

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS**



**PRUEBAS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A
NIVEL DE LABORATORIO A PARTIR DE LA CÁSCARA
DE PLÁTANO (*Musa paradisiaca*) POR FERMENTACIÓN
UTILIZANDO EL MICROORGANISMO *Lactobacillus
delbrueckii***

PRESENTADO POR:

**CAÑAS REYES, JULIO ALEXANDER
GÓMEZ LOZANO, OSCAR ANTONIO
HERNÁNDEZ NIETO, ADILIA IXQUIC**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

CIUDAD UNIVERSITARIA, MAYO DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MSC. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

DECANO

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

SECRETARIO

ING. JULIO ALBERTO PORTILLO

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

DIRECTORA

DRA. TANIA TORRES RIVERA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

Trabajo de Graduación previo a la opción al Grado de:
INGENIERO QUÍMICO

Título

**PRUEBAS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A
NIVEL DE LABORATORIO A PARTIR DE LA CÁSCARA
DE PLÁTANO (*Musa paradisiaca*) POR FERMENTACIÓN
UTILIZANDO EL MICROORGANISMO *Lactobacillus
delbrueckii***

Presentado por

**CAÑAS REYES, JULIO ALEXANDER
GÓMEZ LOZANO, OSCAR ANTONIO
HERNÁNDEZ NIETO, ADILIA IXQUIC**

Trabajo de Graduación Aprobado por:

Docente Asesor

INGA. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA

San Salvador, Mayo de 2018

Trabajo de Graduación Aprobado por:

Docente Asesor

INGA. DELMY DEL CARMEN RICO PEÑA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar este reto y pertenecer tanto a la familia Cañas Reyes como a la marista. A mi familia por aportar en mi formación y crecimiento, especial y enfáticamente a mis padres y hermanos por siempre estar presentes. A cada uno de los estudiantes de ingeniería con los cuales compartimos proyectos desde la academia u organización estudiantil, sin duda aportamos a un cambio. A Ixquic, Óscar e Ing. Rico; por el apoyo en los proyectos individuales paralelos a la investigación. Al Departamento de Estado de Estados Unidos, por contribuir con mi desarrollo integral al respaldar el emprendimiento social SUSI 2016 como Alumni.

Julio Alexander Cañas Reyes

Agradezco primeramente a Jehová Dios Todopoderoso por darme sabiduría, fortaleza y guiarme en el camino del conocimiento para no desistir en el cumplimiento de todas las metas que me propongo. El culminar mis estudios de Ingeniería Química con el presente trabajo de graduación no ha sido solamente mi esfuerzo. Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron abnegadamente para la realización del mismo, personas a las que les debo mucho especialmente a mis padres y esposa; puesto que, gracias a ellos me mantuve perseverante. Agradezco a mi asesora de trabajo de graduación Ing. Delmy Del Carmen Rico Peña por la ayuda brindada, a mis compañeros de trabajo de graduación por hacer posible el trabajo en equipo y a todos mis amigos de trabajo del Laboratorio de Medicamentos del Ministerio de Salud que siempre me apoyaron.

Oscar Antonio Gómez Lozano

Primeramente agradezco a Dios que me ha llevado por todos los caminos correctos, en los tiempos correctos, que me han traído hasta este punto de mi vida, en segundo lugar a mi mami y a David, que con mucho esfuerzo y sacrificio han educado a sus tres hijos para darles todo lo mejor (y en verdad nos han dado todo lo mejor), muchas gracias por todo el apoyo que siempre he sentido de parte de ustedes dos, en tercer lugar a Lennin y a Jairito por nunca dejar que el factor bullying falte en mi vida, gracias por ser tan buena onda con su hermana (eso lo digo en serio), agradezco también a Julio por acompañarme en todo el camino de la U y por aguantarnos mutuamente, agradezco a la familia de Óscar y Carolina por su gran hospitalidad al abrirnos las puertas de su casa cada semana, me hicieron sentir realmente como en mi casa. Al gran apoyo brindado por el Laboratorio Clínico Max Bloch, donde la magia de este trabajo de graduación se llevó acabo, gracias por permitirnos hacer uso de sus instalaciones y equipo para realizar nuestras pruebas.

Adilia Ixquic Hernández Nieto

DEDICATORIA

V.J.M.J.Ch.

A Dios: por ser el centro y fundamento del trayecto recorrido hasta la fecha, por ser constante y tácito acompañante.

A Nuestra Buena Madre: por ser la inspiración de una familia de la que tuve la dicha de formar parte, permitiendo consolidar mi concepto de servicio.

A mi familia: por su constancia y cuotas de realidad, su imperfección es lo que la ha hecho esencial y única en mi vida.

A mis abuelos: por encaminar el proyecto de vida de mi papá y mi mamá, sin ustedes ellos no serían lo que son; ni sus nietos ser lo que podemos llegar a ser.

A mis padres: por creer de lo que soy capaz y dudar de lo que quiero hacer, por tener siempre pan en la mesa y un consejo que dar, y por todo el sacrificio que representó poder escribir estas palabras; por ello y mucho más, ustedes también son ingenieros químicos y no duden que habrán más logros que compartiremos.

A mis hermanos: por la vida compartida y el apoyo mutuo de manera incondicional, al final a nuestra manera logramos amoldar nuestros temperamentos para alcanzar objetivos comunes y concretar proyectos individuales.

A Berta: por formar parte tanto de mi infancia como de la de mis hermanos para moldear a su manera, nuestra forma de ser como una segunda madre.

A la Universidad de El Salvador, pese a sus amplias carencias: por sus características únicas, por formarme como profesional en ella, por permitirme aportar a la organización estudiantil con completa disposición y entrega constante; alcanzando metas, viviendo sorpresas únicas, retos palpables y tragos amargos.

A ASEIQA: por ser mi primer proyecto comunitario y demostrar que al contar con un equipo comprometido, la trascendencia tanto de la realidad individual como colectiva se limita únicamente a la imaginación; al superar divisiones y excusas.

A *Iste Dei* (los que fueron, son y serán): por aceptarme en la comunidad en el momento que necesitaba, por acompañar en el éxito y fracaso, por converger en un proyecto comunitario al compartir vida y por la razón de reunirnos, aunque falte...

A Ixquic: por ser la compañera en este proceso de formación y crecimiento, por tu presencia y ausencia, por el mutuo conocimiento, por apoyarme y criticarme, por las emociones y lecciones, y por tu confianza, tiempo y compromiso.

Julio Alexander Cañas Reyes

DEDICATORIA

Dedico esta sección de mi vida plasmada en este Trabajo de Graduación en primer lugar a Dios porque me brindó la oportunidad de llegar hasta el final de la carrera.

A mi padre, José María Gómez Torres, por su gran ejemplo de responsabilidad y lucha para perseverar y ser mejor cada día; a mi madre, Rosa Amanda Lozano Ventura, por su amor y cariño, apoyo moral y espiritual que me ha brindado siempre. Infinitamente gracias. Ésta es una deuda pendiente con ustedes que no me permitía bajar los brazos y rendirme.

A mi esposa, Ana Carolina Ramos de Gómez que es el soporte fundamental de mi ser, convirtiéndose en una motivación permanente para mejorar mi vida y confiar en mis capacidades. Siempre estuviste en esas noches de largos desvelos, te amo.

A mi único hermano, José Mauricio Gómez Lozano. Aunque la distancia nos separó por circunstancias de la vida, sé que estabas pendiente de mis pasos para que no desistiera de mis sueños, gracias brother.

Oscar Antonio Gómez Lozano

DEDICATORIA

El presente Trabajo de Graduación se la dedico a Dios, por permitirme haberme permitido completar una etapa más en mi vida. A mis padres, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mis hermanos, que también me han apoyado en mi trayecto por la universidad. A Julio, por ser parte de una gran experiencia en mi vida. A Óscar y Carolina que siempre estuvieron dispuestos a recibirnos en su hogar. A mis compañeros de estudio, a mis maestros y amigos, quienes sin su ayuda nunca hubiera podido hacer este trabajo de graduación. A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta investigación. Para ellos es esta dedicatoria de trabajo de graduación, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

Adilia Ixquic Hernández Nieto

RESUMEN

Se desarrollaron pruebas de producción de ácido láctico, a escala de laboratorio, utilizando la cáscara de plátano verde como material base para preparar el sustrato. La cáscara de plátano recolectada es el material residual de una planta industrial que emplea plátano verde para la elaboración de frituras, en la cual se procesa un promedio de 2,180 kg de plátano al mes; lo que brinda una disponibilidad de 450.39 kg de cáscara de plátano al mes en la empresa.

La obtención de ácido láctico se derivó a partir de dos sistemas de biotransformación: el primer sistema que emplea una hidrólisis química con H_2SO_4 al sustrato para que produzca azúcares reductores para la fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii*, y el segundo sistema que emplea una hidrólisis enzimática por acción microbiana con *Aspergillus oryzae* al sustrato para que produzca azúcares reductores para la fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii*.

El primer sistema hidrolizado químicamente en un autoclave con H_2SO_4 5% p/v en una proporción 2:1 en relación a la cáscara de plátano, obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores (**32.14 g/L**) a los 15 minutos en condiciones de 15 psi y 121 °C; la fermentación láctica seguida logró la mayor concentración de ácido láctico (**22.70 g/L**) a las 132 horas de incubación en condiciones de 40 °C, pH de 7, inóculo del 2% v/v dentro de un sistema anaeróbico. El rendimiento obtenido en la hidrólisis química y la fermentación láctica fueron **0.354** $\frac{g \text{ azúcares reductores}}{g \text{ cáscara de plátano}}$ y **0.250** $\frac{g \text{ ácido láctico}}{g \text{ cáscara de plátano}}$, respectivamente.

El segundo sistema hidrolizado enzimáticamente por acción microbiana con *Aspergillus oryzae* en una proporción de inoculación del 10% v/v en relación a la cáscara de plátano, obteniendo la mayor concentración de azúcares reductores (**32.24 g/L**) a las 48 horas de incubación en condiciones de 32 °C y 70% de humedad; la fermentación láctica seguida logró la mayor concentración de ácido láctico (**13.6710 g/L**) a las 96 horas de incubación en condiciones de 40 °C, pH de 7, inóculo del 2% v/v dentro de un sistema anaeróbico. El rendimiento obtenido en la hidrólisis enzimática por acción microbiana y la fermentación láctica fueron **0.1171** $\frac{g \text{ azúcares reductores}}{g \text{ cáscara de plátano}}$ y **0.0507** $\frac{g \text{ ácido láctico}}{g \text{ cáscara de plátano}}$, respectivamente.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
ABREVIATURAS	1
SIGLAS.....	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.1. GENERALIDADES DE LA <i>Musa paradisiaca</i>	5
1.1.1. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE <i>Musa paradisiaca</i> EN EL SALVADOR.....	6
1.1.2. DISPONIBILIDAD DEL PLÁTANO PARA USO INDUSTRIAL DE LA CÁSCARA EN EL SALVADOR	8
1.1.3. PROPIEDADES Y COMPOSICIÓN DE CÁSCARA DE <i>Musa paradisiaca</i>	8
1.2. GENERALIDADES DEL ALMIDÓN PRESENTE EN CÁSCARA DE PLÁTANO	9
1.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALMIDÓN.....	10
1.2.2. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN A AZÚCARES FERMENTABLES	11
1.2.3. HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL ALMIDÓN	11
1.2.4. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN A PARTIR DE MICROORGANISMOS	12
1.3. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO.....	14
1.4. ANTECEDENTES DEL ÁCIDO LÁCTICO	15
1.5. GENERALIDADES DEL ÁCIDO LÁCTICO	17
1.5.1. ENANTIÓMEROS (ISÓMEROS ÓPTICOS) DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	17
1.5.2. PROCESOS DE OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	18
1.5.3. USO DEL ÁCIDO LÁCTICO DENTRO DE LA INDUSTRIA PRODUCTIVA	19
1.5.4. ACTUALIDAD DEL CONSUMO, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO	20
1.6. GENERALIDADES DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA	22
1.6.1. ENZIMAS PRODUCIDAS A PARTIR DE BIOTECNOLOGÍA.....	24
1.6.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DEL <i>Aspergillus oryzae</i>	25
1.6.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DEL <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	27
1.7. FERMENTACIÓN LÁCTICA Y MICROORGANISMOS FERMENTADORES	28

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	31
2.1. PRETRATAMIENTO DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO.....	32
2.2. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÁSCARA DE PLÁTANO POR HIDRÓLISIS QUÍMICA Y FERMENTACIÓN LÁCTICA CON <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	33
2.3. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÁSCARA DE PLÁTANO POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON <i>Aspergillus oryzae</i> Y FERMENTACIÓN LÁCTICA CON <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	34
2.4. NECESIDADES NUTRICIONALES DE MICROORGANISMOS A INOCULAR.....	36
2.4.1. <i>Aspergillus oryzae</i>	36
2.4.2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	37
2.5. METODOLOGÍA DE INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	38
2.5.1. INOCULADO DE <i>Aspergillus oryzae</i> EN CÁSCARA DE PLÁTANO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN.....	41
2.5.2. INOCULADO DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> PARA LA FERMENTACIÓN LÁCTICA EN LICOR DE HIDRÓLISIS ÁCIDA O ENZIMÁTICA	42
2.6. METODOLOGÍA DE VERIFICACIÓN DE PROCESOS QUÍMICOS Y METABÓLICOS PROPUESTOS UTILIZANDO PARÁMETROS DE OPERACIÓN.....	44
2.7. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEMANDADOS POR EL <i>Aspergillus oryzae</i> Y EL <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	48
2.7.1. DESCRIPCIÓN DE EQUIPO UTILIZADO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	49
2.8. METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO A NIVEL INDUSTRIAL.....	51
2.9. METODOLOGÍA DE CÁLCULO DE RENDIMIENTOS DE MÉTODOS DE PRODUCCIÓN PROPUESTOS EN EL BIORREACTOR	52
CAPÍTULO III. ETAPA EXPERIMENTAL: OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	53
3.1. DETERMINACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.....	54
3.2. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS PATRÓN PARA LECTURA DE LOS RESULTADOS DE LA ETAPA EXPERIMENTAL.....	54
3.2.1. CURVA PATRÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES.....	55
3.2.2. CURVA PATRÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES	56
3.2.3. CURVA PATRÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	57
3.3. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE CÁSCARA DEL PLÁTANO.....	58
3.4. TRATAMIENTO PREVIO A RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	59
3.5. RECOLECCIÓN DE LA CÁSCARA DEL PLÁTANO	59
3.6. PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO	60

3.7.	PORCENTAJE DE HUMEDAD ENCONTRADA EN CÁSCARA DE PLÁTANO PARA USO INDUSTRIAL Y COMERCIALIZADA A NIVEL MINORISTA	61
3.8.	COMPARACIÓN DE PORCENTAJE DE HUMEDAD, CARBOHIDRATOS TOTALES Y REDUCTORES DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO PARA USO INDUSTRIAL Y COMERCIALIZADA A NIVEL MINORISTA	61
3.9.	PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR HIDRÓLISIS QUÍMICA Y FERMENTACIÓN LÁCTICA (<i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	62
3.9.1.	PREPARACIÓN Y CÁLCULO PARA LA CONSTRUIR LA CURVA DE HIDRÓLISIS QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO	62
3.9.2.	VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	63
3.9.3.	RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA	64
3.9.4.	ETAPA FINAL DE HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ALMIDÓN Y TRATAMIENTO PREVIO DEL SUSTRATO PARA LA ETAPA FERMENTATIVA	67
3.9.5.	ENRIQUECIMIENTO DE NUTRIENTES MÍNIMOS PARA OBTENER ÁCIDO LÁCTICO, POSTERIOR A LA HIDRÓLISIS QUÍMICA.....	68
3.9.6.	PREPARACIÓN Y CÁLCULO DE INÓCULO <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	69
3.9.7.	VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR PREVIO A FERMENTACIÓN LÁCTICA.....	70
3.9.8.	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO EN BIORREACTOR.....	71
3.9.9.	RESULTADO DE FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LICOR PRODUCIDO POR HIDRÓLISIS QUÍMICA CON <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	72
3.9.10.	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL BIORREACTOR	74
3.10.	PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÁSCARA DE PLÁTANO POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL <i>Aspergillus oryzae</i> Y FERMENTACIÓN CON <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	74
3.10.1.	PREPARACIÓN Y CÁLCULO DEL INÓCULO DE <i>Aspergillus oryzae</i> PARA EXTRACTO ENZIMÁTICO.....	75
3.10.2.	VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR ACCIÓN MICROBIANA.....	76
3.10.3.	PREPARACIÓN Y CÁLCULO PARA REALIZAR LA CURVA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN	76
3.10.4.	RESULTADOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR ACCIÓN MICROBIANA CON <i>Aspergillus oryzae</i>	78
3.10.5.	ENRIQUECIMIENTO DE NUTRIENTES MÍNIMOS POSTERIOR A HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA TRANSFORMACIÓN A ÁCIDO LÁCTICO	84
3.10.6.	PREPARACIÓN Y CÁLCULO DE INÓCULO <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	84
3.10.7.	VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEL SISTEMA DE BIOTRANSFORMACIÓN	85
3.10.8.	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO EN BIORREACTOR.....	86

3.10.9.	RESULTADOS DE FERMENTACIÓN LÁCTICA CON <i>Lactobacillus delbrueckii</i> A PARTIR DEL LICOR PRODUCIDO POR LA HIDRÓLISIS MIROBIANA POR ACCIÓN ENZIMÁTICA CON <i>Aspergillus oryzae</i>	87
3.10.10.	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL BIORREACTOR	90
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS		91
4.1.	RENDIMIENTO DEL BIORREACTOR EN OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y COMPARACIÓN ENTRE AMBOS PROCESOS.....	92
4.1.1.	RENDIMIENTO HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO.....	92
4.1.2.	RENDIMIENTO FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LICOR CREADO A PARTIR DE HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO	92
4.1.3.	RENDIMIENTO HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO.....	93
4.1.4.	RENDIMIENTO FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LICOR CREADO A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO.....	93
4.2.	AZÚCARES NO FERMENTADOS EN PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO	94
4.3.	ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	95
CONCLUSIONES		96
OBSERVACIONES.....		98
RECOMENDACIONES.....		99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		100
ANEXOS.....		105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1:	Superficie dedicada a la producción de plátano en El Salvador (USDA, 2016)	6
Tabla 1.2:	Datos de producción, importación y exportación de plátano en el país (USDA, 2016)	8
Tabla 1.3:	Composición de los remanentes del plátano (Moreira, K., 2013).....	9
Tabla 1.4:	Composición aproximada de la cáscara de plátano verde (Duque, S., 2014)	14
Tabla 1.5:	Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico (Serna-Cock, L., 2005)	18
Tabla 1.6:	Especificaciones de calidad el ácido láctico (Serna-Cock, L., 2005)	20
Tabla 1.7:	Taxonomía del <i>Aspergillus oryzae</i>	27
Tabla 1.8:	Taxonomía del <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	28
Tabla 2.1:	Métodos de pretratamiento para hidrólisis de cáscara de plátano (Claassen, P., 1999)	32
Tabla 2.2:	Contenido nutricional de variedades de arroz (FAO, 2004).....	37
Tabla 2.3:	Cantidades nutricionales mínimas <i>Aspergillus oryzae</i> (Hernández, A., 2003)	37
Tabla 2.4:	Cantidades nutricionales mínimas <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (Hernández, A., 2003)	38
Tabla 2.5:	Metodologías de verificación procesos químicos y metabólicos propuestos.....	44
Tabla 2.6:	Soluciones estándar para curva carbohidratos totales (Cristancho, L., 2014).....	46
Tabla 2.7:	Soluciones estándar para curva carbohidratos reductores (Cristancho, L., 2014)	47
Tabla 2.8:	Determinación de ácido láctico por colorimetría (Pacios, A., 2009).....	48
Tabla 2.9:	Consideraciones de parámetros de operación demandados por los microorganismos.....	49
Tabla 3.1:	Variables fijas y de estudio en la investigación	54
Tabla 3.2:	Mediciones para curva patrón carbohidratos totales.....	55
Tabla 3.3:	Mediciones para curva patrón carbohidratos reductores totales	56
Tabla 3.4:	Mediciones para curva patrón de ácido láctico	57
Tabla 3.5:	Masas de muestras de cáscara de plátano para obtención de % humedad	61
Tabla 3.6:	Porcentaje de humedad en muestras de cáscara de plátano	61
Tabla 3.7:	Resultados de las muestras de cáscaras de plátano verde	62
Tabla 3.8:	Análisis de ANOVA y varianza de hidrólisis con H ₂ SO ₄ 5% p/v.....	65
Tabla 3.9:	Resultados de hidrólisis de cáscara de plátano con H ₂ SO ₄ 5% p/v	67
Tabla 3.10:	Enriquecimiento nutricional del licor correspondiente a la hidrólisis química	69
Tabla 3.11:	Análisis de varianza (ANOVA) de fermentación láctica de la hidrólisis química	73
Tabla 3.12:	Solución nutritiva para hidratación de medio <i>Aspergillus oryzae</i>	75
Tabla 3.13:	Análisis de varianza (ANOVA) de azúcares reductores totales en hidrólisis enzimática.....	80
Tabla 3.14:	Análisis de varianza (ANOVA) de azúcares reductores totales en extracto enzimático	81
Tabla 3.15:	Análisis de varianza (ANOVA) de azúcares reductores hidrolizados en extracto enzimático.....	82
Tabla 3.16:	Resultados de hidrólisis de cáscara de plátano con <i>Aspergillus oryzae</i>	84
Tabla 3.17:	Análisis de ANOVA y varianza de fermentación láctica de la hidrólisis enzimática	89
Tabla 4.1:	Azúcar no fermentada en la producción de ácido láctico de hidrólisis ácida	94
Tabla 4.2:	Azúcar no fermentada en la producción de ácido láctico de hidrólisis enzimática	94
Tabla 4.3:	Rendimientos de los procesos investigados.....	95
Tabla A.1:	Resultados de validación estadística de curva patrón de carbohidratos totales	117
Tabla A.2:	Resultados de validación estadística de curva patrón de azúcares reductores totales	119
Tabla A.3:	Resultados de ANOVA con un factor a curva patrón de ácido láctico	121
Tabla A.4:	Resultados de hidrólisis de cáscara de plátano, H ₂ SO ₄ 5% p/v.....	123
Tabla A.5:	Resultados de fermentación láctica a partir de licor producido con hidrólisis química	124
Tabla A.6:	Resultados de hidrólisis enzimática por acción microbiana.	127
Tabla A.7:	Resultados de fermentación láctica a partir de hidrólisis enzimática.	130
Tabla A.8:	Datos técnicos de reactivos utilizados en el Trabajo de Graduación.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1:	Representación de <i>Musa paradisiaca</i> (Bernard, P., 1842)	5
Figura 1.2:	Distribución geográfica de productores de plátano en El Salvador (USDA, 2016)	6
Figura 1.3:	Estructura de la cadena de distribución de frutas de El Salvador (USDA, 2016)	7
Figura 1.4:	Segmento de amilosa del almidón (USAC, 2005).....	10
Figura 1.5:	Segmento de amilopectina del almidón (USAC, 2005)	11
Figura 1.6:	Mecanismo de hidrólisis ácida del almidón (Hoover, 2000).....	12
Figura 1.7:	Mecanismo de hidrólisis enzimática del almidón (Sánchez, O., 2005)	13
Figura 1.8:	Estructura molecular del ácido láctico (Barragán, A., 2012).....	17
Figura 1.9:	Enantiómeros del ácido láctico (Barragán, A., 2012).....	18
Figura 1.10:	Secuencia de producción de ácido láctico por síntesis química (Gil, R., 2008)	19
Figura 1.11:	Volumen del mercado de ácido láctico, %. (Grand View Research, 2017)	21
Figura 1.12:	Aplicación de los microorganismos dentro de la industria productiva (CAR/PL, 2003)	22
Figura 1.13:	Curva de crecimiento bacteriano (Ilse Valderrama Heller, 2008)	24
Figura 1.14:	Conidóforo del <i>Aspergillus</i>	26
Figura 1.15:	Fermentaciones homoláctica y heteroláctica (Stanier, R., 2011)	30
Figura 2.1:	Procedimiento de estandarización de microorganismos (Akerberg, C., 1998)	40
Figura 2.2:	Métodos de conservación de microorganismos	40
Figura 2.3:	Reacción de glucosa con DNS en medio alcalino (Southgate, D.A.T., 1991).....	46
Figura 2.4:	Biorreactores de borosilicato utilizados en la investigación.....	50
Figura 2.5:	Cámara de anaerobiosis, trampa de agua y biorreactor de fermentación láctica.....	50
Figura 3.1:	Curva patrón carbohidratos totales, ppm vs absorbancia.....	55
Figura 3.2:	Curva patrón carbohidratos reductores, ppm vs absorbancia.	56
Figura 3.3:	Curva patrón ácido láctico, ppm vs absorbancia	58
Figura 3.4:	Gráfica tiempo (minutos) vs azúcares reductores (ppm) por hidrólisis química	65
Figura 3.5:	Gráfica tiempo (hora) vs ácido láctico (g/L) por hidrólisis química	73
Figura 3.6:	Gráfica tiempo (hora) vs azúcares reductores totales (g/L) hidrólisis enzimática	79
Figura 3.7:	Gráfica tiempo (horas) vs azúcares reductores totales en el extracto enzimático (g/L)	80
Figura 3.8:	Gráfica tiempo (hora) vs azúcares reductores hidrolizados extracto enzimático (g/L)	81
Figura 3.9:	Gráfica tiempo (hora) vs ácido láctico (g/L) por hidrólisis enzimática.....	88
Figura A.1:	Procedimiento de determinación de carbohidratos totales (fenol-sulfúrico).....	106
Figura A.2:	Procedimiento de determinación de carbohidratos reductores totales (DNS).....	107
Figura A.3:	Procedimiento de cuantificación de ácido láctico producido en el biorreactor.....	108
Figura A.4:	Procedimiento de recolección de la cáscara de plátano	109
Figura A.5:	Procedimiento de tratamiento preliminar de la cáscara de plátano.....	110
Figura A.6:	Procedimiento para la construcción de la curva de la hidrólisis química.....	111
Figura A.7:	Procedimiento de etapa final de hidrólisis química previo a fermentación láctica	112
Figura A.8:	Procedimiento para enriquecimiento nutrientes posterior a hidrólisis química	112
Figura A.9:	Procedimiento para la preparación y cálculo del inóculo <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	113
Figura A.10:	Procedimiento para el cumplimiento de parámetros de operación del biorreactor	114
Figura A.11:	Procedimiento de inoculación de <i>Aspergillus oryzae</i> para el extracto enzimático	115
Figura A.12:	Procedimiento de construcción de curva de hidrólisis enzimática	116
Figura A.13:	Gráficas resultados validación estadística de curva carbohidratos totales.....	118
Figura A.14:	Gráficas de validación estadística de curva azúcares reductores totales	120
Figura A.15:	Gráficas de validación estadística de curva ácido láctico.....	122

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	Procedimientos de la etapa experimental de la investigación.....	106
ANEXO 2:	Validaciones estadísticas de curvas patrón de la investigación.....	117
ANEXO 3:	Resultados de la etapa experimental.....	123
ANEXO 4:	Datos técnicos de reactivos utilizados.....	133

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AHA: Alfa Hidroxiácido.

