ácido láctico por vía biotecnológica (p. 11), por García et al., 2010, Temas Agrarios, 15 (2).

Las tres variaciones son hidrosolubles y se comercializan en estado líquido, análogamente la recuperación de ácido láctico en varios procesos se da en forma de sal cristalina de lactato de calcio (Estela et al., 2007).

Las especies del género *Lactobacillus* pueden ser homofermentativas las cuales producen principalmente ácido láctico siguiendo la ruta metabólica de Embden-Meyerhof (Apéndice B) y heterofermentativas que elaboran cantidades equimolares de diferentes productos de la

fermentación lo cual disminuye el rendimiento de producción de ácido láctico (Abdel-Rahman et al., 2013) (Tabla 1). En general, las bacterias ácido lácticas tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 45 grados Celsius y pH ácidos inferiores a 5 (Castillo Martinez et al., 2013). En condiciones anaerobias y exceso de sustrato, las bacterias ácido lácticas homolácticas producen 2 moles de piruvato por cada mol de glucosa catabolizada, de esta forma siguiendo el proceso bioquímico redox oxidando la coenzima NADH y reduciendo el piruvato producto de la glucólisis, se obtiene ácido láctico y energía en forma de ATP (Singh et al., 2006).

Tabla 1

Bacterias homo y hetero fermentativas del género Lactobacillus

Especie	Homofermentativa	Heterofermentativa	Configuración del ácido láctico
<i>L.delbrueckii</i>	X	-	D (-)
<i>L.lactis</i>	X	-	D (-)
<i>L.bulgaricus</i>	X	-	D (-)
<i>L.casei</i>	X	-	L (+)
<i>L.paracasei</i>	X	-	L (+)
<i>L.rhamnosus</i>	X	-	L (+)
<i>L.plantarum</i>	X	-	DL
<i>L.curvatus</i>	X	-	DL
<i>L.brevis</i>	-	X	DL
<i>L.fermentum</i>	-	X	DL
<i>L.helveticus</i>	X		DL

Nota. Adaptado de Revisión de literatura producción de ácido láctico por vía biotecnológica (p. 13), por Garcia et al., 2010, Temas Agrarios, 15 (2).

2.2 Mutagénesis aleatoria

Proceso que induce un cambio en el material genético, a través de vectores físicos o químicos, con el objetivo de modificar características y facultades de un organismo. Los métodos

de mutagénesis pueden aumentar la tasa de mutación con una operabilidad sencilla (Zhu et al., 2018).

Mutagénesis física: La mutagénesis física se lleva a cabo utilizando mutágenos como rayos ultravioletas, rayos α , rayos β , rayos γ y plasma atmosférico a temperatura ambiente (Zhu et al., 2018). El uso de haces de iones pesados incrementa la productividad de las cepas mutantes (Tian et al., 2021).

Mutagénesis química: La mutagénesis química se desarrolla con el uso de agentes alquilantes, análogos, modificadores de base o guanidina nitrosa (Tian et al., 2021). Algunos agentes mutagénicos son diethyl sulfate, nitrosoguanidina (NTG), 5-bromouracil y ácido nitroso.

2.3 Evolución adaptativa en laboratorio

Modalidad que implica la propagación del microorganismo por varias generaciones aplicando condiciones de estrés selectivas de acuerdo con las facultades que se desean potenciar en la cepa, obteniendo características controladas a largo plazo (Sandberg et al., 2019); por ejemplo, la estrategia de evolución adaptativa es utilizada para mejorar la tolerancia frente altas temperaturas (Tian et al., 2021).

2.4 Ingeniería metabólica

Utiliza métodos biosintéticos con la finalidad de estudiar las vías de metabolismo que promuevan la recombinación genética para obtener cepas mejoradas (Tian et al., 2021). La ingeniería metabólica y la evolución adaptativa otorgan mayor control del proceso de mutación en comparación a las técnicas de mutagénesis aleatoria (Tian et al., 2021). La ingeniería metabólica tiene estrategias que se basan tanto en metodologías evolutivas como racionales.

2.4.1 Ingeniería racional

Contempla la aplicación de información metabólica y genética específica (Figura 2.a) para realizar cambios o variaciones puntuales en las rutas metabólicas. Los resultados esperados son mayoritariamente previstos y característicos (Upadhyaya et al., 2014).

- Redirección de ruta

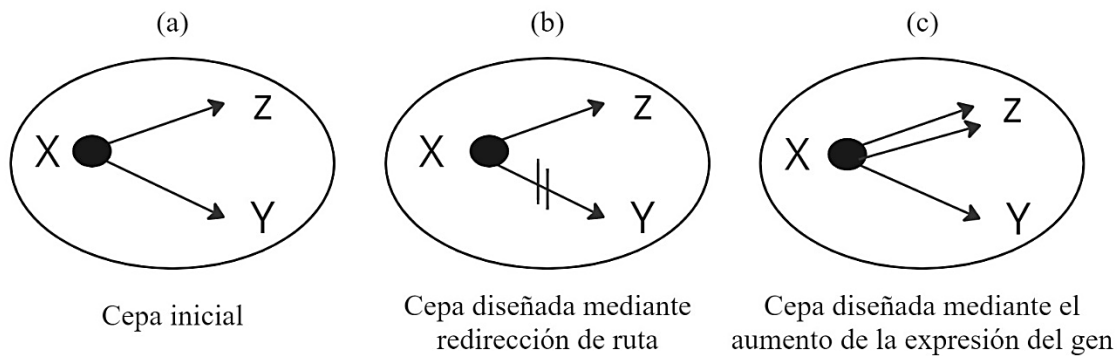
Involucra la modificación genética de la ruta metabólica para suprimir la producción de metabolitos no deseados, la utilización o la producción de energía en estas rutas (Figura 2.b). Gracias a la manipulación que permite este método se han generado mejoras en la pureza óptica del ácido láctico (Okano et al., 2018).

- Aumento de la expresión genética

Complementación de la redirección de rutas donde se busca promover la transcripción del material genético que conforma las enzimas de la ruta deseada (Figura 2.c). Este aumento se realiza clonando los genes apetecidos y expresándolos en un elemento dentro de la célula o cambiando el promotor original por una más eficaz en el cromosoma (Upadhyaya et al., 2014).

Figura 2

Esquema de la redirección de ruta y aumento de la expresión genética



Nota. (a) Sistema de ruta metabólica de la cepa inicial que convierte el sustrato X en un coproducto Y y el producto objetivo Z. (b) Eliminación de las rutas enzimáticas que convierten X en Y, lo que

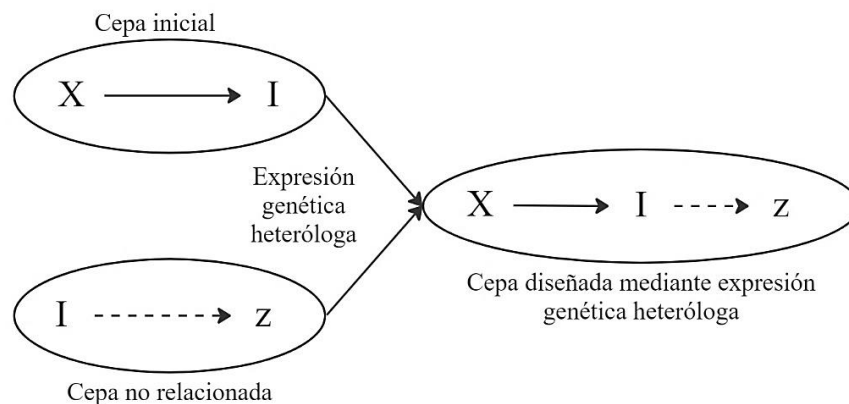
da como resultado un aumento en niveles del producto objetivo Z. (c) Sobreexpresión de las enzimas responsables de convertir X en Z, lo que da como resultado un aumento de los niveles del producto Z. Adaptado de *Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production* (p.641), por Upadhyaya et al., 2014, *Trends in biotechnology*, 32 (12).

- Expresión genética heteróloga

Comprende la modificación de genes no originarios de un organismo, con la introducción de características metabólicas nuevas que mejoren y promuevan las propiedades para la producción de metabolitos deseados (Figura 3). La biología molecular amplía estas aplicaciones, pero no existe un sistema generalizado que sea factible en todos los medios (Huang et al., 2017).

Figura 3

Esquema de la expresión genética heteróloga



Nota. El sistema de vías metabólicas de la cepa inicial convierte el sustrato (X) en un producto intermedio (I) pero carece de la vía enzimática hacia el producto objetivo (Z). La expresión del gen clonado de una cepa no relacionada (capaz de convertir I en Z) permite la conversión de X en Z en la cepa manipulada. Adaptado de *Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production* (p.641), por Upadhyaya et al., *Trends in biotechnology*, 32 (12).

