

Desarrollo de un proceso biotecnológico para la producción de ácido S-láctico a partir de *Rhizopus oryzae* empleando estimulantes de biosíntesis mediante dos fuentes de carbono de origen vegetal a nivel de laboratorio

Blasco, Jervis; Silva, Roselin; Alvarado Almarza, Carlos ^{1*}

¹Center for Chemical Research (CIQ). Laboratory of Industrial Biotechnology (LABIOT).
Faculty of Engineering. University of Carabobo

(*) e-mail: claalmarza@gmail.com

Resumen

El ácido láctico es uno de los ácidos orgánicos de mayor aplicación en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia, entre otras. El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de ácido S-láctico empleando estimulantes de biosíntesis con dos fuentes de carbono de origen vegetal. Se realizaron los procesos unitarios y acondicionamiento de la materia prima; se identificó el microorganismo (*R. oryzae*) según sus características morfológicas a nivel microscópico y macroscópico. Se evaluó la producción de ácido láctico empleando medios de cultivo con diferentes concentraciones de harinas de yuca y batata de 2, 5 y 7%; a diferentes tiempos de fermentación; obteniéndose las mayores producciones de ácido láctico (27.60 y 26.70 g/L) a concentraciones de sustratos de (2% batata – 5% yuca) y 5% de harina de yuca a las 22 h, evidenciando la capacidad amilolítica del microorganismo. Se realizó la identificación del isómero L del ácido láctico a través de una prueba enzimática. De forma análoga empleando los estimulantes [deoxicolato de sodio (1 g/L), glicerol (0.05 g/L), manosa (0.5 g/L)], se obtuvo la mayor producción de ácido S-láctico (16.17 g/L) con el sustrato (2% batata – 5% yuca) y el estimulante (manosa 0.5 g/L) en 24 h.

Palabras Claves: ácido S-láctico, bioprocesos, estimulantes, fuentes de carbono, *Rhizopus oryzae*

Abstract

Lactic acid is one of the most widely used organic acids in the cosmetic, pharmaceutical, chemical and food industries, among others. The objective of this research was to evaluate the production of S-lactic acid using biosynthesis stimulants with two carbon sources of vegetable origin. The unitary processes and conditioning of the raw material were carried out, followed by the identification of the microorganism (*R. oryzae*) by microscopy and macroscopic characteristics. The production of lactic acid was evaluated using culture media with different concentrations of cassava and sweet potato flours of 2, 5 and 7%; at different fermentation times; obtaining the highest productions of lactic acid (27.60 and 26.70 g/L) at substrate concentrations of (2 % sweet potato - 5% cassava) and 5% cassava flour at 22 h, evidencing the amyolytic capacity of the microorganism. The identification of the S isomer of lactic acid was carried out through an enzymatic test. Similarly, using the stimulants [sodium deoxycholate (1 g/L), glycerol (0.05 g/L), mannose (0.5 g/L)], the highest production of S-lactic acid (16.17 g/L) was obtained with the substrate (2 % sweet potato – 5 % cassava) and the stimulant (mannose 0.5 g/L) in 24 h.

Key Words: S-lactic acid, bioprocess, stimulants, carbon sources, *Rhizopus oryzae*

Introducción

La química verde surge como una respuesta a la necesidad de minimizar la contaminación y los riesgos ambientales asociados con la producción industrial y el uso de productos químicos. Se basa en el principio de prevenir la contaminación desde el origen, buscando diseñar procesos químicos más eficientes y menos dañinos para el medio ambiente y la salud humana (Miranda et al., 2024). Es por ello, que esta investigación está dirigida en diseñar un proceso biotecnológico que sea beneficioso para el medio ambiente usando un microorganismo para generar producto de valor agregado, en este caso, ácido S-láctico partiendo de una fuente de carbono de origen vegetal.

El ácido láctico también conocido como ácido alfa-hidroxipropánico (ácido 2-hidroxipropánico), es un compuesto químico orgánico con la fórmula química ($C_3H_6O_3$) que existe en dos isómeros ópticos: S y R ácido láctico. Se forma de manera natural como subproducto de la fermentación bacteriana del azúcar, el almidón de maíz o el suero lácteo, así como en los músculos durante el ejercicio intenso. El isómero S es producido naturalmente en el cuerpo humano y es metabolizado por él, mientras que el isómero R es menos común y puede ser perjudicial (García et al. 2010).