ATP: Adenosín Trifosfato.

BAL: Bacterias Ácido Lácticas.

D(-): Dextrógiro.

DMSO: Di-Metil Sulfónico.

DNS: Ácido Dinitrosalicílico.

HCN: Ácido Cianhídrico.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Definición.

GEI: Gases de Efecto Invernadero.

L(+): Levógiro.

M.R.S.: Man-Rogosa-Sharpe.

NAD+: Nicotinamida Adenina Dinucleótido.

NMF: Factor Hidratante Natural.

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible.

pH: Potencial de Hidrógeno.

PLA: Ácido poli láctico.

R: *Rhizopus*.

SmF: Fermentación sumergida.

SSF: Fermentación en Sustrato Sólido.

UFC: Unidad Formadora de Colonia.

SIGLAS

ANOVA: Análisis de Varianza.

BCR: Banco Central de Reserva.

CAR/PL: Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia.

CARG: Tasa Anual Compuesta de Crecimiento.

DGEA: Dirección General de Economía Agropecuaria.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FCC: Código de Alimentos Químicos.

FEDARES: Federación de Asociaciones de Regantes de El Salvador.

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería.

MIDES: Empresa de Manejo Integral de Desechos Sólidos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano.

USDA: Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

USPTO: Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos.

UNFCCC: Convención Macro de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de la disponibilidad de un desecho agroindustrial para ser convertido en un residuo y usarse como materia prima para elaborar productos con mayor valor agregado mediante procesos ambientalmente amigables, conociendo los componentes nutricionales del residuo y las requerimientos de la ruta productiva; son estudios necesarios para contribuir con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) ratificados por El Salvador.

La práctica común derivada del post-consumo de productos agrícolas es que los residuos no sean reutilizados y sean abandonados en el lugar donde se generaron, convirtiéndose en contaminantes de suelos y aguas subterráneas; o se gestione la disposición normalizada según la legislación del país. Una característica principal de los residuos agroindustriales es que el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina.

Existen investigaciones que han obtenido ácido láctico planteando diversos mecanismos de reacción a partir de diferentes tipos de sustratos orgánicos, esta investigación se desarrolló utilizando la cáscara de plátano como sustrato; debido a componentes nutricionales específicos que satisfacen necesidades metabólicas de los microorganismos usados dentro de las rutas fermentativas descritas:

- i. La primera que oxide carbohidratos a azúcares fermentables mediante hidrólisis química con H_2SO_4 , seguida de una fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii*.
- ii. La segunda que oxide carbohidratos a azúcares fermentables mediante hidrólisis enzimática por acción microbiana del *Aspergillus oryzae*, seguida de una fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii*.

La bioproducción de ácido láctico a partir de los residuos orgánicos en la industria alimentaria para utilizar la capacidad de un microorganismo fermentador, posibilita: la obtención de bioplásticos para disminuir la dependencia de los derivados del petróleo; su uso como regulador de potencial de hidrógeno (pH) y su aplicación hidratante como astringente en la industria cosmética; entre otros.

El estudio del efecto de la variación de los parámetros de operación del biorreactor (pH, temperatura, cantidad de sustrato, requerimiento de nutrientes y tiempo de residencia), permitirá el cálculo de los rendimientos de los procesos de transformación descritos en los sistemas de producción de ácido láctico; y concluir en base a resultados la ruta de producción más eficiente.

CAPÍTULO I.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN.

1.1. GENERALIDADES DE LA *Musa paradisiaca*

Según Lavanya, K. (2016), la *Musa paradisiaca* es una planta monoherbácea perteneciente a la familia *Musaceae*, distribuida en los países tropicales y subtropicales; a menudo erróneamente referido como un "árbol", es una hierba grande, carnosa, muy jugosa, que es un cilindro de pecíolo-hoja hasta alcanzar una altura de 6 a 7.5 m y que surge de un rizoma carnosa o cormo. Las hojas son tiernas, lisas, alargada o elíptica de 4 ó 5 a 15 por tallo, dispuestos en espiral y se despliegan, a medida que crece la planta con una tasa de uno por semana.

La inflorescencia, un punto de crecimiento transformado, es un punto terminal de cambio fuera del corazón en la punta del tallo; que al principio es grande, oval alargado, y afilando brote revestido de color púrpura. A medida que se abre se ve que las flores delgadas, tubulares y blancas dentadas ricas en néctar, se agrupan en filas dobles vertidas a lo largo tallo floral y cada racimo es cubierto por una capa gruesa, cerosa como la bráctea, púrpura por fuera y roja oscura por dentro. Las flores femeninas ocupan de la quinta a decimoquinta hilera inferior de cada racimo.

Por encima de las flores femeninas puede haber algunas hileras de flores hermafroditas o neutras, mientras que las masculinas nacen en las filas superiores. Las brácteas maduran pronto y los frutos crecidos en cada racimo se convierten en una "mano" de plátanos, y el tallo se cae con el peso hasta que el manojó esté al revés. La fruta cambia de verde oscuro a amarillo o rojo, o, en algunos casos, de verde a blanco.



Figura 1.1: Representación de *Musa paradisiaca* (Bernard, P., 1842).

Se ha demostrado que los extractos de tallo de *Musa paradisiaca* poseen alcaloides, esteroides como β -sitosterol, saponinas, flavonoides como quercetina, azúcares reductores, taninos y antraquinonas (Lavanya, K., 2016).

1.1.1. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE *Musa paradisiaca* EN EL SALVADOR

Según un reporte del 2016 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés: United States Department of Agriculture), la producción de plátano en El Salvador se encuentra dispersa en pequeñas explotaciones de 0.7 ha a 175 ha (1 a 250 manzanas) ubicadas a lo largo y ancho del territorio. La superficie dedicada a la producción de plátano en El Salvador ha incrementado progresivamente entre las temporadas 2009/2010 y 2014/2015, detallado a continuación:

Tabla 1.1: Superficie dedicada a la producción de plátano en El Salvador (USDA, 2016).

Año	Superficie (Ha)	Producción (Tm)
2009/2010	806	42,778
2010/2011	898	43,912
2011/2012	1,049	25,680
2012/2013	2,557	81,036
2013/2014	2,240	75,801
2014/2015	2,285	80,110

Desde el año 2013; la producción de plátano cambió su orientación de atender la demanda local en su totalidad, a través de mercados informales y supermercados, que exigen altos niveles de formalidad en sus operaciones comerciales, a la combinación de exportación de plátano a los Estados Unidos y consumo local.

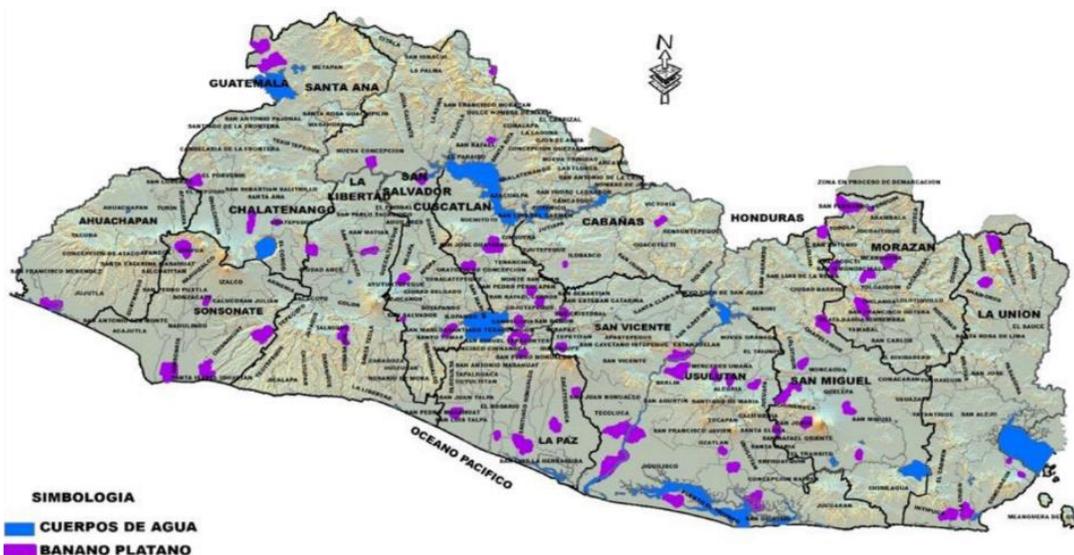


Figura 1.2: Distribución geográfica de productores de banano y plátano en El Salvador (USDA, 2016).

Desde la fase de la producción de las frutas hasta su llegada al consumidor final, existen diversos canales utilizados para su comercialización. En la **figura 1.3**, con línea amarilla se muestran las principales rutas de comercialización del plátano:

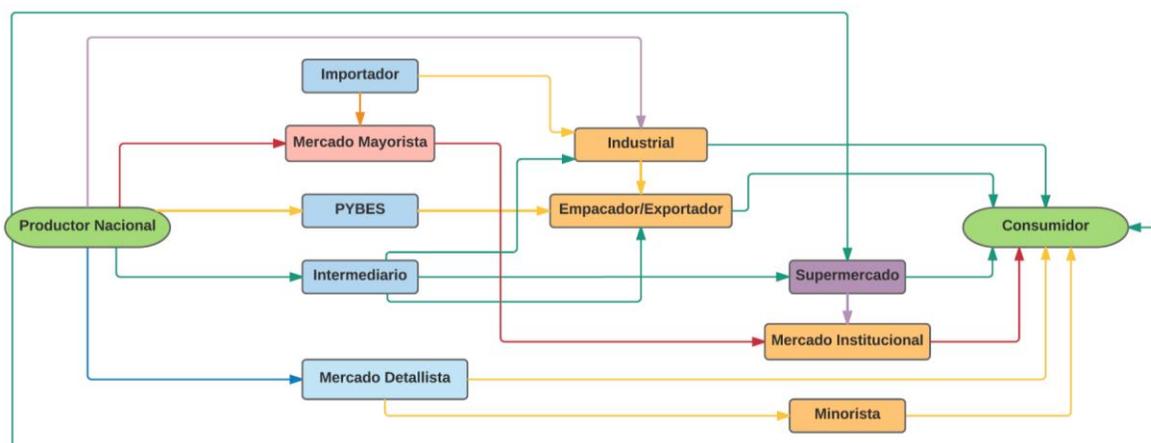


Figura 1.3: Estructura de la cadena de distribución de frutas de El Salvador (USDA, 2016).

Descripción de la estructura de la cadena de distribución de la **figura 1.3**:

- i. **Productor nacional:** Son los productores salvadoreños pequeños o grandes de frutas, con características económicas de producción variantes.
- ii. **Importador:** Son empresas dedicadas a la importación de frutas.
- iii. **Mercado mayorista:** Este eslabón de la cadena está conformado por los dos principales mercados mayoristas: La Tiendona y el Mercado Central.
- iv. **Intermediario:** La cantidad de intermediarios de finca es muy grande y los nexos con los productores son cercanos, aunque no llegan a establecerse relaciones formales; extraen el producto y lo distribuyen a mercados locales.
- v. **Mercado detallista:** Los detallistas son personas que poseen en su mayoría sus propios medios de transporte y que adquieren la producción en los mercados mayoristas para luego colocarla en los mercados municipales o comercializarla en el mercado formal.
- vi. **Industrial:** Está integrado por la industria procesadora de alimentos.
- vii. **Empacador/exportador:** empresas asociadas al empaque y exportación de ciertos rubros frutícolas.
- viii. **Supermercados:** Las tres cadenas principales de supermercados que distribuyen la fruta son Walmart, Callejas (Súper Selectos) y PriceSmart.
- ix. **Mercado institucional:** están conformados por empresas e instituciones que demandan generalmente volúmenes constantes de producción.

En cuanto al mercado del plátano en particular, este es abastecido por importaciones provenientes de Guatemala, Honduras y Nicaragua en menor escala; en su mayoría es producto de segunda calidad y bajo precio.

1.1.2. DISPONIBILIDAD DEL PLÁTANO PARA USO INDUSTRIAL DE LA CÁSCARA EN EL SALVADOR

El plátano es un producto de origen vegetal considerado dentro de la dieta alimenticia de los salvadoreños, según la Federación de Asociaciones Regantes de El Salvador (FEDARES) se requiere cerca de 1 millón de quintales anuales de plátano para satisfacer el consumo en fresco de la población salvadoreña.

La demanda es de dos tipos: consumo fresco y de materia prima para la elaboración de frituras de forma industrial como artesanal. De acuerdo a estimaciones con base a estadísticas oficiales del Banco Central de Reserva (BCR) y la Dirección General de Economía Agropecuaria (DGEA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en El Salvador el consumo muestra una tendencia creciente por el crecimiento poblacional y su diversificación; la División de Estadísticas Agropecuarias en sus anuarios estadísticos reportan para el plátano datos de producción nacional, importaciones y exportaciones del año 2011 al 2016:

Tabla 1.2: Datos de producción, importación y exportación de plátano en El Salvador (USDA, 2016).

Año Agrícola	Producción Nacional	Importaciones	Exportaciones
2011-2012	25,681 Tm	62,423 Tm	N/A
2012-2013	81,033 Tm	63,202 Tm	N/A
2013-2014	75,801 Tm	68,307 Tm	582 Tm
2014-2015	80,110 Tm	70,067 Tm	2,769 Tm
2015-2016	77,955 Tm	74,912 Tm	2,936 Tm

Para el año agrícola 2015-2016 reportan un consumo directo dentro del país de 149,931 toneladas métricas de plátano distribuido en los tipos de demanda anteriormente mencionadas. En base a la cantidad de consumo anual, segmentando los 149,931 toneladas métricas en 118,955 toneladas métricas de fruto (79.34%) y en 30,976 toneladas métricas de cáscara de plátano (20.66%).

La capacidad instalada de la empresa muestreada está limitada actualmente al aprovechamiento de 27 toneladas métricas de plátano, la empresa forma parte de las plantas de producción que elaboran en el país las frituras de plátano que aprovechan un porcentaje del producto que se dividen en consumo directo (desecho directo) o por la industria (residuo con la capacidad de ser materia prima para producción de nuevos materiales).

1.1.3. PROPIEDADES Y COMPOSICIÓN DE CÁSCARA DE *Musa paradisiaca*

La fibra vegetal se clasifica en dos tipos: soluble e insoluble; la parte soluble puede contribuir a equilibrar el nivel de colesterol en la sangre, prevenir el cáncer

de colon, regular el tránsito intestinal y disminuir altos niveles de glucosa en la sangre, y la parte insoluble referida a la celulosa, lignina y algunas hemicelulosas; es fundamental para el tránsito intestinal ya que la celulosa tiene un efecto laxante mayor al de la fibra soluble, lo cual combate el estreñimiento (Moreira, K., 2013).

La *Musa paradisiaca* es una planta medicinal que ha reportado poseer propiedades farmacológicas tales como: prevenir y tratar cálculos renales, antioxidante, antibacteriano, antidiabético, previene úlceras, antidiarreico, hipo colesterolémico, hepato protector, antídoto de veneno de serpiente, cicatrización de heridas, crecimiento de cabello y actividad anti fúngica (Lavanya, K., 2016).

La cáscara de plátano está compuesta por una matriz lignocelulósica, la cual consiste de lignina, hemicelulosa y celulosa. La celulosa puede ser transformada a azúcares para la producción de componentes de valor agregado por fermentación. Por lo tanto, es recomendable llevar a cabo un pretratamiento con el fin de acceder a la celulosa y la hemicelulosa para producción de estos azúcares. El pretratamiento ácido y térmico es usado para exponer estos componentes (Duque, S.H., 2014).

Tabla 1.3: Composición de los remanentes del plátano (Moreira, K., 2013).

Componentes	Cáscara de plátano verde	Cáscara de plátano maduro
% Humedad	91.62	95.66
% Proteína Cruda	5.19	4.77
% Fibra Cruda	11.58	11.95
Energía bruta, kcal	4,383	4,592
% Calcio	0.37	0.36
% Fósforo	0.28	0.23
% Cenizas	16.30	14.58

La cáscara de plátano verde tiene un contenido muy alto de taninos, que confieren un sabor astringente a la fruta y limitan su digestibilidad. Sin embargo, conforme avanza la maduración de la fruta los taninos se transforman y se pierde el sabor astringente; mientras que la cáscara de plátano madura contiene 2.7% de fructosa, 3.2% de glucosa y 7.8% de sacarosa (valores aproximados en base seca).

1.2. GENERALIDADES DEL ALMIDÓN PRESENTE EN LA CÁSCARA DE PLÁTANO

Según Melo, D. (2015), el almidón es un biopolímero extraído de diversas fuentes naturales como tubérculos, cereales, legumbres y frutos inmaduros; es de gran importancia por constituir la mayor fuente de nutrición para animales y humanos, es una materia prima importante para la industria por ser un material renovable, abundante, biodegradable y de bajo costo.

Hay un creciente interés por la obtención de almidón a partir de fuentes no convencionales por presentar propiedades fisicoquímicas y funcionales diferentes a los almidones convencionales aislados de maíz, arroz, trigo y papa. El plátano se ha estudiado como una fuente alterna para la obtención de almidón y se ha resaltado su potencial debido a sus propiedades físicas, químicas y funcionales, a su digestibilidad, modificación química y usos industriales.

El almidón presente en la cáscara de plátano puede ser utilizado para el desarrollo de nuevos productos debido a sus características y propiedades: la temperatura de gelatinización del almidón de la cáscara de plátano es de 65 °C, en función de la concentración de sacarosa; la viscosidad final incrementa en relación con el enfriamiento de los almidones y se asocia con el fenómeno de retrogradación y con el contenido de amilosa.

1.2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALMIDÓN

El almidón es el principal polisacárido de reserva de la mayoría de los vegetales, y la principal fuente de calorías de la mayoría de la humanidad. No es una sustancia única, al proceder de distintas fuentes varían en su composición, pero tienen en común estar constituidos por amilosa y amilopectina, ambas formadas por unidades de glucosa, unidas por enlaces α -glucosídicos; la amilopectina (80% del almidón) y amilosa (20% del almidón) difieren en estructura molecular, propiedades físicas y biológicas. Según el Portal Químico de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos (USAC), 2005; la amilosa, es un polímero con las unidades de anhidro glucosas presentes y unidas en su mayoría por enlaces glucosídicos α -(1-4), dando lugar a una cadena lineal.

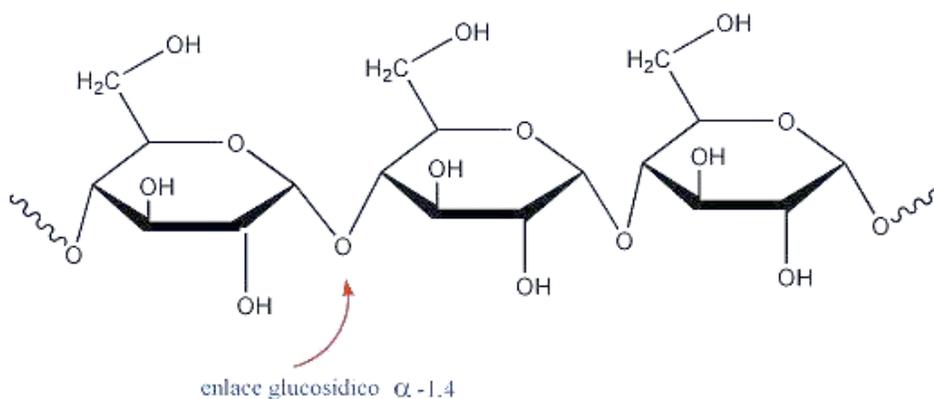


Figura 1.4: Segmento de amilosa del almidón (USAC, 2005).

La otra fracción del almidón es la amilopectina, que son moléculas más grandes que la amilosa y contienen enlaces glucosídicos α -(1 \rightarrow 4) y α -(1 \rightarrow 6) y ramificaciones que dan a su forma molecular la semejanza a un árbol.

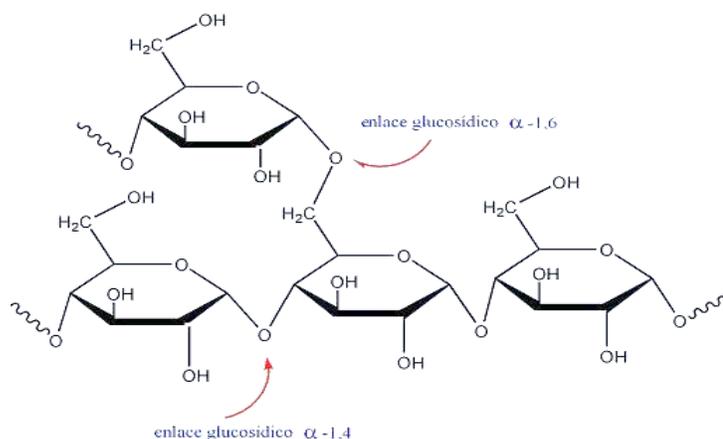


Figura 1.5: Segmento de amilopectina del almidón (USAC, 2005).

1.2.2. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN A AZÚCARES FERMENTABLES

La hidrólisis, o ruptura de las moléculas en medio acuoso, tiene como finalidad la transformación de los polímeros de glucosa (almidón y celulosa) en azúcares sencillos, consiste en la doble descomposición de la molécula de agua (H^+ y OH^-) con otro compuesto, en la cual sus átomos forman otra especie química. Por la naturaleza disolvente del agua, también puede efectuarse la hidrólisis mediante adición de un ácido o una enzima (Herrera, A., 2013).

Tanto la amilosa como la amilopectina dan por hidrólisis total, únicamente D-glucosa, por hidrólisis parcial en condiciones adecuadas, pueden obtenerse los correspondientes tri y tetrasacáridos (Geissman, T., 1974).

1.2.3. HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL ALMIDÓN

La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos en sus monómeros elementales (Oliva, J., 2003).

Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos como el ácido sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico con variaciones en las condiciones de concentración y temperatura (Galbe, M., 2002); de este proceso se obtiene una fracción líquida rica en azúcares fermentables y una fracción sólida compuesta de celulosa y lignina (Morales, S., 2015).

Sin embargo, sólo los ácidos clorhídrico y sulfúrico han sido empleados a escala industrial. En la hidrólisis ácida, el ion hidronio (H_3O^+) realiza un ataque electrofílico sobre el átomo de oxígeno del enlace glucosídico α ($1 \rightarrow 4$) (figura 7a).

En el paso siguiente, los electrones en uno de los enlaces carbono-oxígeno se mueven sobre el átomo de oxígeno (figura 1.7 b) para generar un intermedio de

carbocatión inestable de alta energía (figura 1.7 c). El intermedio de carbocatión es un ácido de Lewis, por lo que posteriormente reacciona con agua (figura 1.7 d), una base de Lewis, que conduce a la regeneración de un grupo hidroxilo (figura 1.7 e).

La concentración del ácido, el pH, la temperatura y tiempo de hidrólisis son los parámetros de los cuales depende el grado de degradación. Por ello, las reducciones del peso molecular y de la viscosidad son inversamente proporcionales al poder de reducción que aumenta por acción del ácido (Herrera, A., 2013).

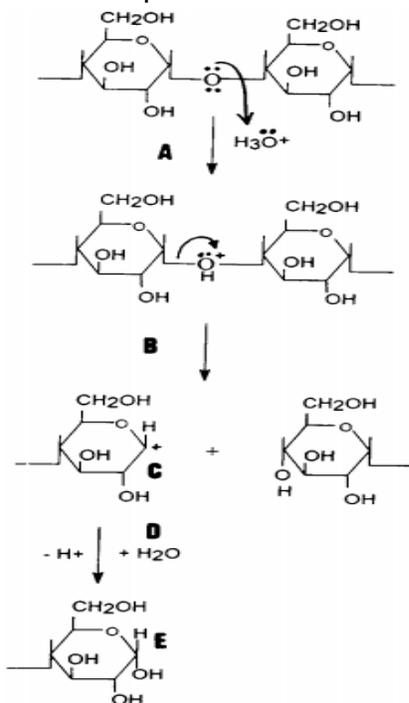


Figura 1.6: Mecanismo de hidrólisis ácida del almidón (Hoover, 2000).