2.4.2 Ingeniería evolutiva.

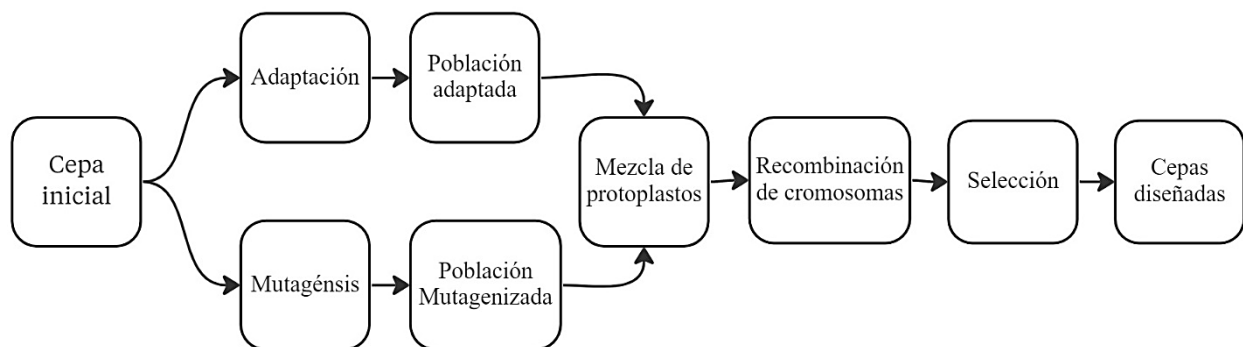
A diferencia de la ingeniería racional, esta técnica busca la transformación progresiva de una minoría de la población con el fin de dar una variabilidad en el genoma, no comprende la transmisión de información genética específica a otros organismos, agiliza el auge de la población más adaptable y variable (Upadhyaya et al., 2014).

- Mezcla de genomas

Mediante la unión de protoplastos se crea una recombinación entre los genomas dando lugar a mayores posibilidades de seleccionar mutaciones de interés (John et al., 2008). Una población se crea con mutagénesis aleatoria y otra mediante evolución adaptativa en laboratorio, se lleva a cabo el proceso de mezcla de genomas y la población final contiene un banco de información de mutaciones por cromosoma amplio del cual se selecciona el rasgo de interés (Figura 4).

Figura 4

Esquema de la mezcla de genomas



Nota. Adaptado de Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production (p.642), por Upadhyaya et al., 2014, Trends in biotechnology, 32 (12).

- Amplificación del genoma completo (WGA)

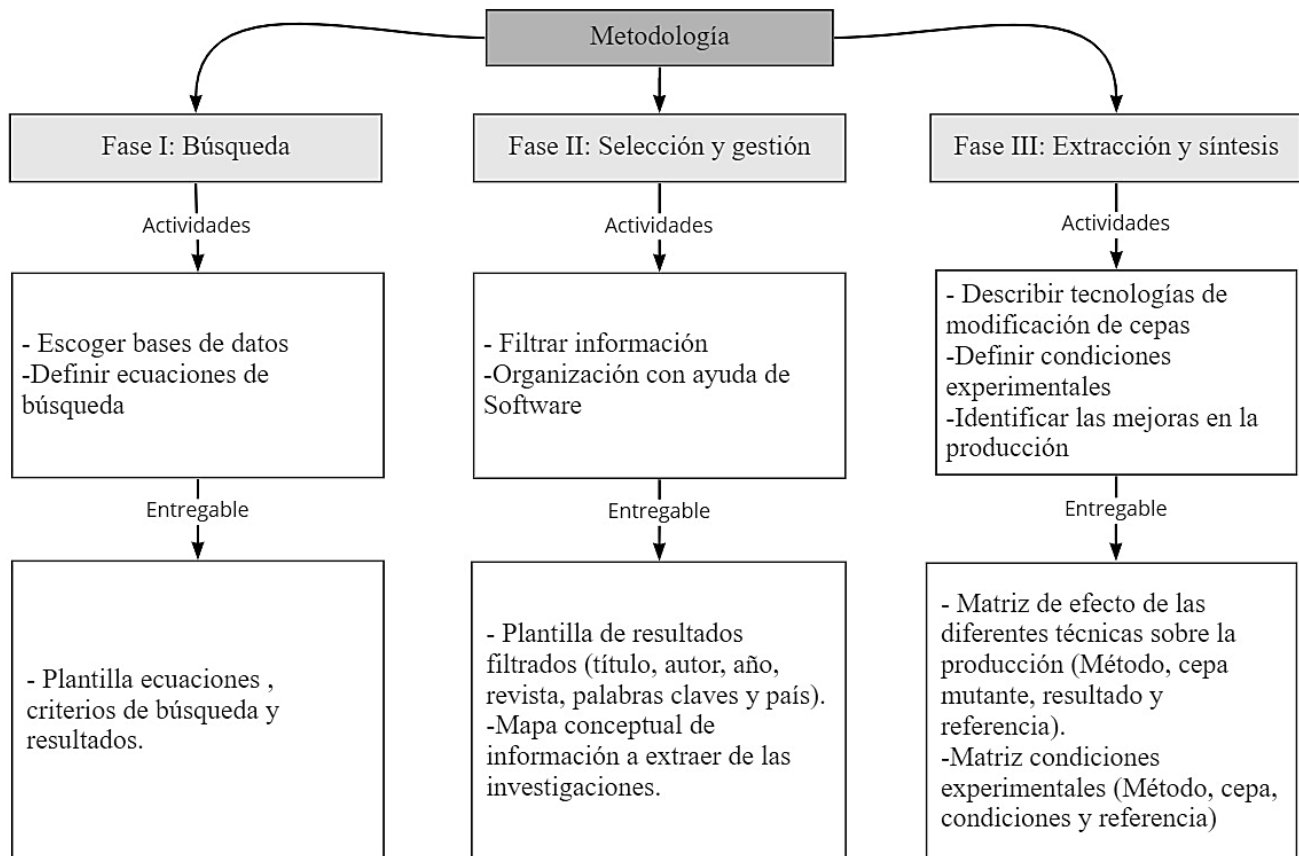
La amplificación del genoma completo o Whole genome amplification por sus siglas en inglés, utilizan cebadores de oligonucleótidos para iniciar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y obtener una plantilla nueva de información genética de interés utilizando una polimerasa que produce mutaciones (Taq) produciendo copias del genoma con cambios aleatorios y estos cambios son nuevamente introducidos en las células por electroporación (Ye et al., 2013).

3 Metodología

La investigación se desarrolló en tres etapas como se observa en la Figura 5.

Figura 5

Esquema de etapas metodológicas



3.1 Búsqueda de estudios primarios

Se inició la búsqueda de documentos en las bases de datos electrónicas disponibles en el catálogo bibliográfico de la Universidad Industrial de Santander (UIS) de las cuales se eligió Scopus. Como fuente de información adicional se utilizó la base de acceso libre PubMed, esta fue seleccionada por su contenido de artículos relacionados con biotecnología y microbiología. Posteriormente se definió la estructura de las ecuaciones de búsqueda teniendo en cuenta las

palabras claves *Lactobacillus*, “lactic acid production”, “metabolic engineering”, “strain modification”, mutagenesis, “adaptative laboratory evolution” y los operadores booleanos (AND o OR). En el Apéndice A se presentan las ecuaciones de búsqueda empleadas en la investigación.

3.2 Selección y gestión de documentos

Finalizado el proceso de búsqueda se inició la selección de los estudios de interés teniendo en cuenta los siguientes parámetros como filtro:

- Año de publicación: Se estableció el periodo de búsqueda entre los años 2000 a 2022.
- Idioma: Se seleccionó el inglés al ser ampliamente utilizado a nivel mundial como idioma estándar para las publicaciones científicas y el español pues es de interés tener en cuenta cualquier publicación realizada nivel nacional o América Latina.
- Título: Los títulos que no contengan al menos una de las palabras claves definidas en las ecuaciones de ecuaciones de búsqueda o que directamente no estén relacionados con el tema de la investigación son descartados.
- Resumen: Después de realizar la lectura de los resúmenes se escogieron aquellos que relacionen alguno de los siguientes temas: (i) Modificación genética de cepas *Lactobacillus* para producción de ácido láctico y (ii) tecnologías de modificación genética de bacterias ácido lácticas.
- Contenido: Se tuvieron en cuenta los documentos que presentaban información de la metodología utilizada para realizar las modificaciones genéticas en las cepas y reportan datos cuantitativos que indican las mejoras generadas sobre la producción de ácido láctico.