El ácido láctico tiene muchas aplicaciones. En la industria alimentaria y farmacéutica, se utiliza en anticongelantes, biocidas y plastilina, y está presente en la leche, los encurtidos, la soja fermentada, la cerveza y la carne. En la industria cosmética es usado por sus propiedades hidratantes permiten emplearlo como ingrediente en cosméticos para conseguir una piel suave, uniforme y firme para prevenir las arrugas (Aladdim et al. 2015).

Se realizó una investigación experimental de nivel explicativo, donde se consideró: la evaluación de los sustratos seleccionados para la producción de ácido láctico, la caracterización de la materia prima, la obtención de las mejores condiciones experimentales de la fermentación para la producción de ácido láctico, la identificación del estereoisómero S del ácido láctico, la producción de ácido S-láctico usando estimulantes de biosíntesis con las mejores condiciones experimentales de fermentación, y la estimación de los costos de operación a nivel de laboratorio. Esto con el fin de poder

evaluar los rendimientos obtenidos en la producción de ácido S-láctico a partir del hongo *Rhizopus oryzae* empleando estimulantes de biosíntesis mediante dos fuentes de carbono de origen vegetal a nivel de laboratorio.

Materiales y métodos

Material biológico

La cepa del hongo *R. oryzae* se activó a partir de muestras congeladas. Para la activación se sembró asépticamente el hongo previamente hidratado en 6 fiolas individuales (Rivera & Wright, 2020); finalmente, se incubaron a temperatura ambiente hasta el completo desarrollo de las colonias a los 5 días, (Schaad et al., 2001).

Preparación del inoculo del hongo *R. oryzae*

A partir de la cepa reactivada de *R. oryzae* se tomaron colonias del hongo con una edad de crecimiento de 5 días, se realizó un raspado de superficie con la ayuda de un asa de platino, inoculando el hongo en una solución de Tween 80 al 0,1 % en agua desmineralizada estéril. Posteriormente se tomaron 3 muestras de una suspensión de esporas del hongo, y se determinó la concentración microbiana en cámara de Neubauer, y finalmente se ajustó a una concentración de 10^6 esporas/mL (Sánchez & Rosario 2011; Khunnonkwaoa et al., 2012; Gil-Horán et al., 2008; Guevara et al., 2010).

Proceso de fermentación

Se llevó a cabo una fermentación inicial con dos tipos de sustratos: harina de yuca y harina de batata. Esto con el fin de estudiar el comportamiento del hongo *R. oryzae* ante la presencia de la mezcla dos fuentes de carbono y frente a cada una individualmente. El caldo de cultivo estuvo constituido por sales minerales: sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) 2.5 g/L, fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) 0.3 g/L, sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.02 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.15 g/L; y 500 mL de agua desmineralizada; las concentraciones de los sustratos fueron: 3, 5 y 7 % g/L harina de yuca; 3, 5 y 7 % g/L (Alvarado & Pavone, 2015). Se realizó una

segunda fermentación con el fin de escoger las mejores concentraciones para producir la mayor cantidad de ácido láctico, en este caso

se manejaron las mismas cantidades de las concentraciones de las sales, y modificando las concentraciones de los sustratos y las mezcla, que fueron ; 2 y 5 % g/L harina de yuca; 2 y 5 % g/L harina de batata; y la primera mezcla conformada por 2 % de harina de batata y 5% de harina de yuca; la segunda mezcla de 5% de harina de batata y 2 % de harina de yuca.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores de 250 mL con 50 mL de caldo fermentativo por triplicado, más el inóculo de *R. oryzae*, con agitación orbital a 200 rpm y temperatura ambiente. Se tomaron muestras a las 18 y 36 h (Tabla 1). Culminado el tiempo total de fermentación, se procedió a acidificar con ácido clorhídrico (HCl) 4N y separar la

biomasa producida por el microorganismo a través de una filtración por gravedad.

Seguidamente para detener la fermentación del caldo obtenido, éste se esterilizó en autoclave a 10 psi durante de 15 min (Blas & Dulce, 2024).