La concentración del ácido, el pH, la temperatura y el tiempo de hidrólisis son los parámetros de los cuales depende el grado de degradación. Por consiguiente, las reducciones del peso molecular y la viscosidad son inversamente proporcionales al poder de reducción que aumenta por acción del ácido (Herrera, A., 2013).

1.2.4. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN A PARTIR DE MICROORGANISMOS

Tradicionalmente el proceso para la obtención de dextrosas a partir del almidón se realizaba en medio ácido (pH 2 y a 140 °C), pero con los avances de la industria biotecnológica, se ha logrado investigar y trabajar con diferentes microorganismos que produzcan enzimas capaces de romper cadenas del almidón.

Las enzimas son los principios activos de los microorganismos y, en realidad, son las responsables de las biorreacciones; tienen una importancia creciente en el desarrollo industrial sostenible: éstas pueden sustituir, en algunos procesos, a

productos químicos tóxicos o corrosivos, pueden evitar trabajar en condiciones extremas de operación y pueden desactivarse y descomponerse en productos más simples totalmente biodegradables (CAR/PL, 2003).

Según Sánchez, O. (2005), el almidón fue tradicionalmente hidrolizado mediante ácidos, pero la especificidad de las enzimas, sus condiciones suaves de reacción y la ausencia de reacciones secundarias han hecho que las amilasas sean los catalizadores usados para esta tarea; siendo las más conocidas la α -amilasa y la β -amilasa, las primeras desdoblan el almidón en glucosa y maltosa, y la segunda, convierte la totalidad del almidón en glucosa.

Existen dos fases dentro del proceso de hidrólisis enzimática, primero, la licuefacción y segundo, la sacarificación. La licuefacción se lleva a cabo en presencia de α -amilasa o β -amilasa, a altas temperaturas (de 90 a 110 °C) para el rompimiento de los gránulos de almidón, condición necesaria para el tratamiento enzimático. El producto de esta etapa es una solución de almidón que contiene dextrinas (oligosacáridos compuestos por varias unidades de glucosa, los resultantes de la hidrólisis) y pequeñas cantidades de glucosa. El almidón licuado se somete a sacarificación a menores temperaturas (de 60 a 70 °C) con glucoamilasa o pollulanasa, la cual hidroliza las dextrinas hasta glucosa.

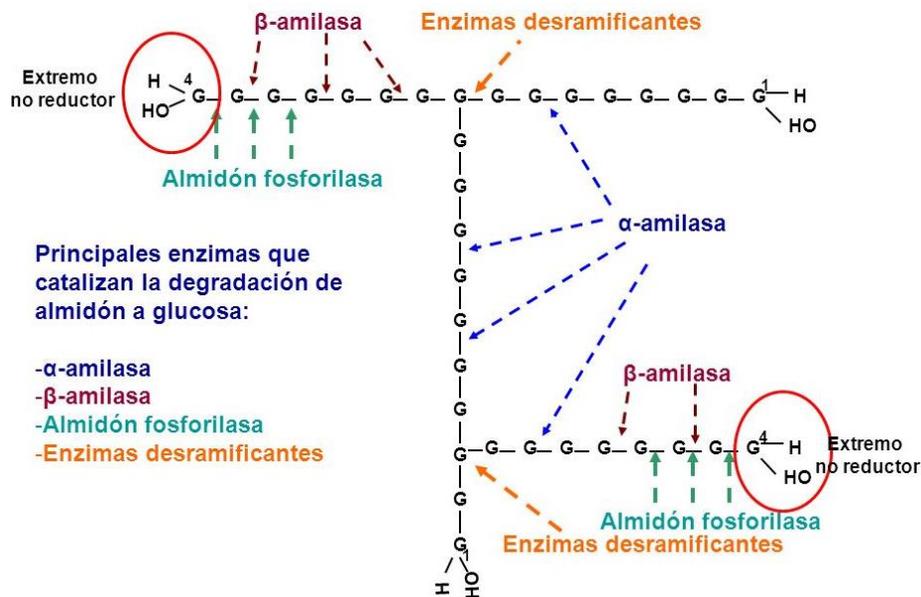


Figura 1.7: Mecanismo de hidrólisis enzimática del almidón (Sánchez, O., 2005).

Al utilizar amilasas, es preciso mantener un proceso de cocción que favorezca la dispersión y la aceleración del rompimiento de las cadenas de almidón. Las amilasas actúan sobre el almidón dependiendo de su origen (Herrera, A., 2013).

1.3. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

La cáscara de plátano está compuesta por una matriz lignocelulósica, la cual consiste de una matriz de carbohidratos, compuesta de celulosa y lignina enlazada por cadenas de hemicelulosa, pero el compuesto que constituye en mayor porcentaje (base seca) a la cáscara es el almidón.

La composición generalizada de la cáscara del plátano en estado verde permite conocer la constitución de este material y su potencial aprovechamiento. En la **tabla 1.4**, según Duque, S. (2014) se presenta la composición aproximada de la cáscara de plátano verde en porcentaje peso:

Tabla 1.4: Composición aproximada de la cáscara de plátano verde (Duque, S., 2014).

COMPONENTE	%	COMPONENTE	%
Humedad	81.60	Almidón	5.23
Materia seca		Amilosa	1.49
Proteína	1.35	Amilopectina	3.74
Leucina	0.09	Fibra	5.67
Valina	0.07	Celulosa	1.68
Thr (treonina)	0.07	Hemicelulose	1.08
Phe (fenilalanina)	0.07	Lignina	2.90
Ile (Isoleucina)	0.05	Azucares	0.71
Lys (Lisina)	0.05	Glucosa	0.33
His (Histidina)	0.03	fructosa	0.36
Trp (Triptófano)	0.02	Sacarosa	0.02
Met (Metionina)	0.01	Cenizas	1.25
		K	1.12
Glu (Acido glutamico)	0.25	Ca	4.72E-02
Asp (Acido Aspartico)	0.19	P	4.90E-02
Gly (Glicina)	0.09	Mg	1.90E-02
Ala (Alanina)	0.08	Na	1.23E-02
Ser (Serina)	0.08	Fe	5.43E-04
Pro (Prolina)	0.07	Cu	2.55E-05
Arg (Arginina)	0.06	Zn	4.77E-04
Tyr (Tirosina)	0.04	Mn	2.72E-04
Cys (Cisteina)	0.03	Pectina	3.71
Grasas	0.49	GalA (Ac. galacturonico)	3.71
Laurico (12:0)	3.72E-03		
Myristic (14:0)	0.02		
Pentadecanoic (15:0)	0.01		
Palmitico (16:0)	0.19		
Stearic (C18:0)	0.02		
Arachidic (C20:0)	0.01		
Oleico (C18:1)	0.02		
Linoleic (C18:2)	0.11		
Alfa Linoleic (C18:3)	0.12		

1.4. ANTECEDENTES DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico un ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo lo cual da lugar a actividad óptica y lo convierte en un ácido α -hidroxílico (AHA) de fórmula molecular $C_3H_6O_3$. Existen dos isómeros ópticos y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de ambos isómeros L(+) y D(-). Es uno de los primeros productos orgánicos conocidos, fue descubierto aislándolo de la leche agria en 1780 por el químico sueco Scheele, fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur en 1847 y Littlelon en 1881 inicia la fermentación a escala industrial (Serna-Cock, L., 2005).

Existen dos formas de obtener este ácido: la síntesis química y la vía biotecnológica (Estela, W., 2007). La síntesis química está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para obtener lactonitrilo y ser hidrolizado a ácido láctico, otro tipo de reacción se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en ácido sulfúrico como catalizador (Serna-Cock, L., 2005). La vía biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos, depende del tipo de microorganismo y sus parametros de operación (Hofvendahl, K., 2000).

El ácido láctico tiene diversas aplicaciones en la industria: en la farmacéutica como electrolito y fuente de minerales; en la cosmética como buffer, antimicrobiano y agente rejuvenecedor; en la química como neutralizante, solvente y limpiador; y en la alimentaria como acidulante, preservante y antimicrobiano. Es gracias a la diversidad de aplicaciones que este ácido tiene que se han realizado distintos estudios para su obtención, la mayoría se han llevado a cabo con las bacterias ácido lácticas (BAL) y hongos filamentosos del género *Rhizopus* (R) (García, C., 2010).

Al utilizar bacterias en la producción de ácido láctico por fermentación se busca que sean preferiblemente: termófilas, de rápida fermentación y se usen sustratos baratos con adición mínima de nutrientes nitrogenados que crezcan en condiciones de valores bajos de pH, que presenten poca producción de biomasa y una despreciable cantidad de subproductos (Akerberg, C., 1998).

Según Serna-Cock, L. (2005), *Lactobacillus delbrueckii* es el microorganismo más utilizado de las BAL en la producción a gran escala de ácido láctico, debido a la ventaja de producir únicamente isómeros L(+), consumir eficientemente glucosa y ser termófilo con temperatura óptima de crecimiento a 41.5 °C; esto reduce los costos de enfriamiento y esterilización, y riesgos de contaminación microbiológica en el fermentador. Este microorganismo crece óptimamente a un pH entre 5.5 y 6.5, demandando continuamente ser neutralizado a medida se produce ácido láctico.

La fermentación fúngica tiene la ventaja de requerir un medio simple para producir ácido láctico, pero también tiene requerimientos elevados de aireación. Haung produjo ácido láctico a partir de aguas residuales que contenían fécula de patata utilizando *R. oryzae* y *R. arrhizus*.; y Tay inmovilizó *R. oryzae* en lecho fibroso con glucosa y almidón para producir ácido láctico (García, C., 2010).

La dificultad que presenta la producción de ácido láctico con mohos es su forma física, ya que el gran tamaño de los micelios o sus agregados puede provocar un aumento en la viscosidad del medio de fermentación que incrementa la demanda de oxígeno y resistencia a la transferencia de masa en el proceso fermentativo, disminuyendo los rendimientos en conversión (Dong-Mei, B., 2003). Como la forma física del crecimiento del hongo está influenciado por el pH del medio, la agitación, la aireación, el nivel de inóculo y la concentración de sustrato; éstas variables son manipuladas para disminuir la viscosidad en el medio de cultivo (Bulut, S., 2004).

Gil, R. (2008), en su investigación produjo ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja y propone un proceso para la obtención de este ácido a partir de la biotransformación de cáscara y bagazo de naranja en fase sólida con *Rhizopus oryzae*. Recomienda llevar a cabo estudios más detallados encaminados a obtener mejores condiciones de biorreacción que lleven al *R. oryzae* a consumir los azúcares degradados durante la hidrólisis de la cáscara de naranja y que al mismo tiempo permitan ofrecer un mayor rendimiento en la producción de ácido láctico durante su desarrollo. Concluye que la biotransformación y la secuencia de separación juegan papeles muy importantes en la obtención del ácido.

Según García, C. (2010), Rivas produjo ácido láctico de la mazorca del maíz por sacarificación y fermentación simultánea utilizando *Lactobacillus rhamnosus*; Wee informó la producción económica de ácido L(+) láctico de melaza de azúcar por fermentación batch con *Enterococcus faecalis*; y Kourkoutas utilizó para la producción del ácido láctico *Lactobacillus casei* inmovilizado en trozos de frutas.

En la producción biotecnológica de ácido láctico con bacterias o con hongos se han investigado sustratos que disminuyan los costos de producción: materiales celulósicos, licores sulfíticos, granos dañados, sustratos amiláceos como desechos agrícolas y porciones comestibles de granos o tubérculos (Fausto, F., 1997). Sin embargo, según Hofvendahl, K. (2000) la producción requiere los siguientes pasos:

- i. Hidrólisis del sustrato hasta azúcares fermentables.
- ii. Fermentación de azúcares a ácido láctico.
- iii. Separación de biomasa y partículas sólidas del medio de fermentación.
- iv. Purificación del ácido láctico obtenido.

1.5. GENERALIDADES DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico, ácido 2-hidroxipropanoico, es un compuesto orgánico (ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxílico); en solución puede perder el hidrógeno unido al grupo carboxilo y convertirse en el anión lactato. Es muy versátil utilizado en las industrias química, farmacéutica de alimentos y del plástico. Fue descubierto en 1780 por el químico Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación en 1847.

El ácido láctico, o su forma ionizada, el lactato, es un monocarboxílico de tres átomos de carbono y un grupo alcohol en el carbono central. Es un líquido incoloro, soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter del petróleo y disulfuro de carbono.

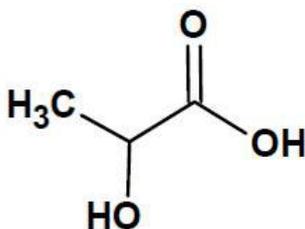


Figura 1.8: Estructura molecular del ácido láctico (Barragán, A., 2012).

El ácido láctico en dosis altas es irritante y corrosivo. La ingestión accidental de una solución concentrada de ácido puede causar vómitos violentos colapso circulatorio y hematemesis, también puede producir perforación estomacal.

Este es un compuesto que puede sufrir diversas conversiones químicas resultando ser compuestos potencialmente útiles para la industria como lo son el propilenglicol, el óxido de propileno y el ácido poliláctico (PLA). Además, es fuertemente higroscópico, es soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter de petróleo y disulfuro de carbono. Su producción ha venido aumentando con el tiempo debido principalmente al desarrollo de los polilactatos, debido a que ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizados y producidos con diferentes propiedades dependiendo de la composición.

1.5.1. ENANTIÓMEROS (ISÓMEROS ÓPTICOS) DEL ÁCIDO LÁCTICO

En química, los enantiómeros (del griego 'ένάντιος', enántios, "opuesto", y 'μέρος', méros, "parte" o "porción"), también llamados isómeros ópticos, son una clase de estereoisómeros tales que en la pareja de compuestos la molécula de uno es imagen especular de la molécula del otro y no son superponibles.

Las dos formas enantiómeras tienen las mismas propiedades físicas excepto la interacción con la luz polarizada en un plano, dependiendo de la dirección del

mismo se asigna una denominación: dextrógiro (D-) si lo hace hacia la derecha (sentido horario), y levógiro (L+) si lo hace girar hacia la izquierda (sentido anti horario). Su comportamiento frente a la luz polarizada se debe a que la molécula carece de plano de simetría, distinguiendo dos isómeros especulares.

Tabla 1.5: Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico (Serna-Cock, L., 2005).

Formula molecular:	C ₃ H ₆ O ₃
Formula química semi-desarrollada:	H ₃ C-CH(OH)-COOH
Nombre químico:	Ácido Láctico
Nombre IUPAC:	Acido 2-Hidroxipropanoico
Punto de fusión:	L(+) y D(-): 52.8 a 54 °C
Punto de ebullición:	125-140 °C
Calor de combustión:	3,616 cal/g
Viscosidad:	40.33 mNsm ⁻²
Densidad:	1.249
Constante dieléctrica:	22ε

El ácido láctico tiene dos enantiómeros (isómeros ópticos): Uno es el dextrógiro ácido D(-)-láctico o d-ácido láctico y el otro es el levógiro ácido L-(+)-láctico o l-ácido láctico, que es el que tiene importancia biológica.

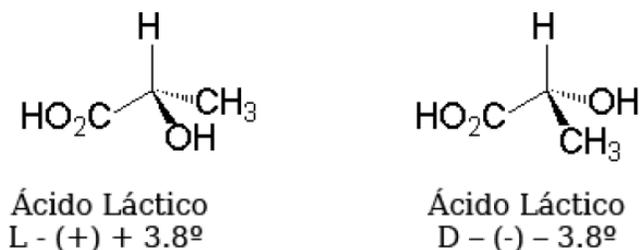


Figura 1.9: Enantiómeros del ácido láctico (Barragán, A., 2012).

1.5.2. PROCESOS DE OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

La síntesis química comercial se lleva a cabo con la reacción en fase líquida y a presión atmosférica de cianuro de hidrógeno y acetaldehído, catalizada por una base, para formar lacto-nitrilo, el cual es recuperado por destilación e hidrolizado a ácido láctico utilizando HCl o H₂SO₄ concentrado para producir ácido láctico crudo y sal de amonio. El ácido láctico crudo es esterificado con metanol, produciendo lactato de metilo, para recuperarse y purificarse por destilación e hidrolizarse con agua bajo un catalizador ácido produciendo ácido láctico puro. La principal desventaja es la obtención de mezclas racémicas de ácido D(-) y L(+) láctico.

La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D(-) o L(+), óptimamente activos. La producción biotecnológica

depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos.

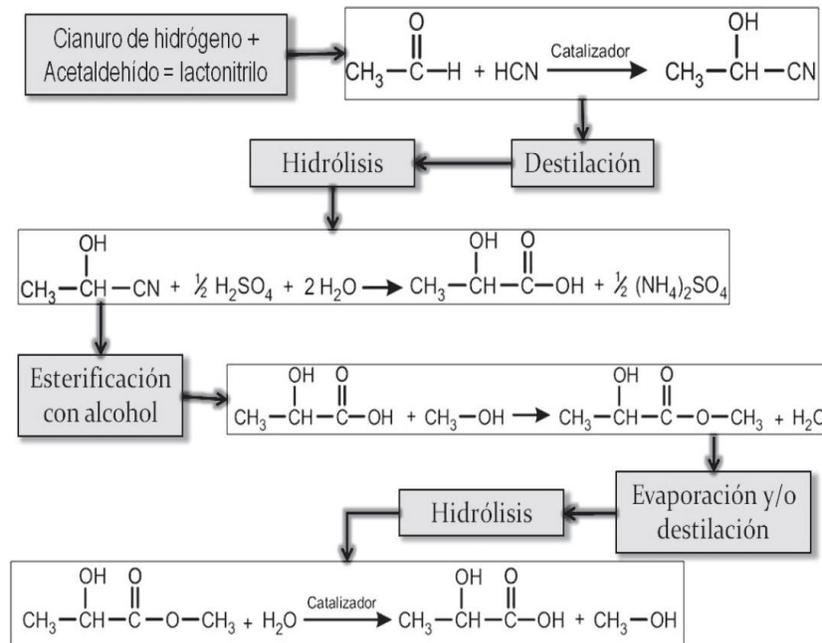


Figura 1.10: Secuencia de producción de ácido láctico por síntesis química (Gil, R., 2008).

Los requerimientos nutricionales son complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B. La mayoría de BAL producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico. Las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, producen únicamente isómeros L(+), mientras las especies del género *Leuconostoc* producen únicamente isómeros D(-).

Sin embargo, algunas BAL producen formas racémicas donde el isómero predominante depende de cambios en la aireación, cantidad de NaCl, tipo de fermentación, incrementos en pH y concentración de sustrato.

1.5.3. USO DEL ÁCIDO LÁCTICO DENTRO DE LA INDUSTRIA PRODUCTIVA

El ácido láctico y sus derivados como sales y ésteres, son utilizados según sus especificaciones de manera amplia en (Serna-Cock, L., 2005):

- En la industria alimenticia se usa como acidulante y conservante.
- La industria química se usa como solubilizador y agente controlador de pH.
- En las curtiembres es utilizado para remojar los cueros y desencalarlos.
- En la producción de pinturas y resinas, se usa como solvente biodegradable.
- En la industria textil ayuda en el teñido e impresión.
- En la agricultura se utiliza como acidulante.

- g) En la industria de plásticos se usa como precursor del ácido poliláctico (PLA).
- h) En la industria farmacéutica, sus sales de hierro y calcio tienen un importante uso en la producción de medicamentos.

Las especificaciones de calidad dependen del uso, la **tabla 1.8** muestra las especificaciones del ácido láctico en la industria farmacéutica y de alimentos de Estados Unidos, basada en especificaciones de Food Chemical Codex (FCC).

Tabla 1.6: Especificaciones de calidad el ácido láctico (Serna-Cock, L., 2005).

Parámetro	Grado farmacéutico	Grado FCC	Grado Alimenticio
Pureza (%)	88	95-105	80
Cloruros (%)	0.008	0.2	0.02
Sulfatos (%)	0.02	0.25	0.05
Arsénico (mg/kg)	4	3	0.2
Metales pesados mg/kg)	33	10	10
Hierro (mg/kg)	10	10	10
Cenizas (%)	0.1	0.1	0.1

1.5.4. ACTUALIDAD DEL CONSUMO, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Históricamente el uso del ácido láctico ha incrementado como intermediario en procesos químicos específicos y de aplicabilidad en sectores alimenticios, farmacéuticos y biotecnológicos a tal punto que puede ser catalogado como “commodity” (producto destinado a uso comercial) en la presente década con una tendencia clara al incremento de su uso, producción y comercialización.

Según Grand View Research, Inc. (2017), en el año 2016 el tamaño del mercado del ácido láctico y ácido poliláctico (PLA) se valoró en \$2.08 billones y \$1.29 billones, respectivamente. Las proyecciones del mercado muestran un aumento significativo dentro del período de pronóstico del estudio de mercado desde el año 2014 al año 2025, debido al aumento de uso en empaques, cuidado personal y textiles. La demanda creciente de ácido láctico como precursor de la producción de PLA se espera que conlleve a una demanda de al menos los próximos ocho años.

La demanda global para el ácido láctico en 2016 fue de 1,220,000 toneladas y se proyecta que para 2025 alcance un crecimiento a 1,844,560 toneladas con una tasa anual compuesta de crecimiento (CAGR, siglas en inglés) del 16.2% del 2017 al 2025. El incremento de uso en cremas, champús, y productos del cuidado de la piel que aumenten la claridad de la piel, mejoren el colágeno y la síntesis de elastina, aceleren la exfoliación y regeneración celular, se esperan que impulsen la

expansión de la industria en el período de pronóstico. El aumento en la demanda de productos de cuidado personal, permitiendo la introducción de productos más sofisticados desarrollando fórmulas para grupos particulares de consumidores y creando nuevos caminos de crecimiento para el mercado del ácido láctico.

Las aplicaciones emergentes de los bioplásticos en conjunto con favorables regulaciones de uso de biomateriales, se proyecta un aumento en la demanda del ácido poliláctico hasta el 2024. Incrementar la demanda de empaques de PLA promueve las soluciones medioambientalmente amigables y ayuda al aumentar las apariciones de productos para el crecimiento de la industria.

El aumento de la conciencia de los consumidores respecto a la necesidad de empaques sostenibles, confiables y ambientalmente amigables, proyectan una demanda global de PLA para el período de pronóstico. La industria textil es otro sector importante con una gran tasa de crecimiento y demanda, debido a que el ácido poliláctico ofrece suavidad y telas agradables. Adicionalmente el PLA posee excelente humedad, resistencia UV, baja flamabilidad y formación de vapores.

El segmento industrial se valuó en \$950.5 millones en 2016 y se espera que aumente significativamente como resultado de un incremento en el uso del producto en el sector químico y marítimo como agente descalcificador y removedor de resinas poliméricas en el fondo de los barcos. El segmento del cuidado personal se proyecta que crezca significativamente con una CAGR, siglas en inglés del 16.3% desde 2017 al 2025 como resultado del crecimiento en la demanda de perfumes mayoritariamente en Medio Oriente, América Latina y África Occidental. Además, la introducción de productos manufacturados y fáciles de usar al viajar se espera que estimulen el tamaño del mercado hasta el 2024.

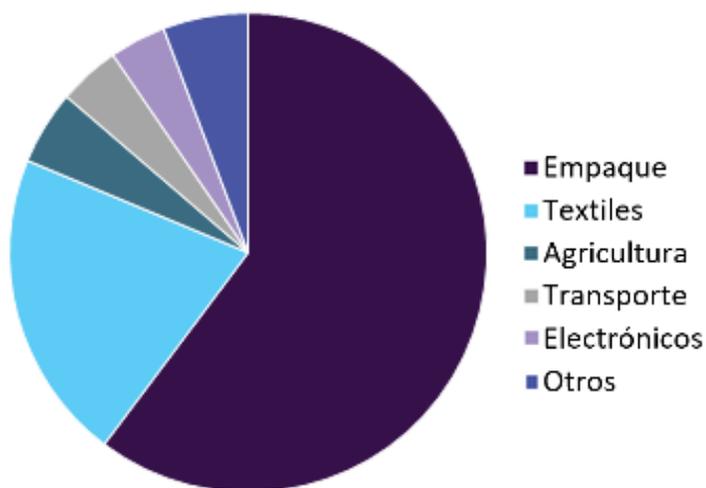


Figura 1.11: Volumen del mercado de ácido láctico por aplicación, %. (Grand View Research, 2017).

1.6. GENERALIDADES DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

La biotecnología es el conjunto de técnicas que utilizan la manipulación de organismos vivos para usos específicos o componentes sub-celulares (procesos biológicos), para obtener o transformar sustancias útiles con el fin de desarrollar procesos, o proporcionar servicios que mejoran la vida.

La creciente atención que ha tenido la biotecnología en la industria se debe a la demanda de procesos tecnificados que sean más limpios y presenten una alternativa sostenible a los procesos tradicionales. La biotecnología moderna tiene un gran potencial para satisfacer necesidades críticas de alimentación, agricultura, cuidados sanitarios y combate a los efectos negativos del cambio climático.