La organización de los documentos seleccionados se realizó con ayuda de diferentes herramientas como el gestor de referencias bibliográficas Mendeley que permite confeccionar una planilla con información de año de publicación, autores, fuente, título y resumen de cada

investigación. De igual modo, se utilizó el software Excel para tabular la información más relevante extraída de los estudios primarios y la herramienta X-Mind que facilita el análisis de los documentos con la implementación de mapas conceptuales (Apéndice C).

3.3 Extracción de información

En la revisión se identificaron los documentos de acuerdo con el objetivo que se planteó cumplir, y se extrajo la información teniendo en cuenta los siguientes criterios:

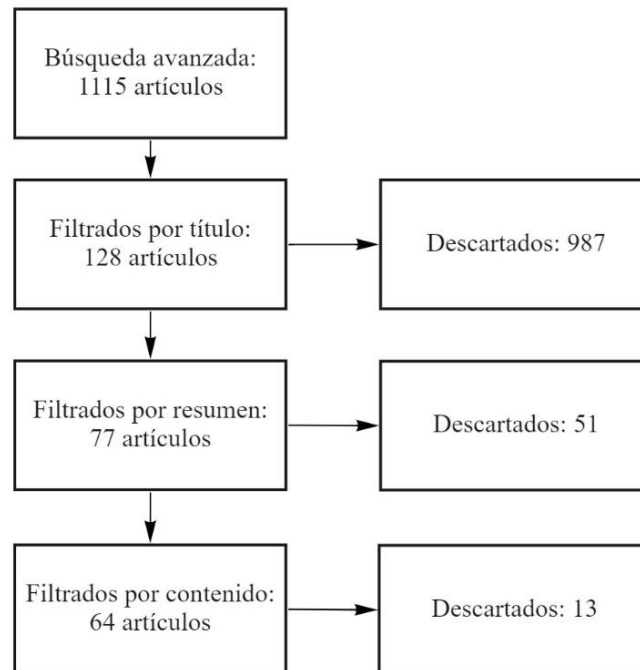
- Cuáles son las técnicas utilizadas para la mejora genética de las cepas *Lactobacillus*.
- En qué consiste cada una de estas técnicas
- Qué condiciones experimentales son usadas para realizar estas modificaciones
- Cuáles fueron los resultados sobre la producción de ácido láctico por las cepas de *Lactobacillus* modificadas.

4 Resultados

4.1 Resultados de búsqueda y selección de publicaciones

Utilizando las ecuaciones de búsqueda expuestas en el Apéndice A se obtuvo un total de 1115 artículos (Figura 6). Teniendo en cuenta que la búsqueda se realizó en dos bases de datos (Scopus y PubMed), los artículos que se encontraron duplicados fueron descartados.

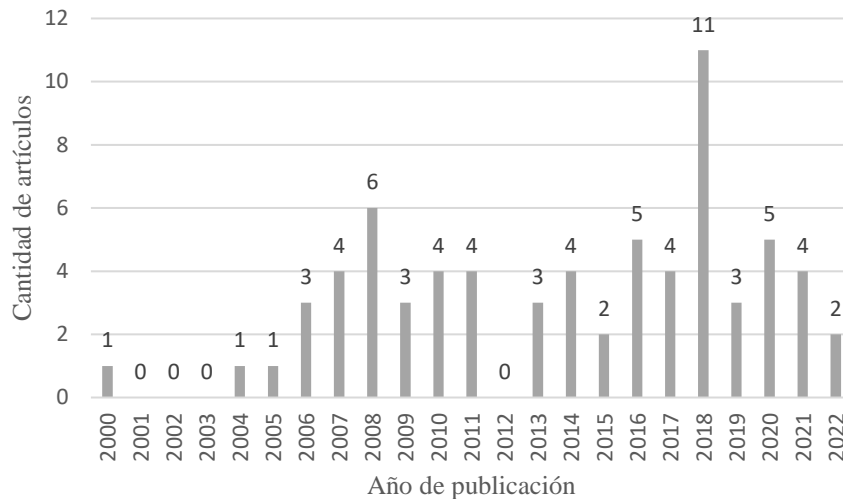
Finalmente, tras el proceso de filtro se seleccionaron 64 artículos con los cuales se desarrolló la fase de extracción de información.

Figura 6*Esquema proceso de selección***4.2 Evolución y estado actual de las investigaciones**

Mejorar la producción de ácido láctico por vía fermentativa es un tema de gran interés para la comunidad científica que busca reducir los costos de producción mejorando el proceso y la productividad. Lo anterior, se ve reflejado en el aumento del número de artículos publicados en los últimos 20 años de acuerdo con lo reportado en las dos bases de datos utilizadas en esta investigación. En el periodo comprendido entre los años 2000 y 2005 el número de publicaciones se mantuvo relativamente bajo, pero a partir del año 2006 en adelante hay un aumento manteniendo un promedio de publicación de cuatro artículos por año. Sin embargo, el 2018 se destaca como el año donde se realizó la mayor publicación de artículos relacionados con nuestro tema de interés estableciendo un máximo de 11 artículos en el mismo año (Figura 7).

Figura 7

Distribución de artículos por año (n=70)

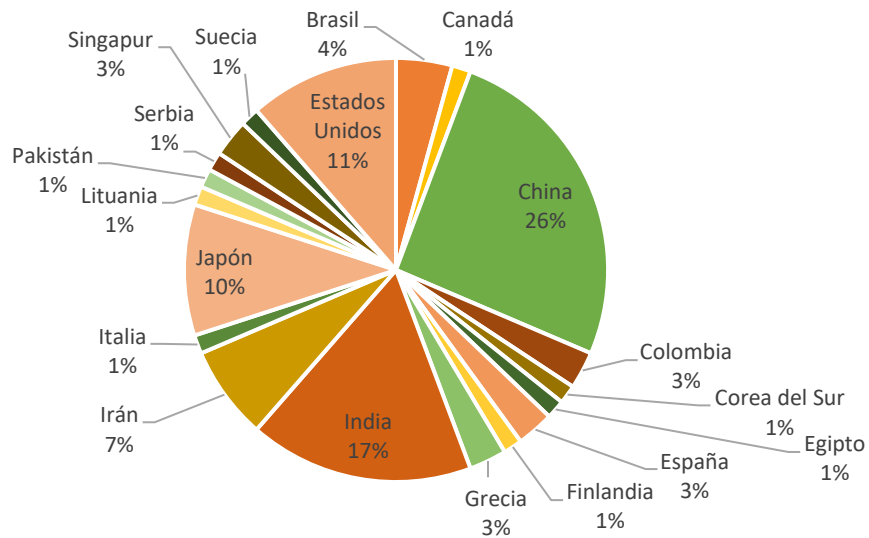


Basados en los datos recolectados en las etapas de búsqueda y selección de artículos se pudo apreciar que Asia sobresale como uno de los continentes con mayor influencia sobre los avances recientes en la producción de ácido láctico por vía biotecnológica (Figura 8.b), destacando países como India y China que representan el 43% del total de artículos de investigación seleccionados (Figura 8.a).

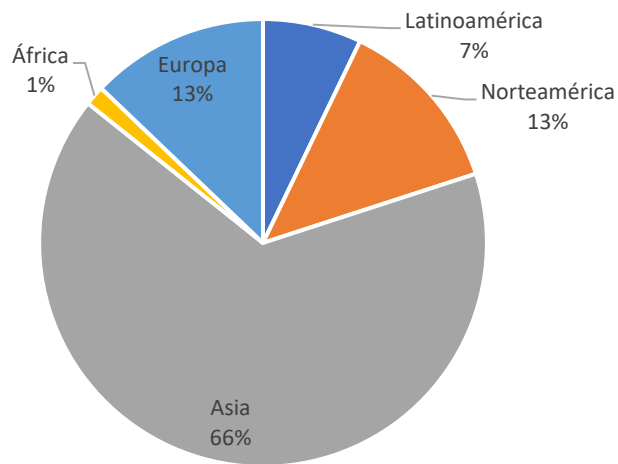
Por otro lado, Latinoamérica tan solo alcanza el 7% del total de artículos publicados, los cuales en su totalidad abordan el tema de modificación genética de cepas para el mejoramiento de la producción de ácido láctico desde una perspectiva de revisión del estado del arte. Lo anterior, ocurre debido a que actualmente los objetivos de los trabajos experimentales realizados en Latinoamérica aún se encuentran dirigidos a optimizar las condiciones de operación y disminuir los costos de producción utilizando nuevos sustratos como los residuos agroindustriales.