La concentración del ácido láctico presente en las muestras fue determinada a través del método colorimétrico del cloruro férrico, el cual consistió inicialmente en la preparación de una solución madre de cloruro férrico (FeCl₃) al 0.3 %, posteriormente se tomaron 0.05 mL de la muestra a analizar y se diluyeron en 2 mL de la solución de cloruro férrico y finalmente se midió su absorbancia a una longitud de onda a 390 nm. Las concentraciones de ácido láctico se determinaron mediante una curva patrón de ácido láctico a distintas concentraciones (Alvarado & Pavone, 2015).

Tabla 1. Diseño experimental para la producción de ácido S-láctico.

Factores	Niveles	Variable de respuesta
Concentración (g/L)	3 (-1)	Producción de ácido S-láctico (g/L)
	5 (0)	
	7 (+1)	
Sustrato	Batata (-1)	
	Yuca (+1)	
Tiempo	18 h (-1)	
	36 h (+1)	

Identificación del isómero S del ácido láctico.

Se identificó el producto final de fermentación empleando el método enzimático QuantiQuik™ S-Lactic Acid, QQLLAC10, Lot: BJ11B20 de BioAssay Systems, empleando una muestra de 0,05 mL. Se transfirió una alícuota de muestra a un tubo de reacción que contenía soluciones de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH), la cual reaccionó únicamente con el ácido S-láctico formando una coloración en la banda de identificación. Finalmente, se comparó el color de la banda con una tabla de referencia de ácido S-láctico proporcionada en el paquete, tal como indica Saha, et al. (2021), donde al someter una muestra a la mezcla de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) y LDH (lactato deshidrogenasa), ocurre una serie de reacciones enzimáticas entre el lactato (almohadilla de reacción de la tira) y el NAD⁺ que cambian el color del agente cromogénico (formazán) de blanco a púrpura en la almohadilla (Figura 1).

La interacción del MTT en presencia de LDH y NAD⁺ conducen a la formación de un agente coloreado de tono púrpura que varía en intensidad según la concentración de ácido S-láctico presente en la muestra (Figura 2).

Comparación del rendimiento del ácido láctico con los estimulantes

Después de aplicar el test enzimático, el cual detectó la presencia del ácido S-láctico, se seleccionaron las muestras con las mejores concentraciones, el cual fueron 5 % de harina de yuca y la mezcla compuesta de 5 % de harina de yuca y 2 % de harina de batata, para evaluar el efecto de los estimulantes de biosíntesis en el metabolismo del hongo para la producción de ácido S-láctico. En base de revisión de literaturas se seleccionaron deoxicolato de sodio 1 g/L, glicerol 0.05 g/L y manosa 0.5 g/L (García, et al. 2010), dado que presentaron un mejor efecto en la producción del ácido S. láctico con el *R. oryzae*. El caldo de cultivo estuvo constituido por sales minerales: sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)

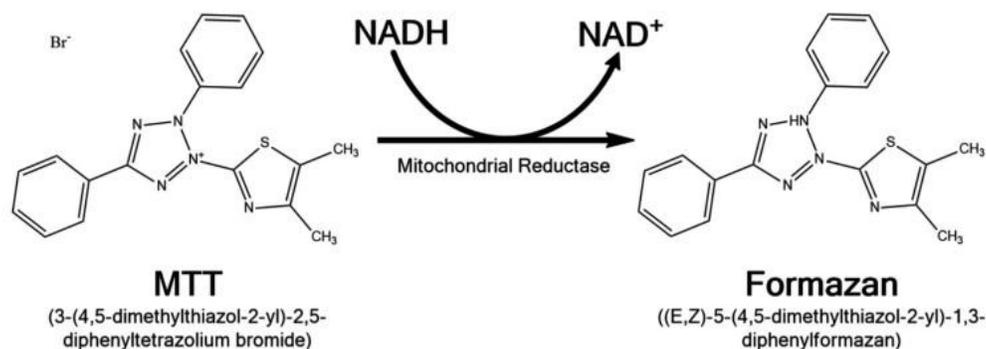


Figura 1. Reacción enzimática del agente cromogénico (MTT) en las tiras de detección QuantiQuick™ S-Lactic Acid