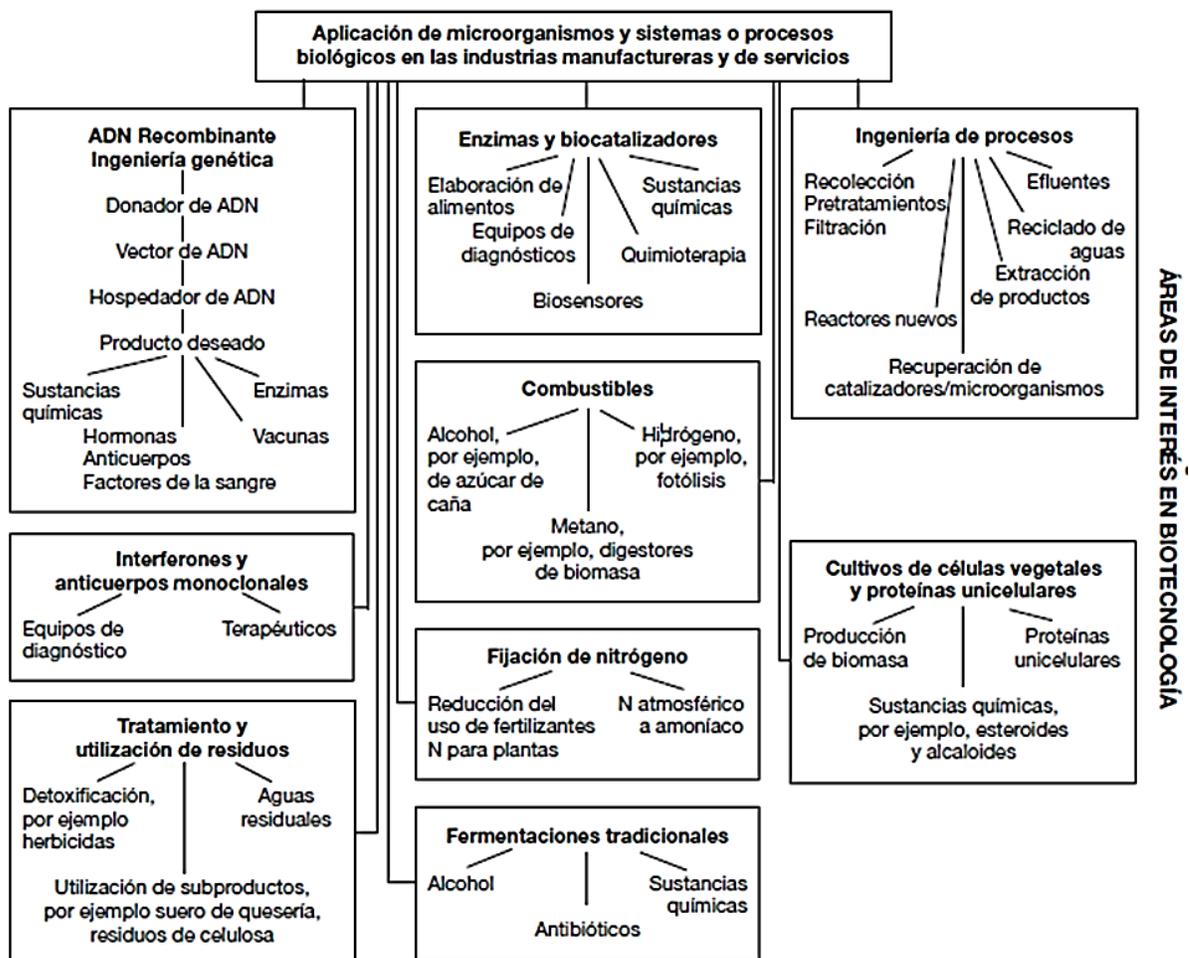


Figura 1.12: Aplicación de los microorganismos dentro de la industria productiva (CAR/PL, 2003).

La biotecnología microbiana trabaja con los microorganismos y los procesos que proceden de los mismos a nivel industrial, con la intención de obtener productos de interés para el ser humano. Se aplica el aislamiento, selección y conservación de microorganismos industriales, así como los factores ambientales que modifican

su crecimiento para la obtención de metabolitos primarios y secundarios en las principales industrias de interés biotecnológico (disolventes, aditivos, polímeros, productos alimenticios, sanitarios y agrícolas).

La biotecnología microbiana se puede dividir en dos fases distintas:

- a) **Tecnología microbiana tradicional:** implica la fabricación a gran escala de productos que los microorganismos son capaces de fabricar normalmente. La tarea del microbiólogo es modificar el proceso para aumentar el rendimiento.
- b) **Tecnología microbiana con organismos alterados genéticamente:** mediante procesos de ingeniería genética. La tarea del microbiólogo es modificar el microorganismo para aumentar el rendimiento deseado.

El crecimiento microbiano comprende distintas etapas:

- 1) **Fase de latencia:** posterior a la inoculación de una población bacteriana el crecimiento inicia al alcanzar la fase de latencia, esta representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que crezcan en un nuevo medio sin incremento en el número de células; pero sí en la actividad metabólica, contenido proteico y ADN.
- 2) **Fase exponencial o logarítmica:** período en el que el microorganismo crece exponencialmente. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima, las condiciones ambientales (temperatura, medio de cultivo, etc.) afectan la velocidad de crecimiento exponencial.
- 3) **Fase estacionaria:** una población de cultivos en recipientes cerrados no puede crecer indefinidamente de forma exponencial. Las limitaciones de crecimiento ocurren por agotar nutrientes esenciales, acumulación de productos tóxicos, saturación de células en el espacio disponible o combinación de estas.
- 4) **Fase de muerte:** Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y seguir metabolizando hasta iniciar una disminución progresiva en el número de células viables que comience la fase de muerte.

Hay dos tipos básicos de metabolitos microbianos:

- i. **Metabolito primario:** es el que se fabrica durante la fase exponencial del crecimiento del microorganismo.
- ii. **Metabolito secundario:** es el que se fabrica cerca del final de la fase exponencial, con frecuencia cerca de la fase estacionaria.

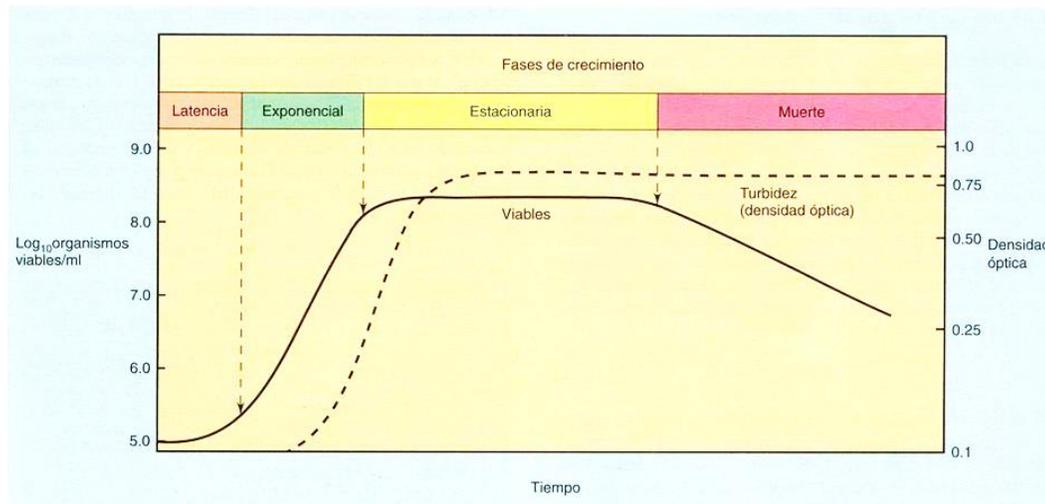


Figura 1.13: Curva de crecimiento bacteriano (Ilse Valderrama Heller, 2008).

1.6.1. ENZIMAS PRODUCIDAS A PARTIR DE BIOTECNOLOGÍA

Las enzimas son moléculas de proteínas que actúan como catalizadores de reacciones químicas, de síntesis y degradación de compuestos; éstas se encuentran en todos los seres vivos y son piezas esenciales en su funcionamiento. En reacciones enzimáticas, estas actúan sobre moléculas denominadas sustratos; que se convierten en moléculas complejas denominadas productos.

Es importante destacar que las enzimas no modifican el balance energético ni el equilibrio de aquellas reacciones en las que intervienen: su función se limita a ayudar a acelerar el proceso de forma catalítica. La actividad biocatalítica como metabolito primario de los microorganismos hace que éstos como seres unicelulares sean usados de forma eficaz como enzimas extracelulares; las cuales debido a que poseen puentes disulfuro facilitan su aislamiento y purificación, generan mayor volumen, son más puras y estables. Tanto un hongo como una bacteria pueden ser utilizados para producir enzimas.

Las enzimas amilolíticas están distribuidas ampliamente en la naturaleza, actúan hidrolizando uniones entre residuos de glucosa adyacentes. El tipo de unión hidrolizada así como el producto final de la hidrólisis es característico de cada tipo de enzima. El término amilasa fue usado originalmente para designar a enzimas capaces de hidrolizar uniones glicosídicas del tipo α -1,4 de amilosa, amilopectina, glucógeno y sus productos de degradación. Se pueden agrupar según su patrón de hidrólisis en seis diferentes clases:

- i. Enzimas que hidrolizan sólo uniones α -1,4 deteniéndose algunos residuos antes de un punto de ramificación (α -1,6). Dentro de estas categorías se encuentra la β -amilasa.

- ii. Enzimas que hidrolizan sólo uniones α -1,4 sin ser afectadas por enlaces α -1,6. Dentro de esta categoría se encuentra la α -amilasa.
- iii. Enzimas que hidrolizan enlaces α -1,4 y α -1,6. Dentro de esta categoría se encuentra la glucoamilasa.
- iv. Enzimas que hidrolizan solamente enlaces α -1,6. se pueden mencionar enzimas desramificantes como la pululanasa y la isoamilasa.
- v. Enzimas que hidrolizan enlaces α -1,4. Sólo en cadenas lineales de muy pocos residuos. se puede mencionar la enzima α -glucosidasa.
- vi. Enzimas que hidrolizan el almidón a ciclodextrinas. Dentro de esta categoría se encuentra la amilasa producida por *Bacillus macerans*.

1.6.2. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL *Aspergillus oryzae*

El *Aspergillus oryzae* es un moho aerobio que consiste en filamentos largos, a modo de hilos de células ramificados cuyo conjunto forma un micelio, masa enredada o agregado análogo a tejido. Estas células se conocen como cenocíticas y poseen tabiques transversales llamados septos, con un poro único o múltiples poros, que permiten fluir al citoplasma; denominándose septada y se componen de una pared celular externa que contiene el citosol y los orgánulos (Prescott, L., 2002).

La estructura microscópica es única: tienen células tabulares y conidioforas cuya cabeza está localizada en el extremo de la misma, compuesta por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula. De las fiálides se desprenden las esporas o conidios. Las colonias en un inicio son blancas y esterelladas, en etapa de esporulación son verde claro.

Los mohos crecen mejor en hábitats oscuros y húmedos, pero se encuentran donde haya materia orgánica disponible. La mayoría de los hongos son saprofitos, obteniendo sus nutrientes de materia orgánica muerta. Al igual que numerosas bacterias, los hongos liberan exoenzimas hidrolíticas que digieren a sustratos externos. Después absorben los productos solubles. Son quimioorganoheterótrofos y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono, electrones y energía.

El glucógeno es el polisacárido de almacenamiento primario en los hongos. La mayoría de los hongos emplean hidratos de carbono (preferiblemente glucosa o maltosa) y compuestos nitrogenados para sintetizar sus propios amino-ácidos y proteínas. (Prescott, L., 2002). El método de reproducción asexual es la producción de esporas. La división Ascomycota contiene hongos llamados ascomicetos, denominados comúnmente como hongos de saco por su estructura reproductora característica: el asea, reproduciéndose mediante conidiosporas

En parte de la identificación de especies dependen de las diferencias en sus cabezas conidiales así como la morfología y disposición de los conidios.

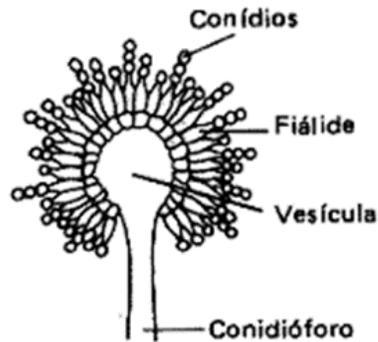


Figura 1.14: Conidióforo del *Aspergillus*.

El *Aspergillus oryzae* es un hongo usado en la cocina japonesa por su potencial amiolítico con la facultad de excretar grandes cantidades de diferentes tipos de enzimas capaces de hidrolizar polisacáridos como el almidón y llevarlos a monosacáridos por medio de las enzimas α -amilasa y glucoamilasa, con la posibilidad de producir proteasa.

La enzima primaria secretada por este moho filamentoso se llama amilasa, esta enzima es más eficiente a una temperatura de 35 a 40 °C. Los miembros del género *Aspergillus* son distintos de otros microbios debido al hecho de que utilizan tanto un sistema metabólico primario como secundario, dependiendo de sus ácidos carboxílicos.

- El metabolismo primario del *Aspergillus oryzae* recibe su energía a través del contacto con fuentes de energía, luego secreta enzimas que degradan las proteínas y los enlaces peptídicos dentro del almidón y los convierten en aminoácidos y azúcares para el consumo.
- El metabolismo secundario utiliza compuestos ácidos para suprimir las vías metabólicas, otorgando la capacidad al *Aspergillus oryzae* de modificarse de acuerdo con su ambiente actual, son capaces de aumentar o disminuir su aptitud para permitir una eficiencia metabólica óptima.

El *Aspergillus oryzae* la fermentación en sustrato sólido (SSF), un proceso utilizado para hacer diferentes tipos de alimentos de la salsa de soja al sake y vinagre debido a su capacidad de secretar enzimas útiles. Se utiliza en el cultivo de sake rociándose sobre arroz, cebada o soja y fermentado a una temperatura ideal inferior a 45 °C, se espolvorea sobre el grano y el hongo (llamado tane koji "semilla koji" por los japoneses) crece en el grano cocido al vapor, que luego aumenta la temperatura y el nivel de humedad para permitir la propagación.

Las enzimas que segrega descomponen los almidones y proteínas dentro de los granos y lo convierten en aminoácidos y azúcares, micelios debidamente cultivados se caracteriza por filamentos blancos esponjosos que cubren el exterior.

Tabla 1.7: Taxonomía del *Aspergillus oryzae*.

Dominio:	Eukaryota
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Clase:	Eurotiomycetes
Orden:	Eurotiales
Familia:	Trichocomaceae
Genero:	Aspergillus
Especie:	<i>Aspergillus oryzae</i>

1.6.3. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA DEL *Lactobacillus delbrueckii*

Los *Lactobacillus* son bacilo microaerofilos de un género de bacterias *Gram positivas* anaerobias aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierten la lactosa y algunos monosacáridos en ácido láctico, dando lugar a la fermentación láctica de dos tipos:

- a) **Homofermentativos:** dan lugar a ácido láctico como producto principal de fermentación, algunos ejemplos son los *Lactobacillus*.
- b) **Heterofermentativos:** producen además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y otros productos volátiles; como el *Lactobacillus fermenti*.

La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias patógenas. Algunas especies de *Lactobacillus* se usan industrialmente para la producción de yogur y de otros alimentos fermentados; son los únicos seres vivos que no requieren hierro para vivir y tienen una tolerancia extremadamente alta al peróxido de hidrógeno.

En su metabolismo, los lactobacilos van de la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas. Los miembros de este género transforman glucosa, hexosas aldehídicas similares, carbohidratos y alcoholes polihidroxílicos, en ácido láctico por fermentación.

El *Lactobacillus delbrueckii* es una bacteria en forma de bacilo (bastoncillo), gram positiva y son inmóviles, común para la especie es su capacidad de fermentar sustratos de azúcar en ácido láctico levógiro (90% en su transformación) de manera anaeróbica, por término medio la sacarosa y la maltosa. Hay cuatro subespecies diferenciadas por sus metabolitos y su genética interna conocida hasta la fecha.

Las propiedades que definen a *Lactobacillus delbrueckii* como una bacteria homofermentativa de ácido láctico no están limitadas por su producto final metabólico.

Tabla 1.8: Taxonomía del *Lactobacillus delbrueckii*.

Dominio:	Bacteria
Grupo:	Terrabacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Lactobacillales
Familia:	Lactobacillaceae
Genero:	Lactobacillus
Especie:	L. delbrueckii

Como habitante de productos lácteos fermentados y productores de ácido láctico, el *Lactobacillus delbrueckii* es la causa de su ambiente ácido, los requerimientos nutricionales se adaptan al ambiente de la bacteria; incluyendo a aminoácidos, vitaminas, carbohidratos y ácidos grasos insaturados. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 40 a 44 °C en condiciones anaerobias. Los requerimientos de nutrientes incluyen: fosfato de piridoxamina, ácido timidínico, caseína, e histidina y las series de péptidos son estimulantes para su crecimiento.

1.7. FERMENTACIÓN LÁCTICA Y MICROORGANISMOS FERMENTADORES

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representado por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como principal producto de fermentación de carbohidratos.

Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por ácidos orgánicos.

La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D(-) o L(+), ópticamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos.

En el uso de bacterias para la producción de ácido láctico por fermentación se prefiere que sean termófilas, que fermenten rápido y consuman la mayor cantidad de sustrato de fácil adquisición, alto rendimiento en la formación de ácido láctico L(+) con la adición mínima de nutrientes nitrogenados, que se desarrollen en condiciones de valores de pH ácidos, que tengan poca producción de biomasa y una cantidad pequeña de metabolitos secundarios.

La clasificación de las BAL en géneros diferentes está basada en principio en la morfología, modo de fermentación del sustrato (homo y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia a cambios de pH.

Los microorganismos más utilizados para obtener ácido láctico son cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a géneros *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Serna-Cock, L., 2005).

La mayoría de estos microorganismos BAL utilizan carbohidratos como las hexosas necesitan requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y ácido fólico):

Existen dos tipos de fermentaciones lácticas:

- a) Fermentación homoláctica.** Todos los miembros del género *Streptococcus*, *pediococcus* y muchas especies de *Lactobacillus* fermentan la glucosa fundamentalmente para la obtención de energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico con poca acumulación de otros productos finales.

El ácido láctico se produce en condiciones anaerobias, la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. En esta reacción la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico se reduce a ácido láctico por acción de la enzima láctico deshidrogenasa, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo en este proceso se emplean dos moléculas de NAD⁺ que actúan como aceptores de electrones y pasan a formar el NADH (forma reducida de NAD⁺) actuando como dador de electrones, pasa en la tercera etapa de la vía glucolítica.

La fermentación homoláctica puede además dar lugar a una mezcla de ácidos cuando existe una concentración de glucosa limitante, cuando se

incrementa el pH, se aumente la temperatura o se fermentan azúcares diferentes a la glucosa; en este caso radica en el metabolismo del piruvato, el cual además de producir ácido láctico produce formiato y acetil-CoA por la enzima piruvato formiato liasa.

b) Fermentación heteroláctica. En este tipo de fermentación solo la mitad de la glucosa se convierte en ácido láctico, el resto se transforma en una mezcla de anhídrido carbónico (CO₂), ácido fórmico, ácido acético, etc. Algunas bacterias lácticas carecen de la enzima fructosa-1,6-P aldolasa, por lo que no pueden utilizar la ruta glucolítica para el metabolismo de hexosas. En este caso los azúcares se pueden incorporar a la ruta de las pentosas fosfato. A grandes rasgos se puede establecer una similitud entre esta ruta y la glucólisis. Las reacciones son diferentes, pero se pueden estructurar en fases con mismas funciones, algunas bacterias heterolácticas son del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus* en diferentes condiciones a su fermentación.

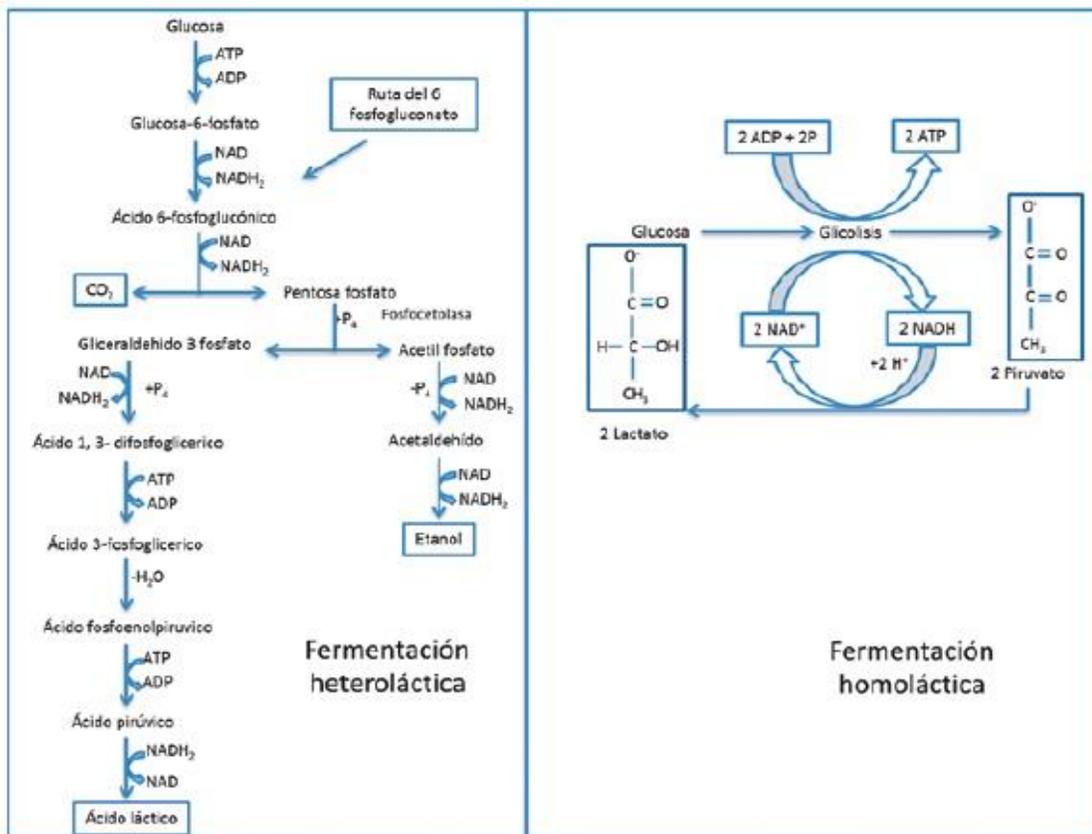


Figura 1.15: Fermentaciones homoláctica y heteroláctica. (Stanier, R., 2011).

CAPÍTULO II.
MÉTODOLOGÍAS DE ANÁLISIS
PARA LA OBTENCIÓN DE
ÁCIDO LÁCTICO.

En el presente capítulo se detallarán las metodologías de los procedimientos experimentales empleados en la investigación: incluyendo la metodología de inoculación de *Aspergillus oryzae* y *Lactobacillus delbrueckii*, la determinación de las propiedades de la cáscara de plátano, la verificación de los procesos de transformación investigados cuantificando carbohidratos totales, carbohidratos reductores totales, carbohidratos no reductores, y ácido láctico; exponiendo tanto los parámetros de operación controlados como estudiados en el desarrollo de los procedimientos. Se detalla el equipo utilizado para la producción de ácido láctico y la metodología de cálculo del rendimiento del proceso.

2.1. PRETRATAMIENTO DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

Según Barrientos, L.E. (2016), los procedimientos que se deben de realizar posterior a la recolección de la muestra de cáscara de plátano son los siguientes:

- a) **Acondicionamiento de la cáscara de plátano:** la materia prima es lavada y posteriormente clasificada por su estado, eliminando los restos de basura. Una vez realizado el acondicionamiento, la materia prima es procesada.
- b) **Tratamiento físico de la cáscara de plátano:** La reducción del tamaño de la materia prima es uno de los métodos efectivos para aumentar la accesibilidad de las enzimas a la lignocelulosa, utilizando la molienda se logra reducir el tamaño de las partículas y la cristalinidad de la lignocelulosa, aumentando el área de superficie y reducir el grado de polimerización.

El pretratamiento permitió que el rendimiento en la hidrólisis de la cáscara de plátano aumentará, existen diferentes métodos desarrollados para diversas clases de sustratos; sin embargo, ningún método de pretratamiento propuestos se puede aplicar en forma genérica a diferentes materias primas (Claassen, P., 1999).

Tabla 2.1: Métodos de pretratamiento para hidrólisis de cáscara de plátano (Claassen, P., 1999).

Métodos	Procedimiento	Observaciones
Secado	Deshidratación	Deshidratación del sustrato en horno a 65 °C por 24 horas.
Pulverizado mecánico	Molienda	Reducción de tamaño de partícula hasta obtener un polvo entre 37 µm (U.S. Mesh 400) y 105 µm (U.S. Mesh 140).

I. Determinación de porcentaje de humedad (método en estufa de aire). Referencia: Instituto Nacional de Normalización (INI), NCh 841 OF78.

El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta su constancia en estufa de aire, se aplica a alimentos sólidos, líquidos o pastosos no susceptibles a degradación a temperatura superior a 105 °C. Es inadecuado para productos con sustancias volátiles distintas del agua.

Procedimiento: Método en estufa de aire

- I. Efectuar el análisis por triplicado.
- II. Colocar beaker de 250 ml por 1 hora en estufa a la temperatura de secado del producto (65 °C).
- III. Empleando pinzas trasladar el beaker al desecador y enfriar de 30 a 45 min.
- IV. Pesar el beaker en balanza semianalítica. Registrar (M1).
- V. Pesar la muestra dentro del beaker. Registrar (M2).
- VI. Colocar la muestra dentro de la estufa a 65 °C y tiempo de 24 horas.
- VII. Sacar la muestra de la estufa, enfriar en desecador durante 30 a 45 min. Pesar la muestra desecada (M3).