Figura 8

Distribución a nivel mundial de los artículos seleccionados (n=70)



(a)



(b)

4.3 Tecnologías de modificación genética de cepas *Lactobacillus*

4.3.1 Mutagénesis aleatoria en la producción de ácido láctico

El método de mutagénesis aleatoria que se utiliza para el mejoramiento genético de las bacterias tiene un efecto importante en el resultado de la mutación del microorganismo. La Tabla

2 da una breve descripción de los trabajos realizados para la mejora de cepas *Lactobacillus* mediante los diferentes tipos de mutagénesis.

Tabla 2

Efecto del método de mutagénesis en la producción de ácido láctico

Método	Tipo	Cepa	Resultado	Referencia
Mutagénesis física	Rayos ultravioleta	<i>L.lactis</i>	La producción fue 73,9% superior comparado con la cepa madre	(Bai et al., 2004)
		<i>L.delbrueckii</i>	Rendimiento de producción del 90%	(Kadam et al., 2006)
		<i>L.delbrueckii</i>	Mejora del rendimiento al 90%	(Adsul et al., 2007)
		<i>L.delbrueckii subsp.delbrueckii</i>	Máximo de productividad de 4,15g/Lh	(Dumbrepatil et al., 2008)
		<i>L.lactis</i>	Mutante con el triple de producción que la cepa salvaje	(Joshi et al., 2010)
Microondas de baja potencia		<i>L.casei subsp.rhamnosus</i>	Aumento en la producción de ácido láctico un 58% en comparación a la cepa inicial.	(Xu et al., 2009)
		<i>L.casei y L.acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i> 45 min exposición 23,46 % mayor concentración de ácido láctico <i>Lb.Casei</i> 60 min exposición 30,99% mayor concentración de LA	(Amanat et al., 2020)
Implantación de iones		<i>L.casei</i>	Incremento en la producción de L-ácido láctico 38g/L más que la cepa salvaje	(Shichang et al., 2011)
Rayos gamma		<i>L.brevis</i>	Aumento de desempeño con respecto a la producción de ácido láctico en 43,73 g/L	(Gomaa & Rushdy, 2014)
Irradiación de iones pesados de carbono		<i>L.thermophilus</i>	Aumento significativo en la producción de ácido L-(+)-láctico 23,16 g/L máxima concentración por el mutante SRZ50 utilizando glucosa	(Hu et al., 2017)
		<i>L.thermophilus</i>	Productividad 16,2% superior a la cepa salvaje	(Jiang et al., 2018)

Mutagénesis química	Ácido nitroso	<i>L.delbrueckii</i>	Mutantes con mayor productividad de ácido láctico con un máximo de 1,55 veces más que la cepa salvaje	(John & Madhavan Nampoothiri, 2008)
	Nitrosoguanidina (NTG)	<i>L.casei</i>	Productividad 97,8 % superior a la de la cepa original	(Ge et al., 2011)

Uno de los tipos de mutagénesis más utilizada es la mutagénesis con rayos ultravioleta como se pudo observar en la Tabla 2, esto se debe a que su operación es simple y económica.

Dumbrepatil et al., 2008 utilizando melaza de azúcar de caña en la cepa mutante *Lactobacillus delbrueckii* Uc-3 aislada por el método de mutagénesis UV obtuvo una concentración máxima de ácido láctico de 166 g/L y una productividad de 4,15 g/(Lh) con control de pH de 6,5.

Adsul et al., 2007 analizando dos sustratos diferentes celobiosa y celotriosa en la cepa *Lactobacillus delbrueckii* Uc-3, concluyó en sus datos que la celobiosa fue el mejor sustrato con una productividad de 2,25 g/Lh y un rendimiento del 90%.

La mutagénesis tradicional (rayos X, UV, γ) requiere mucho tiempo y tiene un espectro de mutación limitado, por lo que es necesario combinar nuevos métodos de mutagénesis con mutación tradicional. En la actualidad, la irradiación de iones pesados ha permitido crear diferentes tipos de nuevos mutantes. Los iones pesados pueden causar una mayor tasa de mutación y un espectro de mutación más amplio debido a su alta transferencia de energía, que pueden producir una ionización densa a lo largo de sus trayectorias, lo que resulta en un daño agrupado complejo e irreparable en el ADN que pueden generar miles de mutantes (Hu et al., 2017).

Jiang et al., 2018 mejoraron la producción de L-ácido láctico de *Lactobacillus thermophilus* SRZ50 utilizando la técnica de mutagénesis de iones pesados de alta eficiencia. El mutante A69 mostró 16,2 % más de productividad que la de la cepa original y basado en la

fermentación discontinua puede acumular 114,2 g/L de L-ácido láctico hasta las 96 h sin control de pH con el valor más bajo de 5,4.

4.3.2 Evolución adaptativa en laboratorio en la producción de ácido láctico

A continuación, se muestra una descripción general de estudios donde se han aplicado estrategias de evolución adaptativa en laboratorio para mejorar los microorganismos en cuanto a su tolerancia al pH bajo, su tasa de asimilación al sustrato y utilización de fuentes de nitrógeno alternativas (Tabla 3).

Tabla 3

Efectos de la evolución adaptativa en la producción de ácido láctico

Cepa	Fenotipo esperado	Estrategia	Resultados	Referencia
<i>L.delbrueckii subsp.lactis</i>	Mejora de la tolerancia al ácido	Aclimatación de las bacterias a un entorno de pH bajo de 5,5 mediante subcultivos repetidos	Rendimiento máximo de producción de ácido láctico a glucosa 90% \pm 1,01% en ciclos de 48 h	(Lee, 2007)
<i>L.casei</i>	Mejora de la tolerancia al ácido	Eliminación del gen <i>mutS</i> y disminución gradual del pH por un período de 100 días	Aumentó 10 veces en el porcentaje de supervivencia en comparación con la cepa original a pH de 2,5	(Overbeck et al., 2017)
<i>L.amylovorus</i>	Capacidad para fermentar almidón de batata	Aumento gradual de las concentraciones de almidón de batata con control de pH	Producción 3,5 veces mayor de ácido láctico por parte de las bacterias adaptadas para 20 g/L de almidón.	(Akoetey & Morawicki, 2018)
<i>L.delbrueckii</i>	Mejora de la tolerancia al ácido	Transferencia continua cada 48 h a un medio con un pH inicial de 4,5 durante aproximadamente 40 subcultivos	La cepa obtenida mostró un aumento de 1,8 veces en la producción de ácido láctico en condiciones ácidas.	(Singhvi et al., 2018)
<i>L.paracasei</i>	Capacidad para fermentar melaza remolacha azucarera	Aumento gradual de las concentraciones de melaza (5-25% p/v)	Concentración de ácido láctico un 59 % mayor que la cepa original con control de pH	(Mladenović et al., 2019)

<i>L.pentosus</i>	Capacidad para fermentar xilosa y tolerancia a pH bajo	Aumento gradual de la relación xilosa: glucosa del medio en un cultivo discontinuo secuencial	La cepa resultante presentó entre 1,5 y 2 veces más consumo de xilosa y producción de ácido láctico que la cepa parental en 20 g/L	(Cubas-Cano et al., 2019)
<i>L.delbrueckii</i>	Capacidad para fermentar melaza de caña y usar harina de soya como fuente de nitrógeno	Aumento gradual de las concentraciones de melaza y harina con control de pH	Concentración de D-ácido láctico de 112,3 g/L, eficiencia promedio de 2,4 g/(Lh), rendimiento de 0,98 g /g y pureza óptica del 99,6%	(Liang et al., 2020)
<i>L.rhamnosus</i>	Mejora de la termotolerancia	Aumento gradual de la temperatura (40, 42, 45, 47, 50 °C) sin control de pH	Productividad de 3,4 g/(Lh) y rendimiento de 0,89 g/g.	(Sun et al., 2021)

En la fermentación tradicional de ácido láctico, la fuente de nitrógeno constituye uno de los mayores costos operativo. Por ello, si las fuentes de nitrógeno como la peptona y el extracto de levadura pudieran reemplazarse en su totalidad o en su mayoría por fuentes de nitrógeno alternativas más baratas, la rentabilidad del proceso aumentaría. Liang et al., 2020 utilizó como fuente de carbono la melaza de caña de azúcar y como fuente de nitrógeno la harina de soya hidrolizada, ambos desechos agroindustriales de bajo costo. Llevó a cabo la adaptación de *Lactobacillus delbrueckii* a los sustratos mediante evolución adaptativa en laboratorio obteniendo como resultado niveles de D-ácido láctico de 112,3 g/L, con una eficiencia de producción promedio de 2,4 g/(Lh), un rendimiento de 0,98 g /g azúcar, y pureza óptica del 99,6%.