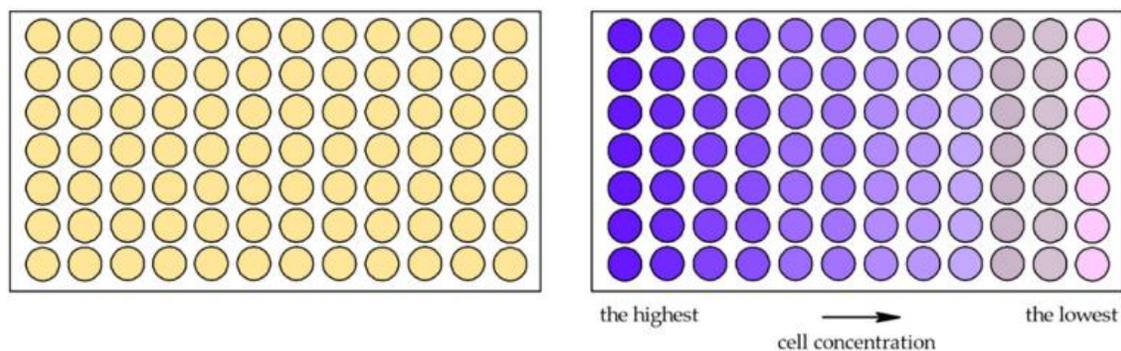


Figura 2. Coloración según la concentración del agente cromogénico en la muestra.

2.5 g/L, fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) 0.3 g/L, sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.02 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.15 g/L; y 500 mL de agua desmineralizada; las concentraciones de los sustratos fueron: mezcla (2 % p/v harina de batata y 5 % p/v harina de yuca), 5 % p/v harina de yuca; y las concentraciones de los estimulantes fueron: deoxicolato de sodio (SDC) 1 g/L, glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) 0.05 g/L y manosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 0.5 g/L. Las fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores aireados de 250 mL con 50 mL de caldo fermentativo, más el inóculo de

R. oryzae con agitación orbital de 200 rpm a temperatura ambiente. Se tomaron muestras a las 20 y 24 h (Tabla 2). Culminado el tiempo total de fermentación se procedió a acidificar con ácido clorhídrico (HCL) 4N, y separar la biomasa producida por el microorganismo a través de una filtración por gravedad. Seguidamente para detener la fermentación del caldo obtenido, éste se esterilizó en autoclave a 10 psi durante de 15 min (Blas & Dulce, 2024).

Se utilizó el método colorimétrico anteriormente descrito para determinar la concentración de ácido S-láctico de las fermentaciones.

Tabla 2. Diseño experimental para la producción de ácido S-láctico con estimulantes.

Factores	Niveles	Variable de respuesta
Sustrato	Mezcla (-1)	Producción de ácido láctico (g/L)
	Yuca (+1)	
Estimulante	Deoxicolato (-1)	
	Glicerol (-0,33)	
	Manosa (0,33)	
	Sin estimulante (+1)	
Tiempo	20 h (-1)	
	24 h (+1)	

Resultados y Discusión

Determinación de ácido láctico

El objetivo de esta investigación fue encontrar las mejores condiciones de operación del proceso que produzca la mayor concentración de ácido S-láctico y evaluar su producción con estimulantes de biosíntesis. Para las fermentaciones realizadas con sustratos de harina de yuca y batata a concentraciones de 3, 5 y 7%, se obtuvieron dos rendimientos de 14.35 y 12.22 g/L con 5% de harina de yuca a las 36 y 18 h respectivamente. Con el resto de las concentraciones evaluadas de yuca (3 y 7 %) y batata (3, 5 y 7 %) no se reportaron concentraciones de ácido láctico.

Se puede observar un comportamiento similar a la investigación (Alvarado & Pavone, 2015) donde obtuvieron un máximo de concentración de ácido láctico (12.91 g/L) en un tiempo de 48 h, con la diferencia de que la presente investigación llegó a obtener una máxima concentración de ácido láctico (14.35 g/L) en un tiempo de 36 h, es decir, la cantidad de nutrientes que posee el sustrato harina de yuca son mayores que los que posee el yare,

lo que promueve una mejora en la producción de ácido láctico en menor tiempo.