El contenido en agua de la muestra se calcula por diferencia de peso y se expresa en % de humedad (g de H₂O/100 g de muestra):

$$\%H = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} * 100$$

2.2. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÁSCARA DE PLÁTANO POR HIDRÓLISIS QUÍMICA Y FERMENTACIÓN LÁCTICA CON *Lactobacillus delbrueckii*

Para llegar a obtener ácido láctico a partir de cáscara de plátano es necesario reducir las cadenas de almidón que componen el sustrato, es por ello que se lleva a cabo una hidrólisis, que convertirá al carbohidrato en azúcares reductores.

Según Villa-Veléz, H. (2012), las mejores condiciones para realizar una hidrólisis más eficiente de las cáscaras de plátano, pueden darse a temperaturas altas o bajas, para la variable concentración de ácido sulfúrico (H₂SO₄) no fue encontrado un efecto significativo sobre la respuesta, sin embargo, la variable de concentración de la cáscara por mililitro de ácido está sujeta a la concentración de ácido sulfúrico donde fue observado una fuerte influencia sobre las respuestas.

El proceso de hidrólisis química se llevó a cabo dentro de un autoclave Tuttnauer, modelo 3870EL-D, a una temperatura de 121 °C y presión de 15 psi, en una relación de 2:1 para el ácido sulfúrico 5% p/v y gramos de cáscara de plátano molida, respectivamente. Luego de la hidrólisis ácida se reajustó el pH del medio para que éste esté en condiciones para llevar a cabo la fermentación láctica; este ajuste de pH se hizo con KOH al 10 N.

Existen dos tipos de fermentaciones que se llevan a cabo en las industrias alimenticias: cultivo en estado sólido (SSF: solid state fermentation) y cultivo sumergido (SmF: submerged fermentation). En el primero el sustrato a transformar

por el microorganismo es un sólido, en el segundo, los nutrientes se encuentran en forma soluble en un medio líquido (Aidoo, K., 1982; Hesseltine, C., 1972). En los SmF los microorganismos se desarrollan flotando libremente en el volumen de medio de cultivo o formando agregados más o menos esféricos (pellets) en el caso de los cultivos de hongos (Conalepfelixtovar, 2012).

La fermentación con *Lactobacillus delbrueckii* se desarrolló en cultivo sumergido en un reactor diferente al que se realizará la hidrólisis ácida, pero se fortificó con ciertos compuestos para crear un nuevo medio de cultivo que cuente con los nutrientes necesarios para el desarrollo de esta bacteria; este cultivo sumergido fue anaerobio y discontinuo, en donde los microorganismos crecen a partir de una limitada cantidad de medio hasta que se agota un nutriente esencial o se acumulan productos tóxicos hasta inhibir crecimiento (Conalepfelixtovar, 2012).

2.3. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE CÁSCARA DE PLÁTANO POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON *Aspergillus oryzae* Y FERMENTACIÓN LÁCTICA CON *Lactobacillus delbrueckii*

El almidón es una larga cadena de monosacáridos que están unidos gracias a enlaces glucosídicos; la enzima producida por el *Aspergillus oryzae*, α -amilasa, se encargará de romper estos enlaces, creando maltotriosa y maltosa a partir de la amilosa, y maltosa, glucosa y α -dextrinas a partir de amilopectina (Sierra, C., 2012).

Para este estudio se ha escogido trabajar con cultivo en estado sólido, de este tipo de fermentación se distinguen dos clases, la primera se refiere a aquellos cultivos en los que el material sólido, insoluble en agua y humedecido, actúa al tiempo como principal fuente de nutrientes y como soporte físico para el microorganismo, en ocasiones el sustrato es enriquecido con nutrientes adicionales para mejorar la producción (Kumar, P., 1987; Lonsane, B., 1985; Rao, P., 1993). En la segunda clase se consideran los cultivos en los que el soporte es un sólido nutricionalmente inerte que actúa únicamente como lugar de anclaje del microorganismo, y que, para el cultivo, se embebe en una solución nutritiva (Pastrana, L., 1996). El primer tipo de fermentación con cultivo sólido, donde el soporte del microorganismo coincide con el sustrato, método adoptado para realizar la hidrólisis de la cáscara de plátano.

Siendo las enzimas α -amilasa y β -amilasa producidas por el hongo las que hidrolizan las cadenas de carbohidratos presentes en la cáscara de plátano, se propone primeramente trabajar la formación de un extracto enzimático, colocando 5 gramos de cáscara molida en 20 ml de una solución nutritiva (metodología se

expondrá en el capítulo 3) e inoculando con 1 ml de *Aspergillus oryzae* dentro de un erlenmeyer de 250 ml, siendo incubado el tiempo óptimo para la formación de enzimas, este extracto enzimático se coloca después en una cierta cantidad de cáscara molida de plátano para dar paso a la formación de azúcares reductores.

Resumiendo: el proceso de hidrólisis enzimática consiste inicialmente en la obtención de un extracto enzimático que se adiciona posteriormente a una cierta cantidad de cáscara molida de plátano para que hidrolice el almidón presente.

Según Lonsane, B., (1985), algunas variables que condicionan los cultivos en estado sólido y deben ser tomadas cuenta son:

- I. **Contenido en humedad del sustrato:** se encuentra en función de la naturaleza del mismo, los requerimientos del microorganismo y el tipo de producto final, muy relacionado con la actividad del agua (a_w). La humedad para el *Aspergillus oryzae* en el crecimiento del hongo son del 40% y en el crecimiento de las enzimas producidas son del 70% (Sánchez, S., 2017).
- II. **Temperatura:** una consecuencia del metabolismo de los microorganismos es una elevación de la temperatura de los fermentadores, en mayor medida en zonas internas del sustrato; afectando el crecimiento, germinación de las esporas y la formación del producto. En condiciones de laboratorio el calor generado se disipa sin dificultad, siendo necesario un aporte externo de energía para mantener una temperatura adecuada para los cultivos; el crecimiento del *Aspergillus oryzae* se trabajó en una incubadora (Lab Gravity Convection Incubator, Precision Scientific-Modelo 4) a temperatura de 32 °C, ya que la temperatura óptima para la formación de amilasas con el hongo es de 30 a 35 °C (Sánchez, S., 2017), y para la activación de las enzimas se realizó un baño maría a las temperaturas de 37 °C y 67 °C por cuarenta minutos cada una, ya que son las temperaturas óptimas para la producción de las α -amilasas y β -amilasas, respectivamente.
- III. **Aireación y agitación:** la aireación depende del tipo de microorganismo y el estado del sustrato (fermentación en estado sólido), el grado de eliminación tanto del calor como del CO₂ y el espesor de la capa de sustrato empleada. La aireación se dio dentro de los Erlenmeyer ya que los tapones fueron de gaza y papel crepe (permite el paso de oxígeno). La agitación se llevó a cabo de forma mecánica con agitador magnético en el momento que se adicionó el extracto enzimático a la cáscara de plátano molida.
- IV. **pH:** el control de este parámetro se vuelve un poco difícil para este tipo de cultivos, pero poseen una relativa estabilidad con el indicador; en ocasiones resulta conveniente realizar la humectación del sustrato con soluciones

tampón para evitar cambios de pH en áreas localizadas, sobre todo en los casos en que los cultivos no se someten a agitación y la fuente de nitrógeno se suministra como sales de amonio, circunstancias que promueven bruscos descensos de pH. (Torrado, A., 1993). Se realizaron las lecturas de pH en el rango entre 5 y 7 al extracto enzimático con la ayuda del pHmetro Fisher Scientific Accumet basic AB15 Plus, posterior al método DNS.

Posterior a la hidrólisis con *Aspergillus oryzae* se realizó la fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii* en un reactor diferente al empleado en la hidrólisis enzimática, con cultivo sumergido, asegurando que el medio tenga las condiciones necesarias para el buen crecimiento de la bacteria y de ácido láctico.

2.4. NECESIDADES NUTRICIONALES DE LOS MICROORGANISMOS A INOCULAR

Cumplir las necesidades nutricionales de los microorganismos es esencial para la producción de metabolitos deseados como precursores del ácido láctico.

2.4.1. *Aspergillus oryzae*

Un cultivo solo crecerá en un medio de cultivo si contiene todos los nutrientes necesarios en una forma disponible y si son adecuados el resto de los factores del medio ambiente (Conalepfelixtovar, 2012). Los residuos agroindustriales son considerados generalmente los mejores sustratos para procesos de fermentación en estado sólido, la producción de enzimas por SSF no es excepción (Ellaiah, P. 2002).

Los microorganismos aerobios en general necesitan fuentes de vitaminas, minerales, agua, nitrógeno, energía, carbono, oxígeno (Hernández, A., 2003):

- a) Fuente de energía:** en su mayoría los microorganismos aprovechan los compuestos de carbono como fuente de energía, los más empleados son los carbohidratos, que tienen la ventaja de ser además fuente de oxígeno, hidrógeno y energía metabólica.
- b) Fuente de nitrógeno:** el nitrógeno es un elemento importante en la composición de los microorganismos, puede tener dos orígenes, nitrógeno orgánico (aminoácidos, urea, proteínas, pirimidinas, purinas) y nitrógeno inorgánico (amonio, nitrato, nitritos, gas amonio, nitrógeno molecular).
- c) Fuentes de otros elementos:** se requieren de otros elementos en menor cantidad para la subsistencia de los microorganismos, por ejemplo, los fosfatos que constituyen la fuente de fósforo que actuará como buffer (se agregan en exceso para que no se agoten en el proceso), otros elementos son azufre, potasio, magnesio, calcio, cloro (como macronutrientes); y

cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc (como micronutrientes), generalmente se encuentran presentes como impurezas en otros.

- d) Factores de crecimiento:** son necesarios para el crecimiento de los microorganismos, hay que adicionarlos ya que muchos no pueden sintetizarlos, se clasifican en vitaminas (tiamina, biotina, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxal, etc.), aminoácidos (arginina, lisina, triptófano, ácido glutámico, etc.), factores misceláneos (ácidos grasos, Tween 80, esteroides).

Se tomó como base para la construcción del medio de cultivo del *Aspergillus oryzae* la tabla nutricional del arroz, ya que en este cereal es muy utilizado como sustrato del *Aspergillus* para la producción de alimentos fermentados. El porcentaje de carbono en el arroz japonés es 91% y 9% de proteína.

Tabla 2.2: Contenido nutricional de variedades de arroz (FAO, 2004).

Tipo de arroz	Proteína (g/100 g)	Hierro (mg/100 g)	Cinc (mg/100 g)	Fibra (g/100 g)
Blanco pullido	6.8	1.2	0.5	0.6
Integral	7.9	2.2	0.5	2.8
Rojob	7.0	5.5	3.3	2.0
Púrpura	8.3	3.9	2.2	1.4
Negro	8.5	3.5	-	4.9

Tabla 2.3: Cantidades nutricionales mínimas para crecimiento del *Aspergillus oryzae* (Hernández, A., 2003)

	Compuesto	Cantidad mínima	Fuente de medio
Fuente de carbohidratos	Almidón, azúcares reductores	25 g/L	Cáscara de plátano
Fuente de Nitrógeno	Proteína	2.25 g/L	Cáscara de plátano
Fuente de manganeso	MnSO ₄	0.05 g/L	Enriquecido directamente
Fuente de calcio	CaCO ₃	0.005 mg/L	

2.4.2. *Lactobacillus delbrueckii*

Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales, los medios en que se desarrollan deben contener ciertos macro y micro nutrientes para que los procesos metabólicos y de crecimiento realizados por los microorganismos se concreten sin problema (Barragán, A., 2012).

La familia BAL no requieren carbohidratos como fuente de energía y de carbono solamente, sino también de nucleótidos, aminoácidos y vitaminas para su crecimiento en un medio definido (Hébert, E., 2004). Según Samaniego, L. (2000), generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de

cultivo contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura por eso, estos compuestos se incluyen en el medio Man, Rogosa, Sharpe (M.R.S.). Según Wang, M. (2010), la composición aproximada de la cáscara de plátano verde (tabla 2.4); se presenta la siguiente tabla para llevar a cabo la fermentación con *Lactobacillus delbrueckii* para un litro de agua destilada:

Tabla 2.4: Cantidades nutricionales mínimas para el *Lactobacillus delbrueckii* (Hernández, A., 2003).

	Compuesto	Cantidad mínima	Fuente en medio fermentativo
Fuente de carbono	Azúcares reductores	25 g/L	Hidrólisis del almidón de la cáscara de plátano
Fuente de Nitrógeno	Proteína	5 g/L	Cáscara de plátano
Complejo B (B ₁ , B ₆ , B ₁₂)	Extracto de levadura	14 g/L	Enriquecido directamente
Fuente de fósforo	K ₂ HPO ₄	1 g/L	
Fuente de magnesio	MgSO ₄	0.58 g/L	
Fuente de manganeso	MnSO ₄	0.2 g/L	

2.5. METODOLOGÍA DE INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Un inóculo es una concentración definida de microorganismo capaz de garantizar las condiciones óptimas de fermentación en un volumen dado de sustrato para obtener el máximo de viabilidad de microorganismo y evitar pérdida de metabolitos de interés. El valor del inóculo dependerá del microorganismo, tipo de medio, proceso de fermentación y valor de metabolito deseado; en la preparación del inóculo se implica el desarrollo de una población de microorganismo desde su estado de conservación hasta obtener la suspensión viable y apta para reproducirse y producir metabolitos. Etapas de preparación del inóculo (Prescott, L., 2002):

- I. **Reactivación del microorganismo:** Es la etapa secuencial de activación del microorganismo puro, que inicia con la conservación de este último, para hacerlo viable para sus usos posteriores. Estos pueden estar conservados en crioviales, en suspensión, liofilizado, tubos de agar inclinados, etc. Dependiendo de su método de conservación, será su procedimiento de activación que puede ser desde la hidratación con agua destilada estéril para luego promover su crecimiento con medios de cultivo líquidos enriquecidos y se incuba de acuerdo las condiciones idóneas del microorganismo.
- II. **Etapas de adaptación del microorganismo:** Esta etapa tiene como objetivo que el microorganismo crezca dentro del sustrato, no siendo el medio ideal:
 - a) **Primera fase:** se prepara un nuevo medio de cultivo, tomando un 50% del medio ideal para el microorganismo y se le agrega el otro 50% del

sustrato (tomando como base la cantidad de azúcares del medio ideal como el 100%), ajustar pH al del medio ideal con NaOH 1 N ó HCl 1 N y esterilizar a 121 °C y 15 psi; tomar un inóculo del microorganismo para la adaptación de la etapa de reactivación y sembrar en el medio preparado en una relación 1:9, incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 48 horas, después se coloca el medio con el microorganismo en refrigeración a 4 °C hasta su uso (puede durar 7 días).

b) Segunda Fase: se prepara un nuevo medio de cultivo, tomando un 25% del medio ideal para el microorganismo y se le agrega el otro 75% del sustrato (tomando como base la cantidad de azúcares del medio ideal como el 100%), ajustar pH al del medio ideal con NaOH 1 N ó HCl 1 N y esterilizar a 121 °C y 15 psi; tomar un inóculo del microorganismo para la adaptación de la etapa de la primera fase y sembrar en el medio preparado en una relación 1:9, incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 48 horas, después se coloca el microorganismo con el medio en refrigeración a 4 °C hasta su uso (puede durar 7 días).

III. Propagación y cosecha del microorganismo en medio sólido: Se toma el microorganismo de la etapa de adaptación de la segunda fase y se coloca por extendido en placa Petri o botellas Roux conteniendo medio de cultivo nutritivo sólido (agar), incubar a las condiciones idóneas del microorganismo hasta que se prolifere el crecimiento de este. La cosecha se realiza después de la proliferación del microorganismo por medio de lavado con solución salina y perlas de ebullición y se recolectan los lavados en un frasco para luego estandarizar la concentración de esta solución con microorganismo que posteriormente será la que servirá como inóculo.

IV. Estandarización del microorganismo: Se involucra la solución cosecha de microorganismo para encontrar su concentración en unidades formadoras de colonias (UFC), se determinará por método directo de cuantificación de células en una cascada de dilución en solución salina hasta donde sea posible la cuantificación de la población de microorganismo en placa Petri (entre 30 y 300 UFC) por vertido en placa. Esta etapa es fundamental para tener reproducibilidad a la hora de realizar las fermentaciones.

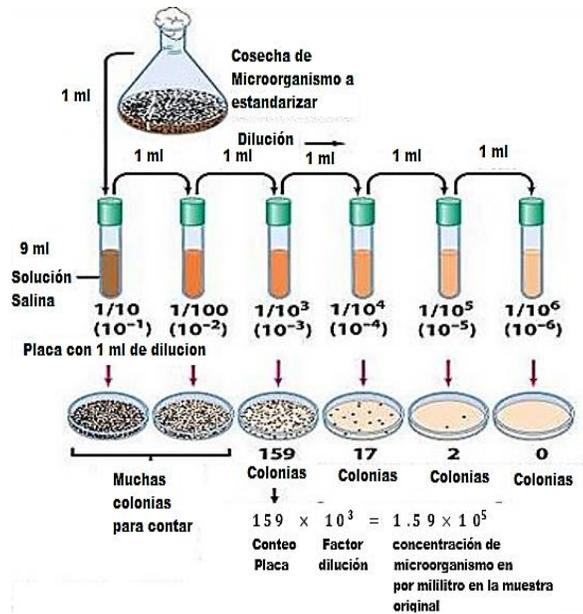


Figura 2.1: Procedimiento de estandarización de microorganismos (Akerberg, C., 1998).

Es importante conservar los microorganismos de trabajo con viabilidad durante un periodo de tiempo, los cultivos de microorganismos con determinadas características son esenciales para la mayoría de los ensayos de microbiológicos.

Conservar un cultivo es un requisito indispensable para buenas prácticas de laboratorio, los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar cuando se le subcultiva con frecuencia, con la finalidad de mantener las cepas durante largos periodos de tiempo sin que se produzcan cambios en éstas. Hay varios métodos para conservar microorganismos dependiendo el tiempo que se les desee mantener viables y de sus características fisiológicas: métodos de largo y corto plazo.



Figura 2.2: Métodos de conservación de microorganismos.

2.5.1. INOCULADO DE *Aspergillus oryzae* EN CÁSCARA DE PLÁTANO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN

Antes de la incubación es importante que los requerimientos nutricionales del sustrato se cumplan en el medio, el pH y las condiciones ambientales estén controlados. La cepa del microorganismo *Aspergillus oryzae* que se utilizará para el estudio de producción de azúcares fermentables a partir del almidón de la cáscara de plátano en una presentación de bolsa de 10 gramos de microorganismo liofilizado. Se utilizaron agar y caldo Sabouraud 2% dextrosa, consultar: "**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**".

Para la inoculación es necesario preparar los reactivos que serán utilizados en el procedimiento de inoculación: Solución salina pH 6: NaCl al 0.9% p/v, sulfato de manganeso 0.05 g/L, extracto de levadura (consultar: "**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**"); 14 g/L, ácido cítrico 2 N como regulador de pH, polisorbato 80 0.5% p/v. Etapas de inoculación del proceso (Prescott, L., 2002):

- I. **Etapas de reactivación del microorganismo:** pesar 1 gramo de *Aspergillus oryzae* liofilizado y colocarlo en 100 ml de caldo Sabouraud; incubar por 72 horas a 32 °C. Después de incubado, se puede guardar el cultivo madre en refrigeración (de 4 a 8 °C) por 30 días.
- II. **Etapas de adaptación del microorganismo:**
 - a) **Primera fase:** se prepara un nuevo medio de cultivo, tomando un 50% de caldo Sabouraud (10 g/L) y se le agrega el otro 50% (27.78 g/L) de cáscara de plátano (tomando como base la cantidad 20 g/L de azúcares del caldo Sabouraud como el 100%), ajustar pH entre 5.7 ± 0.2 con NaOH 1 N o HCl 1 N y esterilizar a 121 °C y 15 psi; tomar un inóculo para la adaptación de la etapa de reactivación y sembrar en el medio preparado en una relación 1:9, incubar a la temperatura 32 °C por 48 horas, después se coloca el medio con el microorganismo en refrigeración a 4 °C hasta su uso (puede durar 7 días).
 - b) **Segunda Fase:** se prepara un nuevo medio de cultivo, tomando un 25% del caldo Sabouraud (5 g/L) y se le agrega el otro 75% (41.67 g/L) de cáscara de plátano (tomando como base la cantidad 20 g/L de azúcares del caldo Sabouraud 100%), ajustar pH 5.7 ± 0.2 con NaOH 1 N o HCl 1 N y esterilizar a 121 °C y 15 psi; tomar un inóculo del microorganismo para la adaptación de la etapa de reactivación y sembrar en el medio preparado en una relación 1:9, incubar a la temperatura 32 °C por 48 horas, después se coloca el microorganismo con el medio en refrigeración a 4 °C hasta su uso (puede durar 7 días).

- III. Propagación y cosecha del microorganismo:** del cultivo donde se ha adaptado el microorganismo en la segunda fase, se tomará 1 ml y se inoculará por extendido en placa sobre una caja Petri (diámetro 90 mm y altura 20 mm) conteniendo aproximadamente 20 ml de agar Sabouraud; luego sellar la placa y cultivar a 32 °C hasta que el microorganismo esporule y cubra toda la placa (aproximadamente 7 a 14 días). De las cajas Petri con el *Aspergillus oryzae* esporulado se recolectará y suspenderán en la solución.
- IV. Estandarización del microorganismo:** se realizan diluciones sucesivas de 10^{-1} a 10^{-11} en solución salina y se sembrarán por el método de vertido en placas por triplicado conteniendo agar Saboraud en condiciones estériles; bajo cabina de flujo laminar, luego incubar las placas a 20 °C por 5 días.
- V. Recuento de colonias en placa:** se escogen las placas de la dilución que permita contabilizar adecuadamente las que muestren entre 30 y 300 colonias (deberá ser el promedio del conteo de las placas que se llevó por triplicado en cada dilución), los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramos (UFC/ml).

$$Ufc. ml^{-1} = N^{\circ} de colonias en placa(entre 30 y 300) * inverso de la dilucion * 10$$

- VI. Inoculación:** de la solución estandarizada se inocula al 10% en base al volumen del medio semisólido del biorreactor y se homogenizará antes de colocarlo a fermentar de manera semisólida (condiciones aeróbicas).

2.5.2. INOCULADO DE *Lactobacillus delbrueckii* PARA LA FERMENTACIÓN LÁCTICA EN LICOR DE HIDRÓLISIS ÁCIDA O ENZIMÁTICA

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron M.R.S. Caldo y M.R.S. Agar: fueron desarrollados por Man, Rogosa y Sharpe (de ahí el nombre) para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y de otras bacterias ácido lácticas. El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias gram negativas.

Se utilizó agar y caldo M.R.S., consultar: “**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**”. Etapas de inoculación del proceso (Prescott, L., 2002):

- I. Siembra, características y especificaciones del microorganismo *Lactobacillus delbrueckii*:** para realizar el proceso fermentativo se utilizó el

cultivo líquido WLP677 *Lactobacillus delbrueckii*, marca White Labs, con número de lote: 1033431. Los medios de cultivo a utilizar serán caldo y agar M.R.S. Para la inoculación es necesario preparar los reactivos que serán utilizados en el proceso de inoculación: solución buffer pH 6.0 y glicerina.

II. Etapa de reactivación del microorganismo: se inoculan 5 ml de cultivo líquido WL677 en 50 ml de caldo M.R.S. y se incubará a 40 °C durante 72 horas. Se guardará el cultivo madre en refrigeración (de 4 a 8 °C) por 7 días.

III. Etapa de adaptación del microorganismo.

a) Primera fase: se prepara un nuevo medio de cultivo, tomando un 50% de caldo M.R.S. (10 g/L) y se le agrega el otro 50% (312.5 ml/L) del licor hidrolizado de la cáscara de plátano por acción enzimática (tomando como base la cantidad 20 g/L de azúcares del caldo M.R.S. como el 100%), ajustar pH 6.5 ± 0.2 con NaOH 1 N ó HCl 1 N y esterilizar a 121 °C y 15 psi; tomar un inóculo del microorganismo para la adaptación de la etapa de reactivación y sembrar en el medio preparado en una relación 1:9, incubar a la temperatura 40 °C por 48 horas, después de la incubación colocar el medio con el microorganismo en refrigeración a 4 °C hasta usarse (el microorganismo puede vivir 7 días en refrigeración).

b) Segunda Fase: se prepara un nuevo medio de cultivo, tomando un 25% del caldo MRS (5 g/L) y se le agrega el otro 75% (468.7 ml/L) del licor hidrolizado de la cáscara de plátano por acción enzimática (tomando como base la cantidad 20 g/L de azúcares del caldo M.R.S. como el 100%), ajustar pH 6.5 ± 0.2 con NaOH 1 N ó HCl 1 N y esterilizar a 121 °C y 15 psi; tomar un inóculo del microorganismo para la adaptación de la primera fase y sembrar en el medio preparado en una relación 1:9, incubar a 40 °C por 48 horas, después de la incubación colocar el medio con el microorganismo en refrigeración a 4 °C hasta usarse.

IV. Propagación y cosecha del microorganismo: del cultivo de adaptación de la segunda fase se toma 1 ml y se inocula por extendido en placa sobre una caja Petri (diámetro 90 mm y altura 20 mm) conteniendo aproximadamente 20 ml de agar MRS; se cultiva a 40 °C por 72 horas y se recolecta.

V. Estandarización del microorganismo: se realizan diluciones sucesivas de 10^{-1} a 10^{-11} en solución buffer y se sembrarán por el método de vertido en placas de Petri por triplicado, conteniendo agar M.R.S. esterilizadas bajo cabina de flujo laminar; luego incubar placas a 40 °C por 48 horas.