Las estrategias evolución adaptativa en laboratorio combinadas con la estrategia de ingeniería metabólica se puede utilizar para optimizar el diseño y acelerar la construcción de cepas de alto rendimiento. El estudio realizado por Overbeck et al., 2017 es un ejemplo perfecto de la combinación de ambos métodos, primero exploraron la inactivación transitoria del gen que codifica la enzima de reparación de desajustes de ADN MutS en la cepa *Lactobacillus casei* y

posteriormente la sometieron a un proceso de evolución adaptativa de 100 días para aumentar la resistencia al pH bajo. Los resultados mostraron que las adaptadas crecieron más rápidamente, a mayores densidades celulares y produjeron más ácido láctico. Además, aumentó 10 veces el porcentaje de supervivencia en comparación con la cepa original a pH de 2,5.

4.3.3 Ingeniería metabólica en la producción de ácido láctico

Los enfoques de la ingeniería metabólica se han explorado en gran medida para mejorar la genética de las cepas *Lactobacillus* como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Métodos de producción de ácido láctico por ingeniería metabólica

Cepa	Enfoque	Estrategia	Resultado	Referencia
<i>L.helveticus</i>	Redirección de ruta y aumento de la expresión génica	Construcción de dos cepas, se elimina el gen <i>ldhD</i> en una y se reemplaza el gen <i>ldhD</i> por <i>ldhL</i> en la otra ¹	Incremento del 20% en la productividad de L-ácido láctico	(Kyla--Nikkila et al., 2000)
<i>L.rhamnosus</i>	Mezcla de genomas	Fusión de protoplastos de cepas expuestas a irradiación UV y mutagénesis con NTG	Aumentos de producción de ácido láctico 26,5% mayor a la cepa salvaje y tolerancia máxima a pH 3,8	(Wang et al., 2007)
<i>L.rhamnosus</i>	Mezcla de genomas	Fusión de protoplastos de cepas expuestas a irradiación UV y mutagénesis con NTG	Incrementos de hasta 71,4% de producción de ácido láctico respecto a la cepa salvaje	(Yu et al., 2008)
<i>L.delbrueckii</i>	Mezcla de genomas	Fusión de protoplastos entre la cepa generada por mutagénesis química y un <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Conversión de almidón en ácido láctico del 96% con control de pH	(John et al., 2008)
<i>L.pentosus</i>	WGA	Amplificación del ADN genómico utilizando cebadores aleatorios y ADN polimerasa Taq	Rendimiento del 95 % en 1 L con tolerancia al ácido de la mutante genéticamente estable.	(Ye et al., 2013)

¹ El lactato deshidrogenasa es una enzima se ha clasificado con base a su producto específico de L-ácido láctico y D-ácido láctico. Las bacterias ácido lácticas poseen los genes *ldhL* y *ldhD* que codifican la proteína (L-LDH) y (D-LDH) respectivamente.

<i>L.paracasei</i>	Redirección de ruta	Interrupción del gen <i>ldhD</i>	Tasa de productividad de L-ácido láctico alta a 5,27 g/(Lh) el rendimiento de 0,97 g/g de azúcares	(Kuo et al., 2015)
<i>L.delbrueckii</i>	Expresión de genes heterólogos	Clonación de genes <i>ldhD</i> y expresión heteróloga en <i>Escherichia coli</i> JM109	Concentración más alto de D -lactato (1,94 g/L) en condiciones anaeróbicas.	(Huang et al., 2017)
<i>L.plantarum</i>	Redirección de ruta	Eliminación del gen <i>ldhD</i> e interrupción del operón <i>larA-E</i>	Rendimiento del mutante 0,91g/g y pureza óptica del 98,6%.	(Okano et al., 2018)
<i>L.acetotolerans</i>	Expresión de genes heterólogos	Clonación de los genes <i>ldhL</i> y <i>ldhD</i> , y expresión heteróloga en <i>Escherichia coli</i>	Clonación exitosa, gen <i>ldhL2</i> inhibió la producción de L-ácido láctico	(Goto et al., 2018)

La técnica de ingeniería metabólica permite manipular las rutas metabólicas para aumentar la producción de metabolitos de interés o la supresión de productos no deseados. Con este método la pureza óptica del ácido láctico aumenta de tal manera que se puede inhibir la expresión del gen que produce el racémico D (-) o el L (+) dependiendo de las características del metabolito deseado (Upadhyaya et al., 2014).

Huang et al., 2017 con la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y el uso de clonación encontró que en la cadena D -LDHs específicamente la región Ldb0101 regulaba la presencia de oxígeno en el metabolismo asociado al isómero D, con esto pudo obtener la cepa mutante *Escherichia coli* JM109 y producir 1,94 g/L de D -lactato en condiciones anaeróbicas.

Okano et al., 2018 para la producción de ácido láctico crea un mutante de la cepa *Lactobacillus plantarum* la cual produce una mezcla racémica DL, con ayuda de la técnica de ingeniería metabólica logra eliminar el gen *ldhD* asociado a la producción D (-), obteniendo un rendimiento de 0,91g/g y una pureza óptica de L (+) ácido láctico de 98,6%.

4.4 Condiciones experimentales en las técnicas de modificación genética

Todos los métodos de mejoramiento ejecutan un cultivo previo de los organismos a tratar, para aclimatar y garantizar que a las condiciones de estrés o procedimientos genéticos que sean sometidos, no perjudiquen el crecimiento y el avance de la población (Mavrommati et al., 2022; Tian et al., 2021).

4.4.1 *Mutagénesis aleatoria*

Se pudo observar en los diferentes artículos que para la aplicación del método de mutagénesis por radiación ultravioleta se utilizó una longitud de onda de 254 nm, irradiando la muestra en un rango de 6-20 cm por un periodo de 1-40 min (Bai et al., 2004; Kadam et al., 2006). Hay que tener en cuenta que autores como Joshi et al., 2010, reportaron una mortalidad aproximada del 99% cuando las cepas se expusieron a la luz ultravioleta durante 17 min.

Existen otras técnicas de mutagénesis novedosas que obtienen cepas *Lactobacillus* robustas de manera más efectiva, como la mutagénesis de iones pesados y la mutagénesis por haces de iones de baja energía. La diferencia principal entre estas dos radica en la transferencia de energía lineal (LET) que hace referencia a la cantidad de energía que una partícula ionizante transfiere al material atravesado por unidad de distancia; los iones pesados usados en el mejoramiento biológico pueden variar de 30 a 150 KeV/ μ m, mientras que los de baja energía están por debajo de 10 KeV/ μ m (Zengliang, 2000).

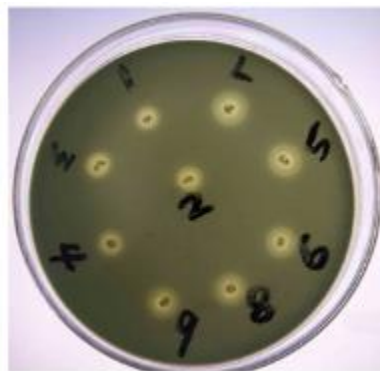
La irradiación de iones de baja energía presenta ventajas como una tasa de mutación más alta, un espectro más amplio y menor tasa de lesión de bacterias que los métodos de mutación tradicionales. Shichang et al., 2011 utilizó la estrategia de irradiación de iones de nitrógeno de baja energía en la cepa *Lb.casei* con una potencia de salida de 10 keV en un entorno seco y vacío, estas

condiciones de vacío hicieron un gran daño en las células por lo que la tasa de supervivencia disminuyó con el aumento del tiempo de exposición en un entorno de vacío.

En la mayoría de los artículos consultados la detección inicial de los mutantes con producción mejorada de ácido láctico después de ser tratados con mutagénesis se realizó por medio diámetros de halos de transparencia y experimentos de fermentación. La técnica de halos de transparencia consiste en placas agar que contiene medio selectivo; para la investigación de Shichang et al., 2011, se usó un medio selectivo que contenía CaCO_3 con el fin de que el ácido láctico producido por las colonias neutralizara el CaCO_3 y se formara los halos transparentes (Figura 9). Estas técnicas cualitativas pueden llevar mucho tiempo y en algunos casos ser ineficaces como lo reportó Hu et al., 2017 que al realizar la selección de los mutantes de la cepa *Lb.thermophilus* encontró que algunas cepas con halos de mayor diámetro mostraron una baja concentración de L-ácido láctico.

Figura 9

Halos transparentes formados por las cepas en la placa de medio selectivo



Nota. Tomado de Mutation-Screening in L-(+)-Lactic Acid Producing Strains by Ion Implantation (p. 141), por Shichang et al., 2011, *Indian Journal of Microbiology*, 51 (2).