En cambio, bajo las concentraciones estudiadas del sustrato harina de batata se observa que el hongo *R. oryzae* no parece producir ácido láctico a las condiciones estudiadas. En la investigación (Huang *et al.* 2005), encontraron que las condiciones óptimas para la sacarificación del almidón de batata y la posterior formación de ácido láctico mediante el hongo *R. oryzae* son una temperatura de 30 °C y un pH de 6.

Un análisis de tiempo realizado a las condiciones anteriormente descritas demostró que durante las primeras 7 h de fermentación, la actividad del hongo *R. oryzae* se encontraba en fase de adaptación, después de 22 h la producción de ácido láctico aumento hasta alcanzar una concentración máxima de 27.60 g/L con la mezcla 1 (2 % harina de batata - 5 % harina de yuca), hasta terminar la fermentación en 24 h (Figura 3). Cabe resaltar que esta concentración ha sido la más alta durante la investigación.

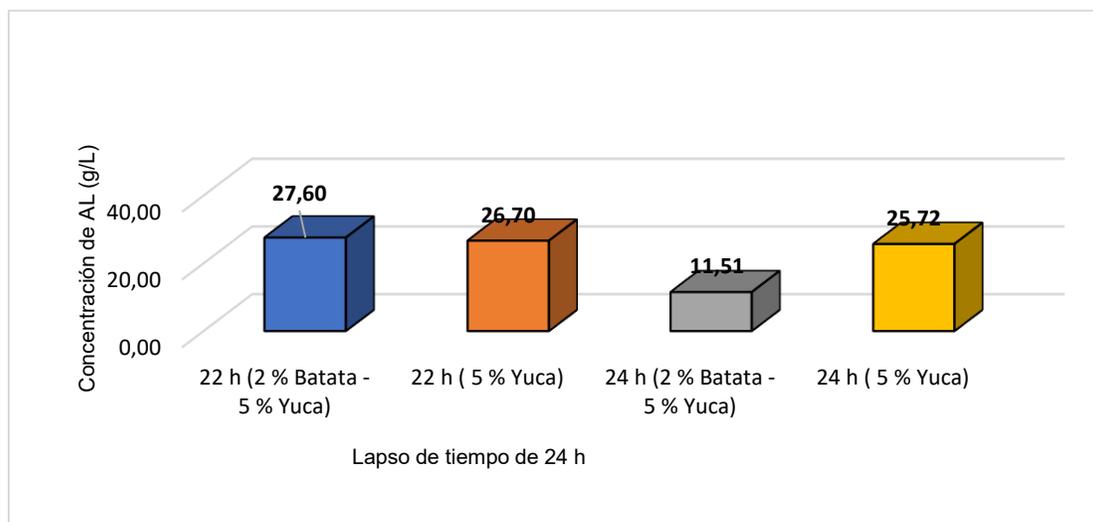


Figura 3. Producción de ácido láctico (AL) contra el tiempo con *R. oryzae* en un lapso de 24 h.

En el diagrama de Pareto (Figura 4) se observa que el efecto de sustrato y tiempo poseen efectos positivos a la variable de respuesta (producción de ácido láctico), es decir, que ambos contribuyen en el rendimiento de ácido láctico, cabe destacar que el tiempo es el que produce el mayor

efecto en el rendimiento de la variable de respuesta, esto quiere expresar, que excede el límite del estadístico F que es 3,80 aproximadamente, esto indica que la producción de ácido láctico se ve afectada de manera positiva (incrementa) con respecto al aumento del tiempo de fermentación hasta un

lapso de 24 h donde se evidencia un máximo. Para el sustrato evaluado el microorganismo alcanza su máxima producción a las 22 h, lo que es diferente a lo reportado en (Alvarado & Pavone, 2015) empleando yare como sustrato. Se podría explicar que la yuca contiene más almidones aprovechables por el

hongo y su capacidad amilolítica así lo demuestra en su crecimiento. Y con el yare hay otros componentes. Sin embargo, se requieren más estudios con diferentes concentraciones para evaluar mejor estos sustratos.