VI. Recuento de colonias en placa: se escogen las placas de la dilución que permita contabilizar adecuadamente las que muestren de entre 30 y 300

colonias (debe ser el promedio del conteo de las placas que se llevó por triplicado en cada dilución), los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramos (UFC/ml)

$$Ufc. ml^{-1} = N^{\circ} de colonias en placa(entre 30 y 300) * inverso de la dilucion * 10$$

La solución estandarizada de trabajo (cosecha del microorganismo) se ocupará como el inóculo a una concentración del 2% v/v con respecto al volumen del biorreactor a condiciones de fermentación sumergida (anaeróbicas).

VII. Conservación del microorganismo: después se efectuará una inoculación de 5 ml del cultivo reactivado en 45 ml de caldo M.R.S conteniendo el 10% (v/v) de glicerol, se colará este caldo inoculado en crioviales de 1 ml; posteriormente se guardará estos crioviales en ultra congelador a -70 °C.

2.6. METODOLOGÍA DE VERIFICACIÓN DE PROCESOS QUÍMICOS Y METABÓLICOS PROPUESTOS UTILIZANDO LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR EN CADA ETAPA

La verificación de los procesos químicos y metabólicos se realizó según la **tabla 2.5**, para verificar avance acorde al tiempo hasta concentraciones constantes.

Tabla 2.5: Metodologías de verificación procesos químicos y metabólicos propuestos.

Tipo de muestra	Procesos	Etapas en biorreactor	T (°C)	pH	Verificación de procesos propuestos		
					Metodología	Tiempo	Método
Cáscara plátano verde	1. Hidrólisis química 2. Fermentación láctica	Hidrólisis química	121	N/A	I. Determinación Carbohidratos Totales	Antes del proceso	Espectrofotometría visible
					II. Determinación Azúcares Reductores	Cada 5 minutos	
		Fermentación <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	40	6.5-7.0	II. Determinación Azúcares Reductores	Antes del proceso y al finalizar	
					IV. Determinación Ácido Láctico	Cada 12 horas	
Cáscara plátano verde	1. Hidrólisis enzimática 2. Fermentación láctica	Hidrólisis con <i>Aspergillus oryzae</i>	32	5.0-7.0	I. Determinación Carbohidratos Totales	Antes del proceso	Espectrofotometría visible
					II. Determinación Azúcares Reductores	Cada 12 horas	
		Fermentación <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	40	6.5-7.0	II. Determinación Azúcares Reductores	Antes del proceso y al finalizar	
					IV. Determinación Ácido Láctico	Cada 12 horas	

I. Determinación de carbohidratos totales por espectrofotometría visible (método de fenol-sulfúrico). Cristancho, L., Monroy, R. (2014).

La medición de la concentración de carbohidratos solubles por espectrofotometría se basa en la utilización del método colorimétrico de fenol-sulfúrico (consultar: “**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**”), que depende de la deshidratación de sacáridos derivados de hidrolizados al furfural visibles a 490 nm. Para hexosas (hidroximetil furfural, HMF) y para pentosas (metil furfural).

La reacción que se verifica en la metodología de la **tabla 2.6**, es:



- a) **Preparación de la muestra:** A 1 ml de alícuota de una solución de hidratos de carbono se mezcla con 1 ml de solución acuosa al 5% de fenol en un tubo de ensayo. Posteriormente, se añade 5 ml de ácido sulfúrico concentrado rápidamente a la mezcla. Luego los tubos de ensayo se dejan en reposo durante 10 min, se agitan durante 30 segundos y se colocan durante 20 min en un baño de agua a temperatura ambiente para el desarrollo de color. El blanco y la solución patrón se preparan conforme al procedimiento anteriormente descrito, utilizando el carbohidrato de interés. Finalmente se lleva a una celda donde se deposita en el espectrofotómetro para programar la longitud de onda a 490 nm y se lee la absorbancia.
- b) **Preparación de la curva patrón:** Se procede a determinar las diferentes concentraciones de la glucosa partiendo de 0.01 % que indica 0.1 gramos en 1000 ml de agua. Los datos técnicos pueden consultarse en el “**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**”. Posteriormente se toman alícuotas de 0.1; 0.2; 0.3 y se afora a 1.0 ml con agua destilada. Por último, se añade el fenol y el ácido sulfúrico siguiendo la metodología anterior, para leer en espectrofotómetro.
- c) **Resultados:** Para leer los resultados de la muestra analizados, es necesario graficar absorbancia vs concentración de cada solución estándar preparada. La ecuación de linealidad que arroje la gráfica de la curva patrón se toma como referencia para calcular la concentración del azúcar presente en la muestra. Luego se procede a medir la absorbancia de la muestra de interés y graficar la tendencia del factor de correlación lineal (R^2), la absorbancia de la concentración conocida es la variable independiente. **Ver Tabla 3.2 de la Sección 3.2.1.**

Tabla 2.6: Soluciones estándar para curva carbohidratos totales (Cristancho, L., 2014).

N° de tubos	Patrón glucosa de 0.1 g/L (ml)	Agua (ml)	Fenol 5% (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Concentración glucosa (µg/ml)
Blanco	0.0	1.0	1.0	5.0	0
1	0.1	0.9	1.0	5.0	10
2	0.2	0.8	1.0	5.0	20
3	0.3	0.7	1.0	5.0	30
4	0.4	0.6	1.0	5.0	40
5	0.5	0.5	1.0	5.0	50
6	0.6	0.4	1.0	5.0	60
7	0.7	0.3	1.0	5.0	70
8	0.8	0.2	1.0	5.0	80

II. Determinación de azúcares reductores totales por espectrofotometría visible (método DNS). Cristancho, L., Monroy, R. (2014).

Los azúcares reductores poseen un grupo carbonilo libre formando un grupo hemiacetal que le confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos. El método de Miller o DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) como reactivo tiene la capacidad de oxidar los azúcares reductores mostrando un comportamiento diferencial hacia mono y disacáridos, dando resultados colorimétricos que se puede medir con una longitud de onda de 575 nm, consultar: “**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**”.

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS, para ser el producto mono amino correspondiente. Esta reacción da un producto colorido en solución alcalina (Southgate, D.A.T., 1991).

La reacción que se verifica en la metodología de la **tabla 2.7**, es:

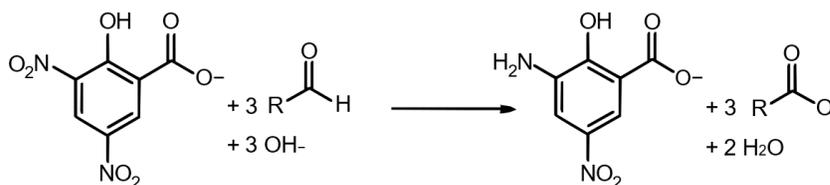


Figura 2.3: Reacción de glucosa con DNS en medio alcalino (Southgate, D.A.T., 1991).

Un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. La reacción es colorimétrica, el ácido 3,5-dinitrosalicílico es de color amarillo, mientras que la aparición de ácido 3-amino, 5-

nitrosalicílico provoca un viraje a pardo oscuro, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de azúcares reductores (Casablanca, E., 2009). Por esta razón, el método no es recomendable para muestras coloreadas.

- a) **Preparación de la muestra:** Se toma 1 ml de la solución acuosa de la muestra que haya sido filtrada con anterioridad, enseguida se adiciona 1ml del reactivo de DNS y se calienta por 15 minutos en baño maría a 100 °C. Se deja enfriar y se diluyen con 10 ml de agua destilada. Se lee absorbancia junto con el blanco a la misma longitud de onda que la curva patrón.
- b) **Preparación del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS):** Se prepara añadiendon 10 g de DNS y 300 g de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle) a 800 ml de NaOH 0.5 N y se calienta suavemente para disolver los reactivos. El volumen se completa hasta 1 L con agua destilada.
- c) **Preparación de la curva patrón:** Se procede a determinar las diferentes concentraciones de la glucosa partiendo de 0.1 % que indica 1.0 gramos en 1000 ml de agua. Los datos técnicos pueden consultarse en “**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**”. Posteriormente se toman alícuotas de 0.1; 0.2; 0.3 y se completa a volumen para 1.0 ml con agua destilada. Se añade a cada tubo 1 ml del reactivo de DNS con agitación constante. Finalmente, se lleva a baño maría a 100 °C durante 15 minutos se deja enfriar y se añade 10 ml agua destilada. Se determina la absorbancia de cada tubo a 575 nm. **Ver Tabla 3.3 de la Sección 3.2.2.**

Tabla 2.7: Soluciones estándar para curva carbohidratos reductores totales (Cristancho, L., 2014)

N° de tubos	Patrón glucosa de 1.0 g/L (ml)	Agua (ml)	DNS (ml)	Agua (ml)	Concentración (µg/ml)
Blanco	0.0	1.0	1.0	10.0	0
1	0.1	0.9	1.0	10.0	100
2	0.2	0.8	1.0	10.0	200
3	0.3	0.7	1.0	10.0	300
4	0.4	0.6	1.0	10.0	400
5	0.5	0.5	1.0	10.0	500
6	0.6	0.4	1.0	10.0	600
7	0.7	0.3	1.0	10.0	700
8	0.8	0.2	1.0	10.0	800

- d) **Resultados:** Mismo procedimiento detallado para la determinación de carbohidratos totales por espectrofotometría visible (método fenol-sulfúrico).

III. Determinación de carbohidratos no reductores por método algebraico.

La cuantificación de los azúcares no reductores se obtiene por diferencia entre los carbohidratos totales y los azúcares reductores totales. **Método indirecto.**

$$ANR = CT - ART$$

Donde: **ANR**: Azúcares no reductores, **CT**: Carbohidratos totales y **ART**: Azúcares reductores totales.

IV. Determinación colorimétrica de ácido láctico utilizando $FeCl_3$ como indicador por espectrofotometría visible. Pacios, A. (2009).

La cuantificación de ácido láctico se puede realizar por diferentes métodos. En el trabajo se utilizará el método colorimétrico: se toman 10 ml de muestra, se adicionan 5 ml de $FeCl_3$ y se lleva a aforo de 50 ml con agua destilada.

Se prepara un blanco con agua para calibrar el equipo y se lee la absorbancia en la muestra a $\lambda=435$ nm. La solución de cloruro férrico se prepara pesando 0.5 g de $FeCl_3$, adicionando 1 ml de HCl 0.1 N y completando a 50 ml con agua destilada, la lectura debe ser inmediata porque este reactivo se descompone rápido con la luz.

Consultar:: "**Anexo 4: Datos técnicos de reactivos utilizados**".

Tabla 2.8: Determinación de ácido láctico por colorimetría (Pacios, A., 2009).

Estándar	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentración (ppm)	0	20	30	40	50	60	70	80	90	100

2.7. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEMANDADOS POR EL *Aspergillus oryzae* Y EL *Lactobacillus delbrueckii*

Los procesos fermentativos dependen de las condiciones a las que se el sustrato del microorganismo (definidas para la investigación en la **tabla 2.9**), como:

- a) **Concentración del azúcar:** Sistema típico, la concentración de la sustancia convertible se reduce gradualmente desde un valor alto hasta un mínimo.
- b) **Control de pH del medio:** El ajuste del pH del sustrato a un valor óptimo inicial antes de la inoculación de los microorganismos es una parte de la preparación del sustrato. El pH inicial óptimo depende de la especie de microorganismo a usar, de la reacción deseada y de las condiciones del proceso (el ajuste del pH se realizará con $CaCO_3$ al 10% y KOH 10 N).
- c) **Control de temperatura:** La temperatura óptima de crecimiento microbiano debe de ser constante durante todo el proceso de fermentación. Para esto se utilizaron incubadoras con temperaturas controladas.
- d) **Contaminación:** Los procesos fermentativos no son exitosos si se posee una contaminación indeseada en del biorreactor, evitándose al trabajar en:
 - i. En áreas con condiciones asépticas, con cámaras de flujo laminar.
 - ii. Todo el material que se utilizará estará estéril vía calor húmedo

- iii. Se tienen microorganismos puros.
- iv. Soluciones, medio de cultivos y sustratos estériles.
- v. Aire estéril (fermentación aeróbica).

e) **Agitación:** Es importante que se mantenga la homogeneidad en todo el biorreactor, para el *Lactobacillus delbrueckii* la agitación fue constante y para el *Aspergillus oryzae* se agitó la mezcla del extracto enzimático.

Tabla 2.9: Consideraciones de parámetros de operación demandados por los microorganismos.

Parámetros de proceso	Tiempo de Control <i>Aspergillus oryzae</i>	Tiempo de Control <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Concentración de azúcares reductores	Al inicio del proceso y cada 12 horas.	Al inicio y al final del proceso.
Temperatura	Temperatura controlada constantemente en incubadora.	
pH	Al inicio del proceso.	Al inicio del proceso y cada 12 horas.
Aireación	La oxigenación del reactor será de forma natural, sin necesidad de equipos de aireación.	Condiciones anaeróbicas todo el tiempo de fermentación.
Contaminación	Siempre se trabajará en ambiente controlados (cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2) y equipos, reactivos estériles.	
Agitación	Se realizará cuando se adicione el extracto enzimático sobre la cáscara de plátano por 30 min a 120 rpm.	Agitación constante a 120 rpm.
Concentración de ácido láctico	No aplica.	Al inicio del proceso y cada 12 horas.

2.7.1 DESCRIPCIÓN DE EQUIPO UTILIZADO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

I. **Biorreactor discontinuo por lotes.** Se utilizaron tres tipos de reactores variando volumen y sus especificaciones:

a) **Biorreactor de borosilicato 500 ml:** 8 cm de diámetro de la base, tres boquillas con diferente altura y diámetros: las laterales poseen una altura de 14 cm con diámetro interno de 2 cm y la central de 15 cm con diámetro interno de 1.5 cm. Cada boquilla posee una tapadera con acoplamiento diferente: una lateral sin orificio de salida con tapadera de rosca, la central con orificio en el que se acopla una válvula de borosilicato de 2.5 mm y una lateral con orificio en el que se acopla una varilla de vidrio en forma de L invertida de 18 cm en lado largo y 7 cm en lado corto con un diámetro interno de 0.7 cm. Este biorreactor se utilizó en la etapa de fermentación láctica en ambos sistemas de hidrólisis.

- b) **Biorreactor Erlenmeyer Kimax de 250 ml:** 7.9 cm de diámetro de la base, 3.3 cm diámetro de la boquilla, altura total de 13 cm y altura del cono 9.5 cm. Este biorreactor se utilizó para la hidrólisis enzimática.
- c) **Frasco de borosilicato Pyrex de 500 ml con tapón de rosca de propileno y anillo de vertido resistente a autoclave:** 8.9 cm de diámetro de la base, 4.5 cm de diámetro de la boquilla y 17.6 cm de altura. Este biorreactor se utilizó tanto para hidrólisis ácida como enzimática.

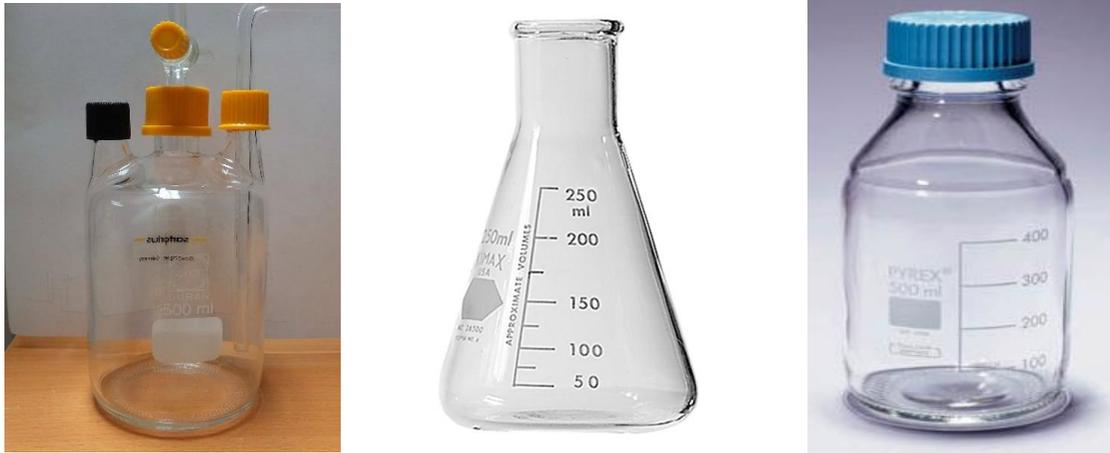


Figura 2.4: Biorreactores de borosilicato utilizados en la investigación.

- II. **Cámara ambientadora de anaerobiosis.** Acoplamiento de sistema que produzca CO_2 (a partir de la reacción de $\text{HCl } 2 \text{ N}$ con NaHCO_3) seguida por una trampa de agua, unidas por mangueras de 0.5 cm de diámetro, se utilizará además una bomba de presión de vacío Gast, modelo DOA-P104-AA, para asegurar la ambientación anaeróbica del biorreactor en el proceso de fermentación láctica durante los muestreos del avance de la reacción.



Figura 2.5: Cámara de anaerobiosis, trampa de agua y biorreactor de fermentación láctica.

2.8. METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO A NIVEL INDUSTRIAL

Según Komesu, A. (2017), los procesos de separación son esenciales para la industria química y otras industrias relacionadas. Aproximadamente entre el 40% y el 70% de los costos operativos y capital son asociados con etapas de separación.

En los procesos de producción de ácido láctico, el desarrollo de un método eficaz de separación y purificación del ácido a partir del caldo de fermentación es en extremo importante para la viabilidad económica. Aunque la diferencia entre el punto de ebullición del ácido láctico y el agua es relativamente grande, es casi imposible obtener ácido láctico puro cristalino. Esto se debe a que el ácido láctico tiene una alta afinidad por el agua y un dímero de lactato se forma cuando las concentraciones de ácido láctico son suficientemente altas.

El proceso de elaboración del ácido láctico de una manera clásica implica una serie de tratamientos como precipitación, filtración convencional, acidificación, adsorción de carbono, evaporación, cristalización y otros. El número de etapas de tratamiento influye fuertemente en la calidad y el precio del producto.

Hay una limitada información de fuentes públicas sobre los procesos de recuperación de productos industriales, sin embargo; las etapas de separación se discuten ampliamente en la literatura como la precipitación, extracción de solvente, procesos de separación por membrana, entre otros. Los procesos de separación por membrana incluyen osmosis inversa, electrodiálisis y ultrafiltración.

Eficiencias de rendimientos y purezas de ácido láctico pueden obtenerse a partir de estas tecnologías de purificación, y se han desarrollado varios avances, pero aún muchos inconvenientes son reportados. En el proceso de precipitación, estos inconvenientes incluyen el alto costo de los reactivos, la necesidad de filtrar y otros procesos de separación cuando un producto de alta pureza es requerido.

Desde el punto de vista ambiental, la generación de grandes cantidades de aguas residuales es un inconveniente importante. Además, para producir una tonelada de ácido láctico es requerida una tonelada de sulfato de calcio de bajo costo, lo que se traduce problemas graves para el tratamiento de residuos.

En la extracción con disolvente, una amplia área de intercambio es necesaria para una separación eficiente, lo que requiere equipo costoso. Su aplicación *in situ* en la fermentación extractiva está limitada por la recuperación del disolvente realizada en etapas de separación y la alta toxicidad del extracto para los microorganismos. Los procesos de separación por membrana son tecnologías

prometedoras, pero el alto costo de las mismas, los problemas de polarización e incrustaciones limitan el uso de procesos de electrodiálisis a gran escala.

En los últimos años, se han completado muchos estudios que han intentado resolver los problemas del proceso tradicional de separación mediante el uso de técnicas de destilación no tradicionales, tales como la destilación reactiva y destilación molecular. Otro enfoque que vale la pena es la fermentación de lactatos orgánicos como lactatos de amino (dilactato de piperazinio, dilactato de hexametildiamina y lactato de imidazol) para fabricar ácido láctico de alta pureza.

Además, se requieren nuevos estudios sobre los procesos de recuperación de ácido láctico para desarrollar un proceso más eficiente y económicamente atractivo para aplicaciones industriales.

2.9. METODOLOGÍA DE CÁLCULO DE RENDIMIENTOS DE MÉTODOS DE PRODUCCIÓN PROPUESTOS EN EL BIORREACTOR

El rendimiento de los procesos metabólicos de los microorganismos dentro del biorreactor se definió por la tasa de conversión de cada una de las etapas asociadas al procedimiento detalladas previamente y exponiendo el procedimiento de realización en el próximo capítulo:

- a) Convertir almidón a azúcares reductores (hidrólisis química o enzimática por acción microbiana).
- b) Conversión de azúcares reductores, producidos a partir de la hidrólisis química o enzimática por acción microbiana, a ácido láctico posterior a la hidrólisis química de lactato de calcio producido en la fermentación.
- c) Conversión de cáscara de plátano verde a ácido láctico.

$$Rendimiento = \frac{m_{\text{producto obtenido}}}{m_{\text{reactivo alimentado}}}$$

La cantidad de producto obtenido en cada etapa del proceso productivo del ácido láctico se encuentra mediante la realización de las pruebas de determinación de la conversión mencionadas anteriormente, con el proceso específico para ello.

La simplicidad de la ecuación para el cálculo del rendimiento de la reacción metabólica de los microorganismos es debido a la aplicación generalizada del concepto de conversión química.

CAPÍTULO III.
ETAPA EXPERIMENTAL:
OBTENCIÓN DE ÁCIDO
LÁCTICO.

En el presente capítulo se detallarán los procedimientos empleados y los resultados obtenidos derivados de la ejecución de la etapa experimental de la investigación, basados en las metodologías detalladas en el capítulo anterior. Se detallan las variables experimentales a estudiar y las establecidas previamente para realizar la investigación, en cada sistema de biotransformación propuesto: hidrólisis ácida con fermentación láctica e hidrólisis enzimática con fermentación láctica.

3.1. DETERMINACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

En un experimento el investigador provoca una situación para introducir determinadas variables fijas manipuladas por él, para controlar el aumento o disminución de esa variable, y su efecto en las conductas observadas. El investigador maneja deliberadamente la variable experimental y luego observa lo que sucede en situaciones controladas. Se debe considerar los parámetros de operación de los microorganismos, **ver Tabla 2.9 de la Sección 2.7.**

Tabla 3.1: Variables fijas y de estudio en la investigación.

Proceso	Variables fijas	Variables de estudio
Hidrólisis ácida	Cantidad de cáscara molida (90.79 g/ 1L de licor). Temperatura (121 °C). Concentración del ácido (H ₂ SO ₄ , 5% p/v). Presión (15 psi). Sin agitación.	Tiempo de hidrólisis.
Hidrólisis con <i>Aspergillus oryzae</i>	Cantidad de cáscara molida (215.56 g/ 0.8 L de licor). Temperatura de crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> (32 °C). Temperatura de trabajo: α-amilasa (37 °C), β amilasa (67 °C). Concentración del inóculo (10% p/v). Agitación del extracto enzimático por 30 min (120 rpm). pH (5.5) Humedad 70%	Producción de azúcares reductores.
Fermentación con <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Cantidad de azúcares reductores (32 g/L). Temperatura (40 °C). Concentración del inóculo (2% v/v). Agitación constante (agitador magnético, 120 rpm). pH (7)	Tiempo de fermentación. Producción de ácido láctico.

3.2. CONSTRUCCIÓN DE CURVAS PATRONES PARA LECTURA DE LOS RESULTADOS DE LA ETAPA EXPERIMENTAL

Se aplicarán las metodologías de análisis para determinar carbohidratos totales (método de fenol-sulfúrico), para determinar azúcares reductores totales (método DNS) y para determinar ácido láctico (método de cloruro férrico), en ellas se explica también como se obtiene la curva patrón para cada metodología.

Con los datos originados a partir de las aplicaciones de las diferentes metodologías y empleando Excel, se presentan a continuación las curvas patrones obtenidas con los correspondientes análisis estadísticos para validarlas.

3.2.1. CURVA PATRÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

La **tabla 3.2** muestra los resultados de emplear el método fenol-sulfúrico descrito en la **sección 2.6 (Diagrama de procedimiento: Anexo 1, Figura A.1)**:

Tabla 3.2: Mediciones para curva patrón carbohidratos totales.