Teniendo en cuenta lo anterior, vale la pena destacar que se han establecido nuevas estrategias de selección que utilizan el proceso de detección de alto rendimiento basado en placas

de microtitulación. Jiang et al., 2018 muestra la aplicación de manera exitosa de esta metodología en su estudio de producción mejorada de L-ácido láctico por *Lactobacillus thermophilus SRZ50* generado por mutagénesis de iones pesados; después de la irradiación las colonias de la cepa se transfirieron a placas de microtitulación de fondo en U de 24 pozos que contenían 3 mL del medio de cultivo, utilizando una incubadora rotativa a 50°C y 100 rpm por 24 h. Este proceso de selección también se realizó en matraces de agitación a las mismas condiciones, pero con un volumen de 25 mL. Los resultados de la investigación mostraron comportamientos similares de los parámetros del proceso de fermentación entre ambas metodologías lo que sugiere que la microtitulación podría aplicarse como una herramienta de reducción de escala.

Las condiciones mencionadas anteriormente para cada uno de los métodos de mutagénesis se encuentran de manera más detallada en el Apéndice D.

4.4.2 Evolución adaptativa

Debido a que el método consiste en la transmisión de información genética de generación en generación para la expresión de ciertas características deseadas se busca estructurarlo generalmente en un primer cultivo por lotes y ciclos de repetición hasta el punto de evidenciar cambios en el factor a evaluar como temperatura, acidez, etc. Una de las condiciones de cultivo inicial es fijar la concentración del sustrato, seguidamente se monitorea el crecimiento hasta el punto de hacerse estático, como criterio de parada. Después se aumenta la concentración progresivamente como factor de estrés, además la temperatura con un valor promedio de 42 °C es el óptimo para el crecimiento (Lee, 2007; Liang et al., 2020; Singhvi et al., 2018).

El estrés ácido es otra condición que influye en el crecimiento de la bacteria y posteriormente en su metabolismo, varios autores utilizan un pH ácido con control para mantenerlo

constante con ayuda de un agente acidificante, el valor ronda entre 6,5 a 5,5 (Mladenović et al., 2019; Overbeck et al., 2017; Sun et al., 2021).

Por otro lado, la aclimatación a condiciones de acidez para obtener un mutante resistente es una opción para crear una población más tolerante, la disminución de pH progresiva de 7 hasta 4,5 entre las generaciones permite el crecimiento, pero en los valores más bajos ocurre la inhibición del pH ácido/ácido láctico (Singhvi et al., 2018).

Un factor por considerar es la temperatura, al llevar la población con control de pH, de una temperatura de 40 °C hasta 50 °C gradualmente se obtuvieron mutantes termotolerantes (Sun et al., 2021).

4.4.3 Ingeniería metabólica

El dominio genético que utiliza este método no estandariza condiciones las cuales afecten la creación de los mutantes, el previo estudio de información requerido para realizar estas prácticas contiene el conocimiento genético y metabólico de las cepas a mejorar, los puntos de acción en donde ejecutar la mutación y toda la teoría bioquímica requerida. No obstante, se analizaron cualidades similares que se utilizan dependiendo de la estrategia utilizada.

En la técnica de redirección de ruta uno de los puntos estratégicos es el uso de cebadores, como herramientas para ubicar y actuar sobre regiones del genoma asociadas a la producción de los metabolitos de interés, de tal forma que disminuya la actividad enzimática de un producto y aumente la disponibilidad de piruvatos para otras enzimas (Kuo et al., 2015). Estos nucleótidos transforman el material genético mediante la electroporación de los fragmentos nuevos de material genético, mutados con ayuda de una polimerasa Taq, a los puntos de acción previamente marcados por los cebadores (Okano et al., 2018).

En la estrategia de expresión genética heteróloga se tiene una copia plantilla del gen que se quiere implantar, purificando y uniéndolo aún un vector de clonación, este es un plásmido codificado para unirse al gen y ser introducido mediante electroporación a una cepa diferente, el punto clave es tener esta afinidad necesaria del vector para que la cepa huésped no rechace el procedimiento (Huang et al., 2017).

Para la mezcla de genomas, se complementa con la mutagénesis de manera que es el punto de partida para tener una población mutante de crecimiento rápido (John et al., 2008). Al tener seleccionada las dos cepas a recombinar se proceden a formar protoplastos utilizando un tampón químico, se requiere la formación de células esféricas para comprobar su formación y proceder al barajado del genoma (Yu et al., 2008).

Uno de los factores comunes antes de la mezcla de protoplastos es la disposición de ellos, se mezclan y se dividen en 2 partes iguales para mejorar la variabilidad antes de comenzar el proceso enzimático de inactivación y posteriormente de formación de bibliotecas de mutantes (Wang et al., 2007).

5 Conclusiones

De acuerdo con los estudios encontrados se concluye que las principales estrategias de modificación genética de cepas de *Lactobacillus* que aumentan la capacidad productiva de ácido láctico son mutagénesis aleatoria, evolución adaptativa en laboratorio e ingeniería metabólica.

Los métodos clásicos de mutagénesis aleatoria (UV, X, γ) son de operación simple, pero tienen poca capacidad de penetración y la tasa de mutaciones beneficiosas en las cepas de *Lactobacillus* es baja comparada con otros métodos.

La utilización de procesos de detección de alto rendimiento como los basados en placas de microtitulación permite superar la limitación de rendimiento en los métodos tradicionales de

mutagénesis aleatoria haciéndolos más eficientes para detectar los mutantes productores de ácido láctico con acumulación mejorada.

La ingeniería metabólica realiza alteraciones específicas de las rutas metabólicas en las cepas de *Lactobacillus* por lo que es necesario comprender el mecanismo molecular o genético detrás, lo cual requiere mucho tiempo y recursos, pero produce resultados particulares y previstos.

Los mecanismos de defensa de las cepas *Lactobacillus* contra pH bajo y alta concentración de sustrato están controlados por múltiples genes ampliamente distribuidos, por esta razón los enfoques de evolución adaptativa realizan una progresión más rápida hacia la mejora en la producción de ácido láctico en comparación con la ingeniería metabólica.

Referencias bibliográficas

- Abdel-Rahman, M. A., & Sonomoto, K. (2016). Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *Journal of Biotechnology*, 236, 176–192. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2016.08.008>
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877–902. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.04.002>
- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04974>
- Adsul, M., Khire, J., Bastawde, K., & Gokhale, D. (2007). Production of Lactic Acid from Cellobiose and Cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* Mutant Uc-3. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15), 5055–5057. <https://doi.org/10.1128/AEM.00774-07>
- Akoetey, W., & Morawicki, R. (2018). The effect of adaptation of *Lactobacillus amylovorus* to increasing concentrations of sweet potato starch on the production of lactic acid for its potential use in the treatment of cannery waste. *Journal of Environmental Science and Health*, 53(12), 802–809. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1505076>
- Alves De Oliveira, R., Komesu, A., Vaz Rossell, C. E., & Filho, R. M. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design-From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 219–239. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>
- Amanat, S., Mazloomi, S. M., Asadimehr, H., Sadeghi, F., Shekouhi, F., & Mortazavi, S. M. J. (2020). *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus Casei* Exposed to Wi-Fi Radiofrequency Electromagnetic Radiation Show Enhanced Growth and Lactic Acid Production. *Journal of*

Biomedical Physics and Engineering, 10(6), 745–750.

<https://doi.org/10.31661/JBPE.V0I0.1056>

Bai, D. M., Zhao, X. M., Li, X. G., & Xu, S. M. (2004). Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L(+)-lactic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6), 681–689.

<https://doi.org/10.1002/bit.20274>

Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez González, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 70–83.

<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2012.11.007>

Centro de comercio Internacional. (1999-2019). *Trade Map estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas*.

https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry_TS.aspx?nvpm=3%7c170%7c%7c%7c%7c291811%7c%7c%7c6%7c1%7c1%7c1%7c2%7c1%7c2%7c2%7c1%7c1

Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., & Tomás-Pejó, E. (2019). Evolutionary engineering of *Lactobacillus pentosus* improves lactic acid productivity from xylose-rich media at low pH.

Bioresource Technology. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121540>

Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (16 de julio de 2020). *Encuesta Anual Manufacturera*. https://microdatos.dane.gov.co/index.php/catalog/MICRODATOS/about_collection/6/?per_page=5

Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J., & Gokhale, D. (2008). Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 333–335.