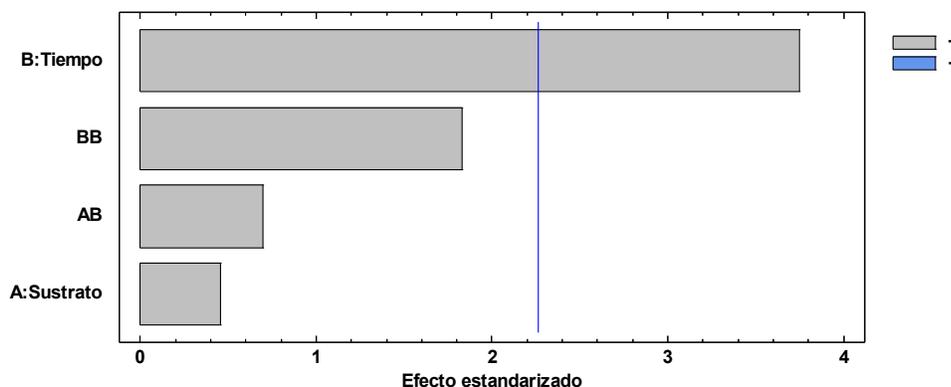


Figura 4. Efecto estandarizado del análisis de tiempo en la producción de ácido láctico durante 24 h.

Para seleccionar el estimulante apropiado, previamente se realizó una búsqueda bibliográfica de investigación acreditadas en las revistas científicas del área, donde se seleccionaron el glicerol y el deoxicolato de sodio como estimulantes, fundamentado en las investigaciones que evidencian las mayores concentraciones de ácido S-láctico obtenidas en las experimentaciones. Adicionalmente, se incorporará manosa tomando en cuenta que es un carbohidrato simple que puede ser fermentado por este hongo como lo establece la investigación (García *et al.* 2010).

Después de realizar un primer experimento se obtuvo los mejores estimulantes (glicerol y manosa) para realizar un nuevo experimento evaluando el efecto de las concentraciones de los estimulantes en la producción de ácido S-láctico en un tiempo de 24 h. Los resultados del proceso fermentativo con los estimulantes de glicerol y manosa en un tiempo de 24 h se presentan en la Figura 6.

Al comparar estos resultados con los reportados Serna & Rodríguez (2009), donde

obtuvieron un rango de concentración de 24 - 58 g/L de ácido S-láctico producido usando el glicerol como estimulante, muestra incidencias, dejando la posibilidad de realizar nuevos experimentos con otras concentraciones para futuras investigaciones, y llegar a obtener las condiciones óptimas que promuevan la actividad amilolítica de la cepa *R. oryzae* en la producción de ácido S-láctico.

En el gráfico de interacción (Figura 7) se observa que la interacción sustrato-estimulantes no son independientes, es decir, que el estimulante glicerol genera una alta concentración con la mezcla (2% harina de batata-5% harina de yuca) y la harina de yuca (5 %) y la manosa genera otra alta concentración de ácido S-láctico; esto genera una intersección entre los sustratos y estimulantes, indicando que la modificación de las concentraciones se deben hacer en conjunto para asegurar la máxima producción de ácido S-láctico.

Artículos

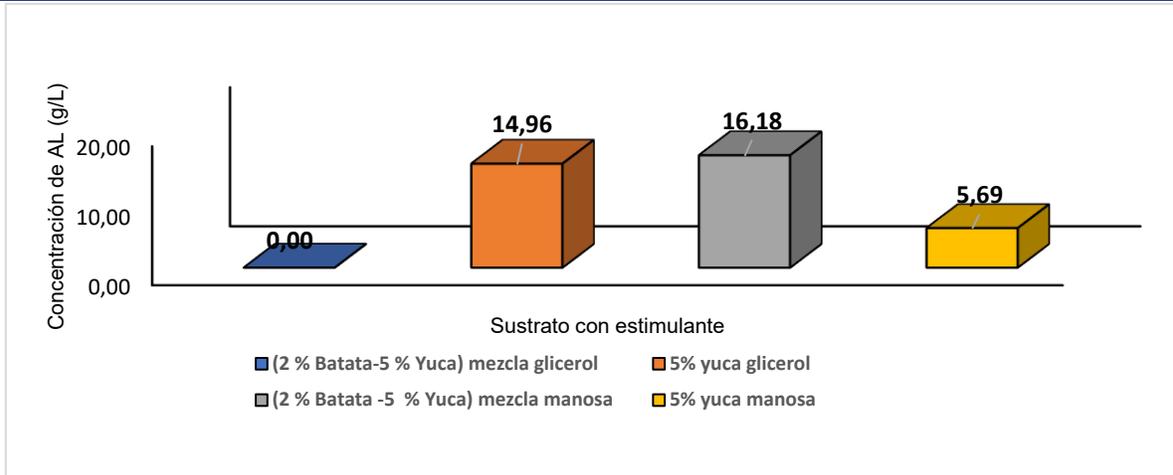


Figura 6. Rendimiento de ácido láctico de la fermentación con los estimulantes glicerol y manosa en 24 h.