N° de tubo	Patrón almidón 0.1 g/L (ml)	Agua (ml)	Fenol 5% (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Concentración (ppm) ó (µg/ml)	Absorbancia
Blanco	0	1	0.5	2.5	0	0.000
1	0.1	0.9	0.5	2.5	10	0.075
2	0.2	0.8	0.5	2.5	20	0.157
3	0.3	0.7	0.5	2.5	30	0.232
4	0.4	0.6	0.5	2.5	40	0.295
5	0.5	0.5	0.5	2.5	50	0.376
6	0.6	0.4	0.5	2.5	60	0.461
7	0.7	0.3	0.5	2.5	70	0.522
8	0.8	0.2	0.5	2.5	80	0.613

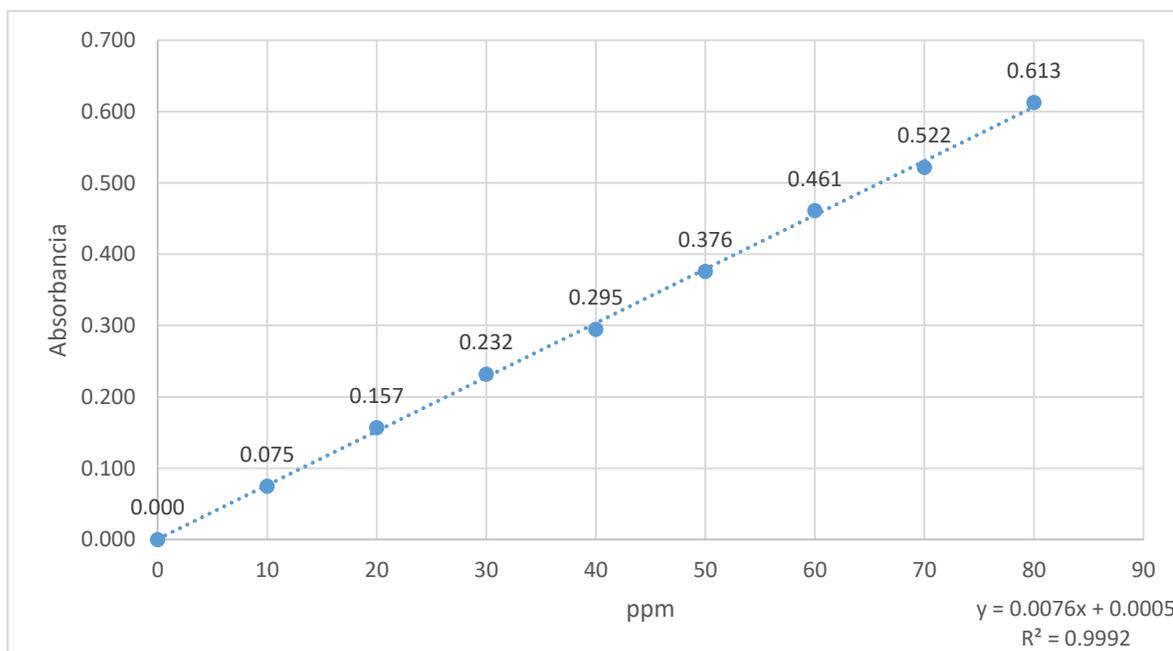


Figura 3.1: Curva patrón carbohidratos totales, ppm vs absorbancia.

La validación estadística de la curva patrón de carbohidratos totales por espectrofotometría visible por el método fenol-sulfúrico, puede consultarse en **“Anexo 2: Validaciones estadísticas de curvas patrón de la investigación”**; presentados en la primera sección.

3.2.2. CURVA PATRÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES

La **tabla 3.3** muestra los resultados de emplear el método DNS descrito en la **sección 2.6 (Diagrama de procedimiento: Anexo 1, Figura A.2)**:

Tabla 3.3: Mediciones para curva patrón carbohidratos reductores totales.

N° de tubo	Patrón almidón 1.0 g/L (ml)	Agua (ml)	DNS (ml)	Agua (ml)	Concentración (ppm) ó (µg/ml)	Absorbancia
Blanco	0	1	1	10	0	0.000
1	0.1	0.9	1	10	100	0.061
2	0.2	0.8	1	10	200	0.158
3	0.3	0.7	1	10	300	0.232
4	0.4	0.6	1	10	400	0.310
5	0.5	0.5	1	10	500	0.402
6	0.6	0.4	1	10	600	0.492
7	0.7	0.3	1	10	700	0.576
8	0.8	0.2	1	10	800	0.670

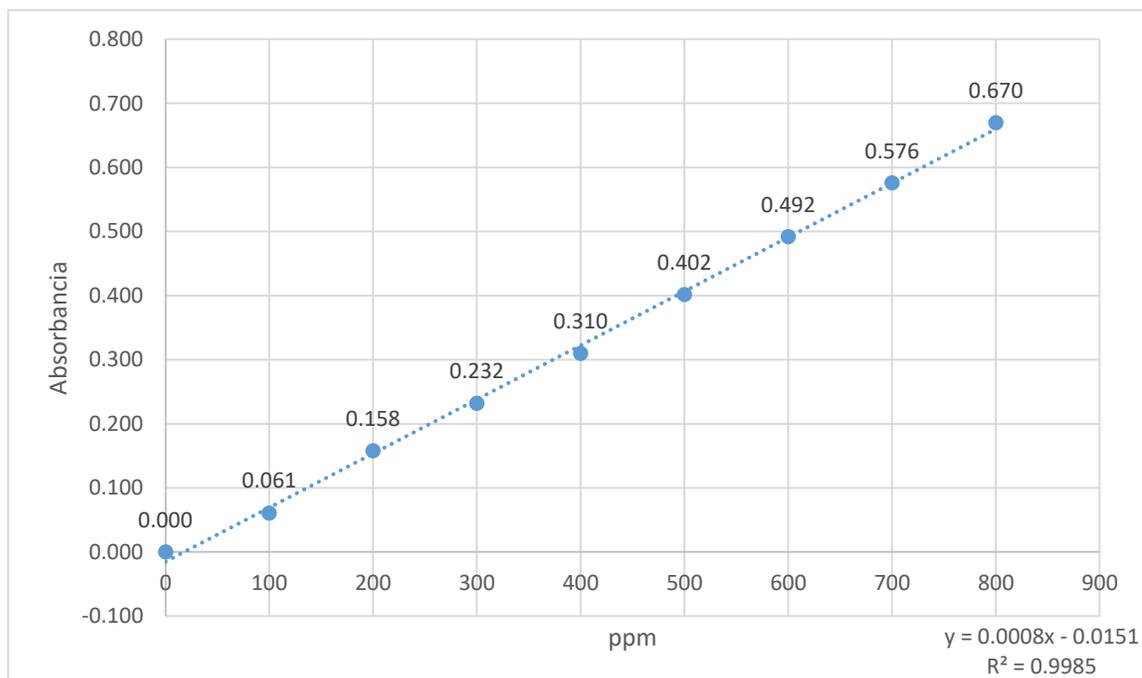


Figura 3.2: Curva patrón carbohidratos reductores, ppm vs absorbancia.

La validación estadística de la curva patrón de carbohidratos reductores totales por espectrofotometría visible por el método DNS, puede consultarse en “**Anexo 2: Validaciones estadísticas de curvas patrón de la investigación**”; presentados en la segunda sección.

3.2.3. CURVA PATRÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

La **tabla 3.4** muestra los resultados de emplear el método cloruro férrico descrito en la **sección 2.6 (Diagrama de procedimiento: Anexo 1, Figura A.3)**:

Tabla 3.4: Mediciones para curva patrón de ácido láctico.

N° de tubos	Patrón ácido láctico 1 g/L (ml)	Solución FeCl ₃ (ml)	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Promedio absorbancia
Blanco	0	5	0	0.000	0.000
1A	0.5	5	10	0.026	0.026
1B	0.5	5	10	0.022	
1C	0.5	5	10	0.029	
2A	1.0	5	20	0.058	0.053
2B	1.0	5	20	0.051	
2C	1.0	5	20	0.051	
3A	1.5	5	30	0.074	0.078
3B	1.5	5	30	0.078	
3C	1.5	5	30	0.083	
4A	2.0	5	40	0.106	0.106
4B	2.0	5	40	0.106	
4C	2.0	5	40	0.106	
5A	2.5	5	50	0.129	0.126
5B	2.5	5	50	0.125	
5C	2.5	5	50	0.125	
6A	3.0	5	60	0.152	0.154
6B	3.0	5	60	0.154	
6C	3.0	5	60	0.155	
7A	3.5	5	70	0.179	0.178
7B	3.5	5	70	0.18	
7C	3.5	5	70	0.176	
8A	4.0	5	80	0.202	0.203
8B	4.0	5	80	0.203	
8C	4.0	5	80	0.204	
9A	4.5	5	90	0.229	0.227
9B	4.5	5	90	0.229	
9C	4.5	5	90	0.223	
10A	5.0	5	100	0.253	0.251
10B	5.0	5	100	0.251	
10C	5.0	5	100	0.248	

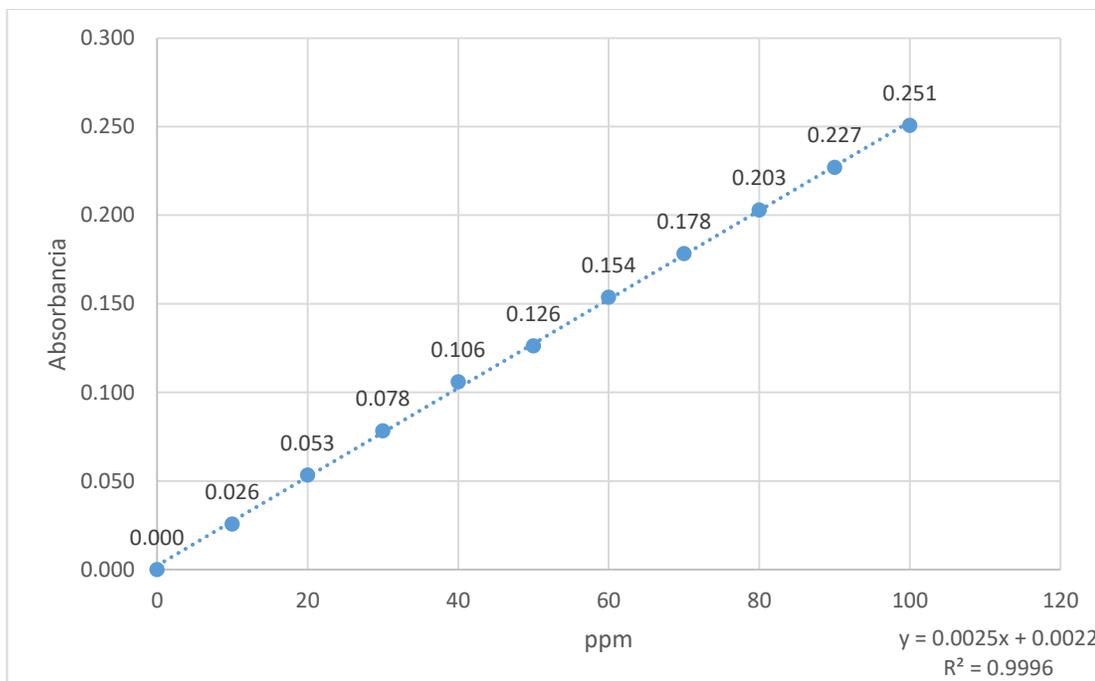


Figura 3.3: Curva patrón ácido láctico, ppm vs absorbancia.

La validación estadística de la curva patrón de ácido láctico por lecturas de espectrofotometría visible por el método FeCl_3 , puede consultarse en “**Anexo 2: Validaciones estadísticas de curvas patrón de la investigación**”; presentados en la tercera sección.

3.3. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE CÁSCARA DEL PLÁTANO

La finalidad de una toma de muestra es obtener una parte representativa del producto, para luego someterlo a un determinado ensayo (químico y microbiológico) y conseguir resultados fiables sobre su estado, es necesario que el producto en el momento del análisis, reúna las mismas condiciones químicas y microbiológicas que tenga al ser muestreado.

Para definir el procedimiento de recolección de la cáscara del plátano a utilizarse como materia prima de las pruebas de obtención de ácido láctico se tomó en cuenta los criterios de los manuales de buenas prácticas definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) para recolección de muestras sólidas.

Materiales

- Bolsas estériles.
- Mascarillas.
- Redecilla para cabello.
- Gabacha.
- Guantes estériles.

Procedimiento: Recolección de la cáscara de plátano (Anexo 1, Figura A.4)

- I. Identificar una muestra representativa del proceso productivo de la empresa de la cual se extraerá la cáscara.
- II. Recolectar inocuamente la muestra en bolsas estériles con el equipo de recolección personal adecuado.
- III. Rotular la muestra recolectada con los datos: fecha, hora y condición.
- IV. Transportar la muestra al Laboratorio Central Max Bloch, Ministerio de Salud de El Salvador; instalación donde serán tratadas.

3.4. TRATAMIENTO PREVIO A RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La empresa seleccionada y en la disposición para realizar el muestreo del residuo agroindustrial derivado de la elaboración de frituras de plátano es la planta industrial ubicada en la Carretera Panamericana, Santa Tecla, La Libertad.

La empresa se dedica a la importación, representación y co-distribución de marcas en el mercado, con cobertura nacional de canales de distribución modernos (supermercados y almacenes) y tradicionales (mayoreo y detalle). El tratamiento al plátano verde posterior a la recepción en planta industrial consiste en: desinfección, baño de oxidación (en caliente con agua y cal, este proceso afecta en la disminución de la cantidad de azúcares totales en la cáscara), pelado manual y clasificación.

La cantidad de plátano procesada semanalmente por la empresa es suficiente para desarrollar un procedimiento de recolección de la cáscara de plátano para el aprovechamiento de la misma como desecho agroindustrial para la transformación biotecnológica que la empresa seleccionada estimó conveniente.

3.5. RECOLECCIÓN DE LA CÁSCARA DEL PLÁTANO

Bitácora de recolección de muestra de cáscara de plátano:

- a) Fecha y hora de recolección:** 16/08/2017, 8:00 a.m.
- b) Lugar recolección:** Km. 9¹/₂ Carretera Panamericana, La Libertad..
- c) Peso de la muestra:** 25.63 kg.
- d) Material utilizado para la recolección:** Gabacha, mascarilla, guantes, bolsas de polietileno, redcilla de pelo, todos los materiales estériles.
- e) Lugar de recepción:** Unidad de aseguramiento de calidad, área de microbiología de medicamentos del Ministerio de Salud de El Salvador.
- f) Hora de recepción:** 9:30 a.m.
- g) Hora de inicio del procesamiento:** 10:00 a.m. (remoción de puntas y tallos del fruto, luego secado en la estufa).

3.6. PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

El objetivo es garantizar las características físicas necesarias a la cáscara de plátano para hacer posible los procedimientos de hidrólisis del almidón por la vía química (ácido sulfúrico) y enzimática por acción microbiana (*Aspergillus oryzae*), con el fin de obtener el máximo rendimiento en la obtención de glucosa.

Materiales

- Termómetro.
- Espátula.
- Cinta adhesiva indicadora de esterilización.
- Papel crepe para autoclave.
- Jarra de vidrio con tapadera de 1000 ml.
- Vaso de precipitado de 500 ml.
- Bandejas perforadas de acero inoxidable.

Equipos

- Tamizador con Mesh No. 140.
- Licuadora, Laboratory Blender Waring Commercial, modelo 31BL91 (7010).
- Horno Fisher Scientific, modelo 255G, serie 200.
- Autoclave Tuttnauer, modelo 3870EL-D.

Procedimiento: Tratamiento preliminar de la cáscara (Anexo 1, Figura A.5)

- I. Colocar la cáscara de plátano recolectada en el procedimiento 3.3 sobre las bandejas de acero inoxidable perforadas, esparcidas uniformemente.
- II. Secar las bandejas en el horno a una temperatura de 65 °C 24 horas.
- III. Enfriar a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) por 2 horas.
- IV. Moler las cáscaras en licuadora por 2 minutos.
- V. Tamizar la cáscara con Mesh No. 140, recoger el cernido del proceso de tamizado y reprocesar lo retenido a la etapa 5 del presente procedimiento.
- VI. Recolectar todo el cernido del tamizado en la jarra de vidrio y reservar.
- VII. Colocar la cáscara que se llevará al proceso de producción de ácido láctico en vaso de precipitado, luego tapar con papel crepe y cerrarlo con el cordel, colocando sobre el papel crepe la cinta testigo de esterilización.
- VIII. Esterilizar la cáscara en la autoclave a 121 °C y 15 psi por 15 minutos, dejar enfriar y guardar para ser utilizada en la producción de ácido láctico.
- IX. Caracterizar la cáscara tomando una muestra esterilizada, cuantificando azúcares reductores, totales y no reductores (por diferencia algebraica) en la cáscara de plátano (**sección 2.6:** método DNS, fenol-sulfúrico).

3.7. PORCENTAJE DE HUMEDAD EN LA CÁSCARA DE PLÁTANO PARA USO INDUSTRIAL Y LA COMERCIALIZADA A NIVEL MINORISTA

Se trabajó a una temperatura en la estufa de 65 °C, por 24 horas y con dos tipos de muestras por triplicado: cáscara de plátano de la empresa muestreada y cáscara de plátano del Mercado Central (ver **sección 3.8**); los valores obtenidos de peso de las muestras de cáscara de plátano de ambos lugares de abastecimiento se presentan en la **tabla 3.5**. El método utilizado se describe en la **sección 2.1**.

Tabla 3.5: Masas de muestras de cáscara de plátano para obtención de % humedad.

Muestra / Masa	M1 (g)	M2 (g)	M3 (g)
Cáscara MC1	104.13	198.02	116.532
Cáscara MC2	104.13	177.583	113.567
Cáscara MC3	104.13	185.460	115.158
Cáscara ES1	104.13	221.190	117.609
Cáscara ES2	104.13	215.192	116.215
Cáscara ES3	104.13	198.562	115.211

Dónde: **MC**: Mercado Central, **ES**: Empresa Seleccionada, **M1**: masa beaker, **M2**: masa beaker + muestra, y **M3**: masa beaker+ muestra desecada.

Utilizando la ecuación de **sección 2.1**, se procede a encontrar el porcentaje de humedad contenida en las cáscaras de plátano: $\%H = \frac{M2-M3}{M2-M1} * 100$

Tabla 3.6: Porcentaje de humedad en muestras de cáscara de plátano.

Muestra	% Humedad	% Humedad promedio
Cáscara MC1	86.791	86.794
Cáscara MC2	87.152	
Cáscara MC3	86.440	
Cáscara ES1	88.485	88.623
Cáscara ES2	89.119	
Cáscara ES3	88.266	

3.8. COMPARACIÓN DE PORCENTAJE DE HUMEDAD, CARBOHIDRATOS TOTALES Y REDUCTORES EN MUESTRAS DE CÁSCARA DE PLÁTANO

El proceso industrial ocupado por el la empresa (tratamiento con agua caliente y cal) para remover la cáscara de plátano, ocasiona la pérdida de cierta cantidad de carbohidratos en ella, es por esto que se tuvo la necesidad de verificar el porcentaje real de carbohidratos totales y reductores de la cáscara de plátano obtenida de la planta de alimentos de la empresa, al mismo tiempo se realizaron lecturas de carbohidratos totales y reductores a cáscara de plátano del Mercado Central por ese proceso industrial para corroborar los valores de la **tabla 1.4**.

Siguiendo los procedimientos de la **sección 2.6** por espectrofotometría visible utilizando el método fenol-sulfúrico para carbohidratos totales, método DNS para carbohidratos reductores totales y método de azúcares no reductores por diferencia, para la cáscara de plátano de la empresa y Mercado Central, se tiene:

Tabla 3.7: Resultados de las muestras de cáscaras de plátano verde.

Muestra	% Humedad	% Carbohidratos totales (base seca)	% Azúcares reductores (base seca)	% Azúcares no reductores (base seca)
Mercado Central	86.794	45.7	5.01	40.69
Empresa Seleccionada	88.623	36	0.0	36

Existe una diferencia en los porcentajes de carbohidratos totales (9.7% base seca, diluida por el baño térmico con cal), carbohidratos reductores totales (5.01% base seca, diluida por el baño térmico con cal) y carbohidratos no reductores (4.69% base seca) en las muestras de cáscara de plátano, atribuida a la dilución de los mismos por el baño. Pese a esta diferencia se trabajó con la muestra de la empresa por ser un residuo agroindustrial que no compromete la seguridad alimentaria.

3.9. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR HIDRÓLISIS QUÍMICA Y FERMENTACIÓN LÁCTICA (*Lactobacillus delbrueckii*)

Descripción de los procedimientos empleados para la producción de ácido láctico a partir del sistema de biotransformación propuesto por hidrólisis química y fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii*.

3.9.1. PREPARACIÓN Y CÁLCULO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE HIDRÓLISIS QUÍMICA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

El objetivo de esta etapa fue hidrolizar los almidones de la cáscara de plátano hasta llegar a azúcares reductores ocupando para esto ácido sulfúrico, temperatura y presión. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, se hizo por triplicado.

Reactivos

- Cáscara de plátano (**sección 3.6 romano IX**).
- KOH 10 N.
- Ácido sulfúrico 5% p/v.

Materiales

- Espátula, embudo y agitador
- Filtros de jeringa con membrana celulosa 0.45µm.
- Jeringa de 20 ml.
- Beaker de 50 ml.
- Balón de 1L y 100 ml.

Equipo

- Autoclave Tuttnauer, modelo 3870EL-D.
- Balanza semianalítica A&D Weighing, modelo GF-600.
- Frasco de borosilicato Pyrex de 500 ml con tapón de rosca autoclaveable.
- pHmetro Fisher Scientific accumet basic AB15 Plus.
- Pipeta monocal, Thermo electron Finnpiquette 100-1000 μ L, modelo 4500.
- Pipeta electrónica, Thermo Scientific Finnpiquette Novus 1-10 ml 4620080.

Procedimiento: Construcción curva hidrólisis química (Anexo 1, Figura A.6)

- I. Pesar en balanza semianalítica y colocar la cáscara de plátano (**ver sección 3.6 romano IX**) en un frasco de 500 ml con tapón de rosca.
- II. Agregar ácido sulfúrico al 5% p/v a la cáscara plátano en relación de 2:1.
- III. Llevar el frasco que contiene la cáscara plátano con ácido sulfúrico al autoclave a condiciones de 121 °C y 15 psi.
- IV. Realizar corridas en el autoclave a intervalos de 5 minutos (0, 5, 10, 15 y 20 minutos), enfriar a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) y llevar entre 5 y 6 el pH con KOH 10 N, lecturas de manera continua con el pHmetro.
Nota: los intervalos de la hidrólisis se deben a la programación del equipo.
- V. Colocar la cáscara hidrolizada en un balón de 1 L y aforar.
- VI. Tomar una alícuota del romano V y trasladarla a un balón de 100 ml para su aforo. Esta dilución debe permitir cuantificar azúcares reductores dentro de los límites que tiene las curvas creadas a partir de las metodologías fenol-sulfúrico (**Anexo 1, Figura A.1**) y DNS (**Anexo 1, Figura A.2**).
- VII. Tomar una alícuota de 25 ml del paso 6, colocarlo en un beaker de 50 ml y agregar 0.25 g carbón activado, agitar y utilizar filtros de jeringa con membrana de celulosa de 0.45 μ m para filtrar.
- VIII. Realizar prueba del DNS (**ver sección 2.6**) a cada muestra del romano VII.
- IX. Realizar la curva de producción de carbohidratos reductores para la hidrólisis química (tiempo vs concentración de carbohidratos reductores).

3.9.2. VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA

El objetivo es llevar un control sobre los parámetros de operación que aseguren el buen desarrollo de la etapa de hidrólisis ácida de la cáscara de plátano.

Procedimiento: Verificación y cumplimiento de parámetros de operación

- I. Monitorear que la temperatura sea de 121 °C, la presión de 15 psi y que el tiempo establecido se cumpla dentro del autoclave.

3.9.3. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA

Para verificar que los valores obtenidos en cada etapa (las dos hidrólisis y las dos fermentaciones lácticas), estas se realizaron por triplicado, es decir se trabajaron tres reactores para cada una de ellas (todos ellos con los mismos parámetros de operación), y también se trabajaron tres muestras por cada reactor.

Siguiendo los procedimientos descritos en la **sección 3.9.1** y **sección 3.9.2**, los valores de tiempo (en minutos, variable independiente), absorbancia leída (para cada tiempo) y concentración de azúcares reductores (ppm, variable dependiente); puede consultarse el “**Anexo 3: Resultados de etapa experimental, Tabla A.4**”.

La relación de trabajo que se pide en la **sección 3.9.1** para volumen de ácido sulfúrico 5% p/v contra cantidad de cáscara molida de plátano verde es de 2:1, por lo que se trabajó con 41 ml de H₂SO₄ y 20.485 g de cáscara de plátano en un frasco de 500 ml autoclaveable (estos valores se escogieron para que la muestrea fuera representativa), se llevó el frasco al autoclave (121 °C, 15 psi) por cinco minutos, al finalizar este tiempo se sacó el frasco del autoclave, se enfrió a temperatura ambiente, se llevó entre 5 y 6 de pH con KOH 10N, se trasladó cuantitativamente a un balón de 1 L, se tomó una alícuota de 6.78 ml (esta alícuota se escogió pensando en crear un solución de azúcares reductores de 500 ppm, que es un valor intermedio en la **figura 3.2**, ver más adelante el cálculo) y se aforó en un balón de 100 ml, de esta última dilución se extrajo 25 ml en un beaker, se le agregó 0.25 g de carbón activado y con ayuda una jeringa y membrana de 0.45 µm se filtró una muestra para trabajar el método DNS para la lectura de absorbancia en este tiempo, este mismo procedimiento efectuó para los tiempos de 10, 15, 20 minutos.