<https://doi.org/10.1128/AEM.01595-07>

- Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., & Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 271–275. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
- Garcia, C. A., Arrázola, G. S., & Durango, A. M. (2010). Revisión de literatura producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios*, 15(2), 9–26.
- Ge, X. Y., Yuan, J., Qin, H., & Zhang, W. G. (2011). Improvement of l-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 73–78. <https://doi.org/10.1007/S00253-010-2868-9/FIGURES/4>
- Gomaa, E. Z., & Rushdy, A. A. (2014). Improvement of *Lactobacillus brevis* NM101-1 grown on sugarcane molasses for mannitol, lactic and acetic acid production. *Annals of Microbiology*, 64(3), 983–990. <https://doi.org/10.1007/S13213-013-0733-7>
- Goto, S., Motomura, A., Kawahara, A., Shiratsuchi, H., Tanaka, K., & Matsusaki, H. (2018). Cloning and Heterologous Expression of Lactate Dehydrogenase Genes from Acid-Tolerant *Lactobacillus acetotolerans* HT. *Food Science and Technology Research*, 24(5), 861–868. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.861>
- Hu, W., Chen, J., Wu, Q., Li, W., Liu, J., Lu, D., & Wang, S. (2017). The Mutagenesis of *Lactobacillus Thermophilus* for Enhanced L-(+)-Lactic Acid Accumulation Induced by Heavy Ion Irradiation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160337>
- Huang, Y., You, C., & Liu, Z. (2017). Cloning of d-lactate dehydrogenase genes of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and their roles in d-lactic acid production. *3 Biotech*, 7(3), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0822-6/FIGURES/3>

- Jiang, A. lian, Hu, W., Li, W. jian, Liu, L., Tian, X. jiao, Liu, J., Wang, S. yang, Lu, D., & Chen, J. hong. (2018). Enhanced production of l-lactic acid by *Lactobacillus thermophilus* SRZ50 mutant generated by high-linear energy transfer heavy ion mutagenesis. *Engineering in Life Sciences*, 18(9), 626–634. <https://doi.org/10.1002/ELSC.201800052>
- John, R. P., Gangadharan, D., & Madhavan Nampoothiri, K. (2008). Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for l-lactic acid production from starchy wastes. *Bioresource Technology*, 99(17), 8008–8015. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.03.058>
- John, R. P., & Madhavan Nampoothiri, K. (2008). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 3105–3109. <https://doi.org/10.1007/S11274-008-9826-Z>
- Joshi, D. S., Singhvi, M. S., Khire, J. M., & Gokhale, D. v. (2010). Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for d-lactic acid production. *Biotechnology Letters*, 32(4), 517–520. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0187-y>
- Kadam, S. R., Patil, S. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gokhale, D. v. (2006). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2005.06.007>
- Kuo, Y. C., Yuan, S. F., Wang, C. A., Huang, Y. J., Guo, G. L., & Hwang, W. S. (2015). Production of optically pure l-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and d-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain. *Bioresource Technology*, 198, 651–657. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.09.071>
- Kylaˆ-Nikkilaˆ, K., Hujanen, M., Leisola, M., & Palva, A. (2000). Metabolic Engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for Production of Pure L(-)-Lactic Acid. *Applied AND*

- Environmental Microbiology*, 66(9), 3835–3841. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3835-3841.2000>
- Lee, K. B. (2007). Enhanced production of lactic acid by an adapted strain of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1317–1320. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9358-y>
- Liang, S., Jiang, W., Song, Y., & Zhou, S. F. (2020). Improvement and Metabolomics-Based Analysis of d -Lactic Acid Production from Agro-Industrial Wastes by *Lactobacillus delbrueckii* Submitted to Adaptive Laboratory Evolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(29), 7660–7669. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.0C00259/ASSET/IMAGES/LARGE/JF0C00259_0006.JPEG
- Mavrommati, M., Daskalaki, A., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2022). Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 54, 107795. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107795>
- McMurry, J. (2018). *Química orgánica*. Cengage Learning. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat05358a&AN=crai.317303&site=eds-live>
- Mladenović, D., Pejin, J., Kocić-Tanackov, S., Djukić-Vuković, A., & Mojović, L. (2019). Enhanced Lactic Acid Production by Adaptive Evolution of *Lactobacillus paracasei* on Agro-industrial Substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3), 753–769. <https://doi.org/10.1007/S12010-018-2852-X>
- Okano, K., Uematsu, G., Hama, S., Tanaka, T., Noda, H., Kondo, A., & Honda, K. (2018). Metabolic Engineering of *Lactobacillus plantarum* for Direct l-Lactic Acid Production From Raw Corn Starch. *Biotechnology Journal*, 13(5). <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700517>

- Overbeck, T. J., Welker, D. L., Hughes, J. E., Steele, J. L., & Broadbent, J. R. (2017). Transient MutSbased hypermutation system for adaptive evolution of *Lactobacillus casei* to low pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(20). https://doi.org/10.1128/AEM.01120-17/SUPPL_FILE/ZAM999118104S1.PDF
- Sandberg, T. E., Salazar, M. J., Weng, L. L., Palsson, B. O., & Feist, A. M. (2019). The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*, 56, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.004>
- Shichang, L., Zhaoyang, Z., Shaobin, G., Hongxia, L., & Dongdong, W. (2011). Mutation-Screening in L-(+)-Lactic Acid Producing Strains by Ion Implantation. *Indian Journal of Microbiology*, 51(2), 138–143. <https://doi.org/10.1007/S12088-011-0161-Y/FIGURES/8>
- Singh, S. K., Ahmed, S. U., & Pandey, A. (2006). Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41(5), 991–1000. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.004>
- Singhvi, M., Zendo, T., Gokhale, D., & Sonomoto, K. (2018). Greener L-lactic acid production through in situ extractive fermentation by an acid-tolerant *Lactobacillus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6425–6435. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9084-4>
- Sun, Y., Liu, H., Yang, Y., Zhou, X., & Xiu, Z. (2021). High-efficient l-lactic acid production from inedible starchy biomass by one-step open fermentation using thermotolerant *Lactobacillus rhamnosus* DUT1908. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(9), 1935–1941. <https://doi.org/10.1007/S00449-021-02573-Z/TABLES/1>
- Tian, X., Chen, H., Liu, H., & Chen, J. (2021a). Recent Advances in Lactic Acid Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(12), 4151–4171. <https://doi.org/10.1007/S12010-021-03672-Z>

- Tian, X., Chen, H., Liu, H., & Chen, J. (2021b). Recent Advances in Lactic Acid Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(12), 4151–4171. <https://doi.org/10.1007/S12010-021-03672-Z>
- Upadhyaya, B. P., DeVeaux, L. C., & Christopher, L. P. (2014). Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends in Biotechnology*, 32(12), 637–644. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2014.10.005>
- Wang, Y., Li, Y., Pei, X., Yu, L., & Feng, Y. (2007). Genome-shuffling improved acid tolerance and l-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 510–515. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2007.01.011>
- Xu, W., Wang, P., Zhang, X., Zhang, Y., Lin, H.-L., & Shi, X.-H. (2009). Microwave induced mutagenesis of *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* for enhancing L-lactic acid production. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 16(5), 673–677.
- Ye, L., Zhao, H., Li, Z., & Wu, J. C. (2013). Improved acid tolerance of *Lactobacillus pentosus* by error-prone whole genome amplification. *Bioresource Technology*, 135, 459–463. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.10.042>
- Yu, L., Pei, X., Lei, T., Wang, Y., & Feng, Y. (2008). Genome shuffling enhanced l-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*, 134(1–2), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.01.008>
- Zengliang, Z. Y. (2000). Ion beam application in genetic modification. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28(1), 128–132. <https://doi.org/10.1109/27.842882>
- Zhu, Z., Zhang, J., Ji, X., Fang, Z., Wu, Z., Chen, J., & Du, G. (2018). Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018 102:11, 102(11), 4615–4627. [https://doi.org/10.1007/S00253-018-8937-](https://doi.org/10.1007/S00253-018-8937-1)