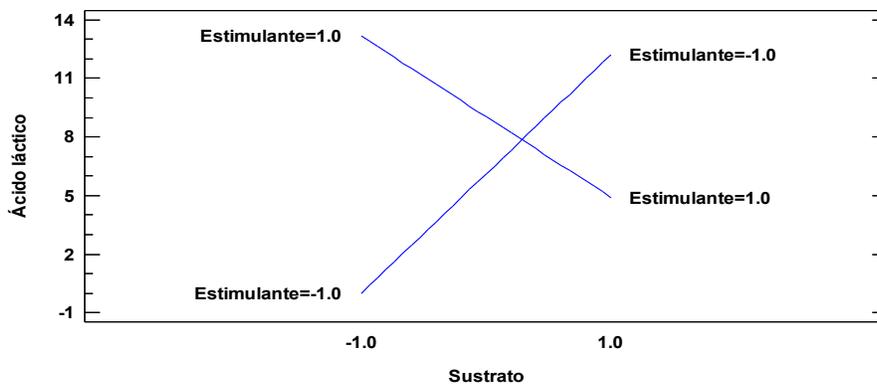


Figura 7. Gráfico de interacción de la fermentación con estimulantes durante 24 h.

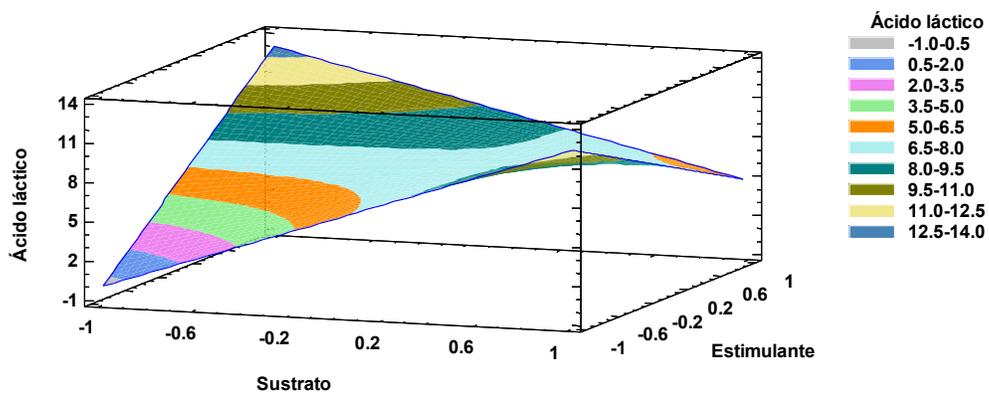


Figura 8. Superficie de respuesta estimada de la fermentación con estimulantes durante 24 h.

Conclusión

En esta investigación se evidenció que un medio de cultivo para el hongo *Rhizopus oryzae* en la producción de ácido láctico (AL) constituido por sustratos agroindustriales, aporta nutrientes beneficiosos que favorecen su crecimiento y producción de ácido láctico. Donde la mayor concentración obtenida de ácido láctico (26.70 g/L) con la harina de yuca (5 %) y la mezcla de harina (27.60 g/L) como sustrato fue a un tiempo de 22 h. Usando una prueba enzimática se identificó el isómero S del ácido láctico obtenido. Y los mejores estimulantes (glicerol y manosa) en la producción de ácido S-láctico alcanzaron concentraciones de 14.96 g/L con el sustrato [harina de yuca (5 %)]; 16.17 g/L con el sustrato (2 % batata – 5 % yuca) y 5.69 g/L con el sustrato [harina de yuca (5%)] en 24 h. Hay que destacar que esta investigación es pionera en usar la manosa como estimulante, donde se llegó a comprobar su efecto positivo en la producción de ácido S-láctico, representando un gran aporte a la comunidad científica para futuras investigaciones.