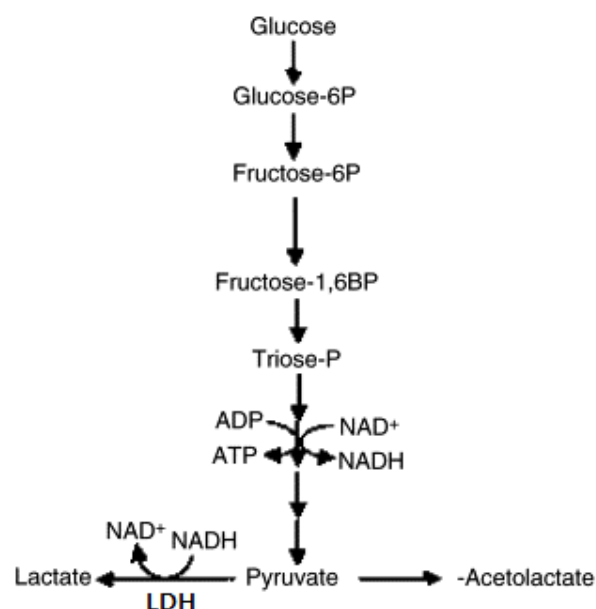
Apéndices

Apéndice A. Ecuaciones de búsqueda y resultados

Criterio de búsqueda	Base de datos	Ecuación de búsqueda	Resultados de búsqueda	Resultados filtrados
Estudios generales y avances recientes de la producción de ácido láctico por la cepa <i>Lactobacillus</i>	Scopus	(TITLE-ABS-KEY (lactobacillus AND “lactic acid production”) AND LANGUAGE (english OR spanish) AND ALL (review OR “state of art” OR “recent advaces”)) AND PUBYEAR > 1999	608	12
	PudMed	((“lactic acid production”) AND (review)) AND (english [Language] OR spanish [Language]) AND (2000:2022[pdat])	72	9
Tecnologías de modificación genética de cepas de <i>Lactobacillus</i> y mejoras en la producción de ácido láctico	Scopus	(TITLE-ABS-KEY (lactobacillus AND “lactic acid production”) AND ALL (mutagenesis OR mutant OR mutation OR “strain modification technology”) AND LANGUAGE (english OR spanish)) AND PUBYEAR > 1999	185	17
	PudMed	((“lactic acid production”) AND (lactobacillus)) AND (mutant OR mutagénesis OR “strain modification technology”)) AND (english [Language] OR spanish [Language]) AND (2000:2022[pdat])	29	1
	Scopus	(TITLE-ABS-KEY (lactobacillus AND “lactic acid production”) AND ALL (“adaptive laboratory evolution” OR “strain adaptation” OR “adaptive evolution” OR “evolutionary engineering”) AND LANGUAGE (english OR spanish)) AND PUBYEAR > 1999	31	7

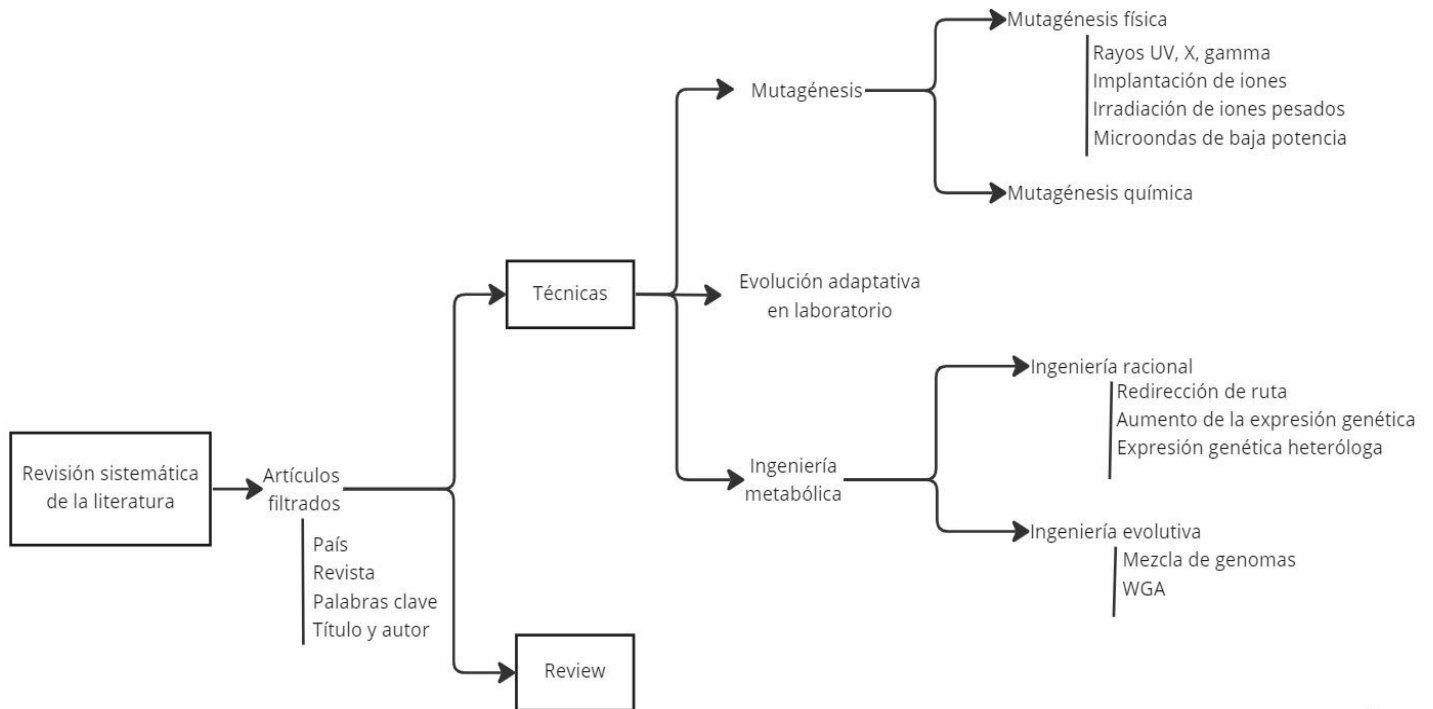
PudMed	((("lactic acid production" OR "lactic acid") AND (lactobacillus)) AND ("adaptive evolution" OR "evolutionary engineering" OR "adaptive laboratory evolution" OR "strain adaptation")) AND (english[Language] OR spanish[Language]) AND (2000:2022[pdat])	17	2
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (lactobacillus AND "lactic acid production") AND ALL ("metabolic engineering" OR "genetic modification") AND LANGUAGE (english OR spanish)) AND PUBYEAR > 1999	100	13
PudMed	((("lactic acid production" OR "lactic acid") AND (lactobacillus)) AND ("genetic modification" OR "metabolic engineering")) AND (english[Language] OR spanish[Language]) AND (2000:2022[pdat])	73	3

Apéndice B. Vía metabólica del carbono en la fermentación del ácido láctico



Nota. Adaptado de Metabolic engineering approaches for lactic acid production (p.992), por Singh et al., 2006, *Process Biochemistry*, 41 (5).

Apéndice C. Mapa conceptual de información a extraer de los artículos



Apéndice D. Condiciones experimentales método de mutagénesis

Cepa	Tipo	Longitud de onda	Tiempo de exposición	Distancia	Referencia
<i>L.lactis</i>	Rayos ultravioleta	254 nm	1-40 min	20 cm	(Bai et al., 2004)
<i>L.delbrueckii</i>		254 nm	10, 20, 30, 45 y 60 s	6 cm	(Kadam et al., 2006)
<i>L.delbrueckii</i>		-	-	-	(Adsul et al., 2007)
<i>L.delbrueckii subsp.delbrueckii</i>		-	-	-	(Dumbrepatil et al., 2008)
<i>L.lactis</i>		254 nm	20 min	6 cm	(Joshi et al., 2010)

Cepa	Tipo	Dosis de irradiación	Tipo de ion	Otros	Referencia
<i>L.brevis</i>	Rayos gamma	30, 60, 90 y 120 Gy	-	-	(Gomaa & Rushdy, 2014)
<i>Lb.casei</i>	Irradiación de iones de baja energía	Dosis de implantación de N ⁺ fue de 50×2,6×10 ¹³ iones/cm ²	Iones de nitrógeno con potencia de salida de 10 keV	Entorno seco y al vacío	(Shichang et al., 2011)
<i>Lb.thermophilus</i>	Irradiación de iones pesados	25, 50, 75, 100, 125 y 150 Gy	Iones de carbono de 80 MeV	LET de 40 Kev/μm	(Hu et al., 2017)
<i>Lb.thermophilus</i>		75 Gy y 100 Gy.	Iones de carbono de 80 MeV	LET de 40 Kev/μm	(Jiang et al., 2018)
Cepa	Tipo	Frecuencia	Tiempo de exposición	Otros	Referencia
<i>Lb.casei subsp.rhamnosus</i>	Microondas de baja potencia	Bajo una potencia de microondas de 400 W y 2450 MHz	Irradiación de 3 min	Circulación de agua de refrigeración	(Xu et al., 2009)
<i>Lb.casei y Lb.acidophilus</i>		Campos electromagnéticos de radiofrecuencia Wi-Fi de 2,4 GHz	15, 30, 45 y 60 min	-	(Amanat et al., 2020)