Referencias

- Aladdin Azzam, Alsaheb A. Ramzi A., Malek Roslinda A., Othman Nor Z. (2015). Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, año 2015, Volume 7, N° 10, pág. 729-735. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/292990722_Lactic_acid_applications_in_pharmaceutical_and_cosmeceutical_industries
- Alvarado, C., Pavone, D. (2015). Fermentación Sumergida con base en Subproductos de la Agroindustria para el Crecimiento de *Rhizopus oryzae* y Producción de Ácido Láctico. *Faraute* 10(2): 32-42. <https://servicio.bc.uc.edu.ve/facyt/vol10n2/art04.pdf>
- Blas, P. Evelyne, M., Dulce, C., Jackelyn, F. (2024). Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y cascara de *Solanum tuberosum* en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch [Tesis de pregrado publicada]. Universidad Nacional del Santa (UNS). Disponible en: <https://repositorio.uns.edu.pe/handle/20.500.14278/4668>
- García, C., Arrázola Paternina, G. S., & Durango Villadiego, A. M. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios*, 15(2), 2010. <https://doi.org/10.21897/rta.v15i2.676>
- Gil, R., Dominguez, R. & Pacho, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cascara de naranja: procesos de separación y purificación. *Tecnología, ciencia y educación (IMIQ)*. Volumen 23, N° 2, pág. 80-81. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/482/48223207.pdf>
- Guevara, M., Urcia, F., Casquero, Jose. (2010). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. *Medicina & Laboratorio*, volumen 2, N° 16, pág. 9-10. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2010/myl107-8d.pdf>
- Huang LP, Jin B, Lant P. (2005). Fermentación directa de aguas residuales de almidón de patata a ácido láctico por *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus arrhizus*. *Bioproceso Biosyst Eng* 27:229-238. <http://doi.org/10.1007/s00449-005-0398-0>
- Khunnonkwaoa, P., Boontawanb, P., Haltrichc, D., Maischbergerd, T., & Boontawana, A. (2012). Purification of L-(+)-lactic acid from pre-treated fermentation broth using vapor permeation-assisted esterification. *Process Biochemistry*, 47 (12), 1948-1956. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.011>
- Miranda, R.; Cil del Padro, K.; Noguez, M.; Escobedo, R.; Martínez, J.; Cortés, J.; Morales, D.; Reyes, L. (2024). *Química verde: Principio por principio*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. ESCUELA NACIONAL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES. ISBN: 978-607-30-8720-9.
- Rivera, M; Wright, E. (2020). *Apuntes de patología vegetal: fundamentos y prácticas para la salud de las plantas*. Editorial Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires. ISBN 978-987-3738-30-2
- FAO (1985). *Manual para patólogos vegetales*. Perú: Pacific Press S.A. https://books.google.co.ve/books/about/Manual_para_pat%C3%B3logos_vegetales.html?id=LyOKnAEACAAJ&redir_esc=y

Artículos

Saha, T., Fang, J., Mukherjee, S., Dickey, M., Velez, O. (2021). ACS Applied Materials & Interfaces 2021 13 (7), 8071-8081. DOI: 10.1021/acsami.0c22730.

Sanches-Rosario, Y. & Sanchez J. (2011). Producción y caracterización de la fenol oxidasa de *Scytalidim thermophilum*. Revista Mexicana de Micología, 34: 31-42.

Schaad, J. B. Jones, W. Chun (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (3rd ed.). APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, EE.UU. 164p.

Serna C. Lili, Rodriguez de S. A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico:

estado del arte. Ciencia y tecnología alimentaria, volumen 5, año 2015, N° 001, pág. 54-65. Disponible en: http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/alberto/_private/acido%20lactico.pdf

Srisakul, T., Nantana S., Kuakoon, P., Shang-Tian, Y., Vichien, K. (2017). L-lactic acid production from liquefied cassava starch by thermotolerant *Rhizopus microsporus*: characterization and optimization (Producción de ácido l-láctico a partir de almidón de yuca licuado por el termotolerante *Rhizopus microsporus*: caracterización y optimización.). Process Biochemistry Sciencedirect, Tailandia. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511317308498>.