Para calcular la alícuota de 6.78 ml se procedió así: se escogió como parámetro para ver el progreso de la hidrólisis ácida una concentración de 500 ppm de azúcares reductores totales, que es un punto en la figura 3.2 que no se encuentra en los extremos, luego a partir de los 20.485 g de cáscara pesados y del porcentaje de azúcares no reductores encontrados en las cáscara de plátano (36%) se supo la cantidad de estos azúcares para ser transformados a reductores:

$$\text{Azúcares no reductores} = 20.485 (0.36) = 7.3746 \text{ g}$$

Estos gramos, luego de pasar por el autoclave, fueron llevados a un aforo de 1 L (concentración de 7.3746 g/L ó 7,374.6 ppm), de esta nueva solución, se debía tomar una alícuota que se llevaría a un aforo de 100 ml (respetando los 500 ppm finales que se deseaban) para que el espectrofotómetro pudiera realizar la lectura:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2; V_1 = \frac{500 \text{ ppm} * 100 \text{ ml}}{7374.6 \text{ ppm}} = 6.78 \text{ ml}$$

Para encontrar la concentración a partir de la absorbancia leída con el espectrofotómetro Hach, modelo DR 3900, se utilizó la regresión creada por Excel para la curva patrón azúcares reductores totales vs absorbancia (**Figura 3.2**).

$$\text{Absorbancia} = 0.0008 * (\text{concentración, ppm}) - 0.0151$$

Se graficó el tiempo t de reacción (minutos) contra la concentración C de azúcares reductores totales (ppm), la ecuación de regresión obtenida es:

$$C = -0.139907t^3 + 3.1244t^2 + 10.2249t + 105.387 ; R^2 = 0.988308$$

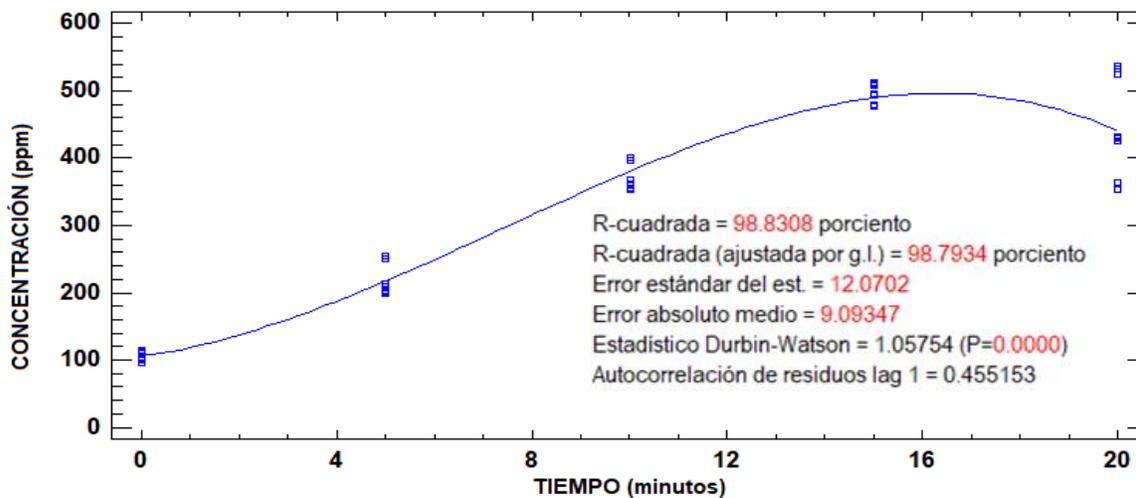


Figura 3.4: Gráfica tiempo (minutos) vs concentración de azúcares reductores (ppm) producidos por hidrólisis con H₂SO₄ 5% p/v.

Tabla 3.8: Análisis de varianza (ANOVA) de hidrólisis con H₂SO₄ 5% p/v.

<i>Estimado</i>	<i>Error Estándar</i>	<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>	
10.7322	70.5721	0.152074	0.8793	
65.4061	12.2425	5.34252	0.0000	
-2.99756	0.744265	-4.02754	0.0001	
0.0658531	0.204579	3.21895	0.0016	
-0.000747329	0.000259631	-2.87843	0.0046	
0.00000338603	0.00000123494	2.74186	0.0068	
Análisis de Varianza				
<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
1.92117E6	5	384234	2637.35	0.0000
22727.6	156	145.69		
1.9439E6	161			

Puesto que el valor-P en la **tabla 3.8** es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Concentración y Tiempo con un nivel de confianza del 95%. Al comprobar la existencia de una relación estadísticamente

significativa entre concentración y tiempo con todos los datos obtenidos de la hidrólisis química de la cáscara de plátano verde, se procedió a la producción de un licor rico en azúcares fermentables para aprovecharse en la fermentación láctica.

A partir de la ecuación generada por el programa Statgraphics Centurion (2010), se puede llegar a conocer el momento donde la cantidad de azúcares reductores totales alcanza un máximo, siendo la primera derivada de esa función:

$$C' = -0.419721t^2 + 6.2488t + 10.2249$$

Igualando la primera derivada a cero, se obtienen los máximos y mínimos de la regresión para la hidrólisis química de la cáscara de plátano verde.

$$t_1 = -1.4876 \text{ m} \quad \text{ó} \quad t_2 = 16.3756 \text{ m}$$

Se descarta el primer valor (t_1) ya que es negativo, por lo que a los 16 minutos la producción de azúcares reductores por hidrólisis con ácido sulfúrico está en su punto más alto de concentración. Lastimosamente el autoclave utilizado (Tuttnauer, modelo 3870EL-D) está programado y calibrado para trabajar con intervalos de tiempo de 5 minutos (0, 5, 10, 15 y 20 minutos), siendo entonces el minuto 15 el escogido para producir el licor rico en azúcares reductores. La concentración de azúcares reductores para el minuto 15 sería entonces:

$$C_{15 \text{ m}} = 489.544375 \text{ ppm}$$

Para preparar un litro de solución de azúcares reductores con concentración de 32 g/L a partir de cáscara de plátano verde molida y ácido sulfúrico 5% p/v:

$$\text{Rendimiento} = \frac{489.54 \text{ ppm}}{500 \text{ ppm}} * 100 = 97.908\%$$

$$g \text{ de cáscara} = \frac{32 \text{ g}}{0.36} / 0.97908 = 90.7882 \text{ g}$$

$$ml \text{ de } H_2SO_4 = 90.7882 \text{ g} * 2 = 181.6 \text{ ml}$$

Se pesó 90.7882 g de cáscara de plátano verde a los que se les adicionó 181.6 ml de ácido sulfúrico 5% p/v, llevándose a un frasco de vidrio autoclaveable, por 15 minutos, 121 °C, 15 psi al autoclave Tuttnauer, modelo 3870EL-D, finalizados los 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó con KOH 10 N (entre 5 y 6), se llevó a aforo de un litro en balón de 1 L.

Para lecturas de absorbancia de hidrólisis química, tres alícuotas de 2.5 ml se aforaron a 200 ml para posterior cuantificación de azúcares reductores con metodología DNS; los datos se reportan en la **tabla 3.9**:

Tabla 3.9: Resultados de hidrólisis de cáscara de plátano con H₂SO₄ 5% p/v.

	Absorbancia	Concentración (ppm)	Concentración (g/L)
Muestra 1	0.305	399.50	31.96
Muestra 2	0.307	402.00	32.16
Muestra 3	0.308	403.88	32.31
Promedio			32.14

La concentración final del licor creado al hidrolizar la cáscara de plátano verde con H₂SO₄ 5% p/v es 32.14 g/L, este se enriqueció según la **sección 3.9.5** para que el *Lactobacillus delbrueckii* posea los nutrientes necesarios para crecer.

3.9.4. ETAPA FINAL DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA DEL ALMIDÓN Y PREVIO TRATAMIENTO DEL SUSTRATO PARA LA ETAPA FERMENTATIVA

El objetivo es producir un licor con la mayor cantidad de azúcares fermentables a partir de los resultados donde se obtiene mayor rendimiento del procedimiento de la **sección 3.9.1**, y para preparar las condiciones de nutrientes necesarias para la etapa de fermentación láctica. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, se llevará por triplicado este experimento.

Reactivos

- Cáscara de plátano (**sección 3.6 romano IX**).
- KOH 10 N.
- Ácido sulfúrico 5% p/v.

Materiales

- Sostenedor de filtro con membrana de 105 mm.
- Espátula.
- Embudo y kitasato.
- Jeringa de 20 ml.
- Beaker de 50 ml.
- Filtros de celulosa de 0.45 µm.
- Agitador de vidrio y magnético.
- Balón de 1 L.
- Balón de 100 ml.

Equipo

- Bomba de presión de vacío Gast, modelo DOA-P104-AA.
- Frasco de borosilicato Pyrex de 500 ml con tapón de rosca autoclaveable.
- Pipeta monocal, Thermo electron Finnpiette 100-1000 µL, modelo 4500.
- Balanza semianalítica A&D Weighing, modelo GF-600.
- Hot plate (Cimarec stirring) Barnstead ThermoLyne, modelo SP46920.
- pHmetro Fisher Scientific accumet basic AB15 Plus.
- Autoclave Tuttnauer, modelo 3870EL-D.
- Pipeta electrónica, Thermo Scientific Finnpiette Novus 1-10 ml 46200800.

Procedimiento: Etapa final de hidrólisis química del almidón previo a fermentación láctica (Anexo 1, Figura A.7)

- I. Pesar la cáscara de plátano según la **sección 3.6 romano IX** y colocarla en un frasco de 500 ml con tapón de rosca autoclaveable,
- II. Agregar ácido sulfúrico 5% p/v en una relación de 2:1 a la cáscara.
- III. Llevar el frasco el autoclave al tiempo donde se produzca mayor cantidad de azúcares fermentables del procedimiento descrito en la **sección 3.9.1**.
- IV. Llevar el pH de cada reactor entre 5 y 6 con KOH 10N con agitación constante y colocar el pH metro para lectura continua a la adición del KOH.
- V. Adicionar agua destilada hasta alcanzar a 32 g/L de azúcares reductores.
- VI. Cuantificar los azúcares reductores por el método DNS (**sección 2.6**).
- VII. Filtrar el licor neutralizado con ayuda de una bomba al vacío, un kitasato y con el sostenedor con membrana filtrante de 0.105 mm, para poder trabajar en la etapa de fermentación con *Lactobacillus delbrueckii*.

NOTA: Para superar la concentración de azúcares reductores totales (32 g/L), se debe emplear otros equipos que puedan trabajar en las nuevas condiciones.

3.9.5. ENRIQUECIMIENTO DE NUTRIENTES MÍNIMOS PARA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO, POSTERIOR A LA HIDRÓLISIS QUÍMICA

El propósito en esta etapa es llevarle todos los nutrientes que necesita el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* para que pueda producir eficientemente ácido láctico con el contenido de azúcares fermentables del licor de hidrólisis ácida.

Reactivos

- Extracto de levadura.
- Fosfato di-potásico.
- MgSO₄ y MnSO₄.
- Agua destilada estéril.
- Licor de la hidrólisis ácida (**sección 3.5.3, romano IX**).
- NaCl.
- KOH 10 N.

Materiales

- Erlenmeyer tapón de rosca de 500 ml.
- 2 Probetas de 500 ml (estéril).
- Espátula.

Equipo

- Balanza analítica A&D Weighing, modelo GH-252.
- Autoclave Tuttnauer, modelo 3870EL-D.

Procedimiento: Enriquecimiento de nutrientes posterior a hidrólisis química (Anexo 1, Figura A.8)

- I. Medir 250 ml de licor de la hidrólisis ácida en una probeta graduada.

- II. Enriquecer el licor de la hidrólisis ácida según **tabla 3.9**.
- III. Mezclar los reactivos en el licor y llevar a pH 7 con KOH 10 N.
- IV. Tapar el licor y esterilizar a 121 °C y 15 psi por 15 minutos.
- V. Ajustar de nuevo el volumen del licor perdido en el proceso de esterilizado llevándolo a 250 ml con agua destilada estéril (utilizar probeta de 500 ml).

Tabla 3.10: Enriquecimiento nutricional del licor correspondiente a la hidrólisis química.

Reactivos	Masa del reactivo	Concentración deseada en licor
Cloruro de Sodio	2.25 g	9 g/L
Extracto de levadura	3.5 g	14 g/L
Fosfato di potásico	0.25 g	1 g/L
Sulfato de Magnesio	0.145 g	0.58 g/L
Sulfato de manganeso	0.05 g	0.20 g/L

3.9.6. PREPARACIÓN Y CÁLCULO DE INÓCULO *Lactobacillus delbrueckii*

Llevar una cantidad conocida y necesaria de microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* al biorreactor para que este proporcione la máxima eficiencia de la conversión de azúcares reductores a ácido láctico. Para asegurar reproducibilidad de los resultados, este experimento se desarrollará por triplicado.

Reactivos

- Solución estandarizada de *Lactobacillus delbrueckii* (**sección 2.5.2**), con una concentración de 3.1×10^8 UFC/ml.
- Licor de la hidrólisis ácida de la **sección 3.9.5**.

Materiales

- Pipeta electrónica, Thermo Scientific Finnpiptette Novus 1-10 ml 46200800.

Equipo

- Biorreactor de borosilicato de 500 ml con tres boquillas.
- pHmetro Fisher Scientific, accumet basic AB15 Plus.
- Cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2.

Procedimiento: Preparación y cálculo de inóculo *Lactobacillus delbrueckii* (Anexo 1, Figura A.9)

- I. Colocar 250 ml del licor de la hidrólisis ácida en el biorreactor.
- II. Inocular, dentro de la cabina de flujo laminar, con la solución estandarizada de microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* al biorreactor al 2% con respecto al volumen del licor puesto en el biorreactor (250 ml); la cantidad de inóculo será de 5 ml de la solución estandarizada.

3.9.7. VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR PREVIO A FERMENTACIÓN LÁCTICA

Establecer las condiciones óptimas de funcionamiento del biorreactor y definir los controles fisicoquímicos que se llevarán en el tiempo de fermentación.

Reactivos

- HCl 2 N.
- Solución de CaCO_3 10% p/v.
- Bicarbonato de sodio.
- Agua destilada estéril.

Materiales

- Tapaderas.
- Mangueras conectoras.
- Cámara de anaerobiosis.
- Agitador magnético.
- Trampa de agua para CO_2 .
- Filtro de agua.

Equipo

- Incubadora (Lab Gravity Convection Incubator) Precision Scientific.
- Bomba de presión de vacío Gast, modelo DOA-P104-AA
- pHmetro Fisher Scientific, accumet basic AB15 Plus.
- Cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2.
- Termómetro.

Procedimiento: Verificación y cumplimiento de parámetros de operación del biorreactor previo a fermentación láctica (Anexo 1, Figura A.10)

Cada vez que se termine de muestrear se deberá:

- I. Trabajar en la cabina de flujo laminar.
- II. Ajustar el pH del biorreactor de 500 ml que contiene el licor de la hidrólisis ácida con carbonato de calcio a 7.0.
- III. Colocar todos los dispositivos de funcionamiento del biorreactor (cámara ambientadora anaeróbica, filtro de agua, magneto, trampa de agua para CO_2 , tapaderas, bomba al vacío y mangueras conectoras).
- IV. Encender la bomba de vacío y esperar a generar vacío dentro del biorreactor, cerrar las válvulas (la válvula donde se muestrea siempre debe estar cerrada), desconectar la bomba y acoplar la trampa de CO_2 .
- V. Colocar en la cámara ambientadora de anaerobiosis 15 g bicarbonato de sodio y 100 ml ácido clorhídrico 2 N, abrir inmediatamente válvulas A y B.
- VI. Antes de cerrar las válvulas A y B, cerciorarse que la trampa de CO_2 no siga expulsando gas.
- VII. Desacoplar la cámara ambientadora de CO_2 y el filtro de agua.
- VIII. Colocar el biorreactor montado sobre un agitador magnético que girará a 120 rpm y a 40 °C y la trampa de CO_2 dentro de la incubadora.

- IX. Monitorear y muestrear cada 12 horas para cuantificar la formación de ácido láctico y para mantener el pH en óptimas condiciones.
- a) **Muestreo:** recoger 10 ml de licor del biorreactor.
 - b) **pH:** medirlo a 10 ml de muestra y ajustarlo a 7 en biorreactor con CaCO_3 .
 - c) **Temperatura:** deberá ser constante a 40 °C (incubadora y biorreactor).
 - d) **Condiciones anaeróbicas:** después del muestreo utilizar la cámara de agregando 15 g de bicarbonato de sodio y 100 ml de HCl 2 N.

3.9.8. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO EN BIORREACTOR

Contabilizar la concentración de ácido láctico contra tiempo producida por el *Lactobacillus delbrueckii*. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, se llevará por triplicado este experimento.

Reactivos

- Ácido sulfúrico 2N.
- Agua destilada.
- Licor fermentado de la **sección 3.9.7.**

Materiales

- Balón de 200 ml.
- Filtro de celulosa 0.45 μm .

Equipo

- Hot plate (Cimarec stirring) Barnstead ThermoLyne, modelo SP46920.
- pHmetro Fisher Scientific, accumet basic AB15 Plus.
- Centrífuga Thermo Scientific, Labofuge 200.
- Pipeta monocal, Thermo electron Finnpiptette 100-1000 μL , modelo 4500.
- Pipeta electrónica, Thermo Scientific Finnpiptette Novus 1-10 ml 46200800.
- Espectrofotómetro Hach, modelo DR 3900.

Procedimiento: Cuantificación de ácido láctico producido en el biorreactor (Anexo 1, Figura A.3)

- I. Tomar 5 ml de la muestra obtenida en la **sección 3.9.7.**
- II. Llevar la muestra a baño maría a 75 °C en hot plate por 10 minutos, esto con el fin de pasteurizarla.
- III. Dejar que la muestra llegue a temperatura ambiente.
- IV. Ajustar el pH de la muestra aproximadamente a 3.3 con H_2SO_4 2N.
- V. Llevar la muestra cuantitativamente a un balón de 200 ml, agregar solución previamente preparada de FeCl_3 (**método cloruro férrico, sección 2.6**) para cuantificar el ácido láctico producido, en una relación de 10 ml de FeCl_3 por cada 100 ml de solución total, se afora con agua destilada.
- VI. Del aforo tomar una alícuota de 10 ml, centrifugarla a 3,500 rpm por 15 min.

- VII. Filtrar el sobrenadante a 0.45 μm .
- VIII. Leer absorbancia a 435 nm (**método cloruro férrico, sección 2.6**).
- IX. El monitoreo termina cuando ya no hay cambio significativo entre una muestra y otra, las lecturas se realizan cada 12 horas, se deberá hacer lectura de azúcares reductores totales cuando termine el proceso de fermentación láctica (**método DNS, sección 2.6**).

3.9.9. RESULTADO DE FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL LICOR PRODUCIDO POR HIDRÓLISIS QUÍMICA CON *Lactobacillus delbrueckii*

Las muestras tomadas para realizar las mediciones de absorbancia con el método cloruro férrico, **sección 2.6**, tuvieron que ser diluidas para que las lecturas se mantuvieran dentro de la curva concentración de ácido láctico vs absorbancia.

Siguiendo los procedimientos descritos en la **sección 3.9.6, sección 3.9.7 y sección 3.9.8**; pueden consultarse los valores de tiempo (variable independiente), absorbancias (para cada tiempo) y concentración de ácido láctico (variable dependiente) en el “**Anexo 3: Resultados de la etapa experimental, Tabla A.5**”.

El porcentaje de inoculación del *Lactobacillus delbrueckii* fue del 2%, teniendo un volumen de licor de 250 ml, entonces la inoculación fue de 5 ml, esta se realizó dentro de una cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2; una vez inoculado se conectaron todos los dispositivos necesarios para crear el ambiente anaeróbico que necesita para crecer y se incubó (Lab Gravity Convection Incubator) a 40 °C, cada 12 horas se tomaba una muestra de 10 ml de los tres biorreactores, a estas muestras se les tomaba el pH y se llevaba con carbonato de calcio el pH de los tres reactores a 7 (este valor es muy importante, ya que el *Lactobacillus delbrueckii* es sensible a ambientes ácidos), una vez terminado el muestreo, se conectaban nuevamente todos los dispositivos para establecer una vez más el ambiente anaeróbico y posteriormente se trasladó el biorreactor a la incubadora.

De cada uno de los tres biorreactores se tomaron 5 ml (a estas alícuotas no se les elevaba el pH a 7), que se llevaron a baño maría (75 °C, 10 minutos), se dejaban enfriar a temperatura ambiente, se ajustaban los pH a 3.3 con ácido sulfúrico 2 N y se transferían cuantitativamente a balones de 200 ml, se adicionó a cada balón una solución previamente preparada de FeCl_3 , para realizar la cuantificación de ácido láctico por el método de cloruro férrico, en la relación de 10 ml por cada 100 ml de solución total, es decir que se adicionó en total 20 ml de esta solución a cada balón de 200 ml, posteriormente se aforaba con agua destilada, de esta última solución preparada se tomaba 10 ml que se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, filtrándose el sobrenadante a 0.45 μm , y se leía absorbancia a 435 nm.

Para encontrar la concentración a partir de la absorbancia leída con el espectrofotómetro Hach, modelo DR 3900, se utilizó la regresión creada por Excel:

$$\text{Absorbancia} = 0.0025 * (\text{concentración, ppm}) + 0.0022$$

Se graficó el tiempo t de producción de ácido láctico (horas) vs concentración C (g/L), la ecuación de regresión obtenida es:

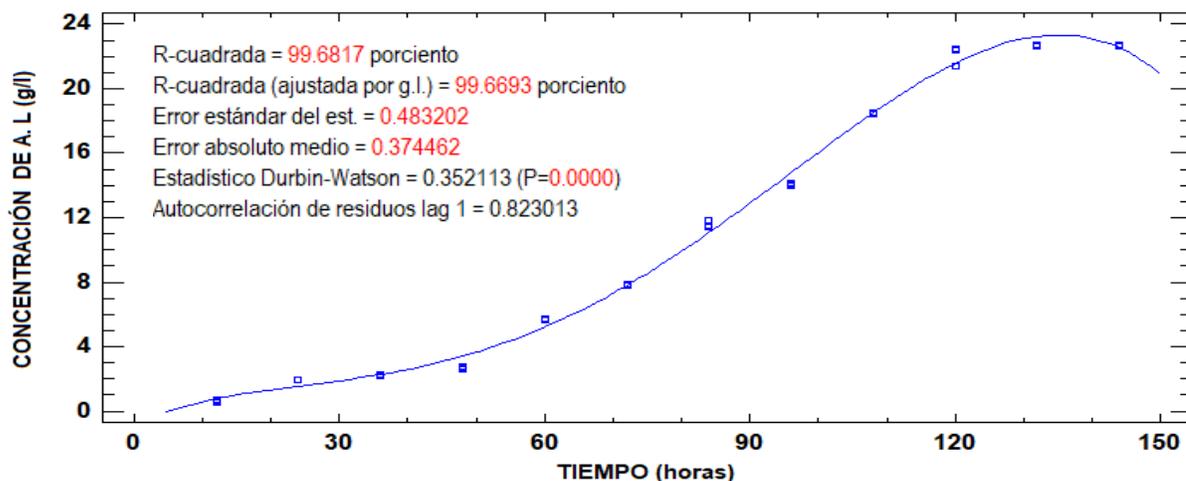


Figura 3.5: Gráfica tiempo (horas) contra concentración de ácido láctico (g/L) producidos por con los azúcares provenientes de hidrólisis con H_2SO_4 5% p/v.

$$C = -3.59001E^{-7}t^4 + 8.69871E^{-5}t^3 - 5.16178E^{-3}t^2 + 0.17292t - 0.710881; R^2 = 0.996817$$

Tabla 3.11: Análisis de varianza (ANOVA) de fermentación láctica de la hidrólisis química.

		<i>Error</i>		<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>		<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	-0.710881	0.420418		-1.69089	0.0939
TIEMPO	0.17292	0.0340646		5.07623	0.0000
TIEMPO^2	-0.00516178	0.000840429		-6.14183	0.0000
TIEMPO^3	0.0000869871	0.00000794616		10.9471	0.0000
TIEMPO^4	-3.59011E-7	2.53167E-8		-14.1808	0.0000
Análisis de Varianza					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	7530.53	4	1882.63	8063.20	0.0000
Residual	24.0489	103	0.233485		
Total (corr)	7554.58	107			

Puesto que el valor-P en la **tabla 3.11** es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Concentración de ácido láctico y Tiempo con un nivel de confianza del 95%. En vista de que sí se pudo comprobar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre concentración y tiempo con todos los datos obtenidos de la fermentación láctica a partir del licor creado por la hidrólisis

química de la cáscara de plátano verde, se procedió a verificar en qué tiempo la concentración de ácido láctico se encuentra en su máximo punto, esto a través de la primera derivada de la ecuación generada por el programa Statgraphics Centurion (2010):

$$C' = -1.436004 \cdot 10^{-6}t^3 + 0.0002609613t^2 - 0.01032356t + 0.17292$$

Igualando la primera derivada a cero, se obtienen los máximos y mínimos de la regresión para la fermentación láctica a partir del licor generado por hidrólisis química de la cáscara de plátano verde.

$$\begin{aligned} t_1 &= 23.3053 + 18.6567i \text{ horas} \\ t_2 &= 23.3053 - 18.6567i \text{ horas} \quad \text{ó} \\ t_3 &= 135.117 \text{ horas} \end{aligned}$$

Se descartan los dos primeros valores (t_1 y t_2) ya que son imaginarios, por lo que a las 135 horas (5 días con 15 horas) la producción de ácido láctico a partir del licor de la hidrólisis con ácido sulfúrico está en su alta concentración, para las 135 horas (valor teórico, a partir de la regresión) es:

$$C_{135 \text{ horas}} = 23.3384 \text{ g/l}$$

La concentración de ácido láctico promedio a las 132 horas (valor que se obtuvo del trabajo en el laboratorio, ver **Anexo 3, Tabla A.5**) es:

$$C_{132 \text{ horas}} = 22.7008 \text{ g/l}$$

3.9.10. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL BIORREACTOR

- I. Calcular el rendimiento del biorreactor para la etapa de hidrólisis ácida utilizando los datos de los muestreos donde la concentración obtenida de azúcares reductores es máxima (ver **sección 4.1.1**).
- II. Calcular el rendimiento del biorreactor para la etapa de fermentación láctica utilizando los datos de los muestreos donde la concentración obtenida de ácido láctico es máxima (ver **sección 4.1.2**).

3.10. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR ACCIÓN MICROBIANA DEL *Aspergillus oryzae* Y FERMENTACIÓN LÁCTICA CON *Lactobacillus delbrueckii*

Descripción de los procedimientos empleados para la producción de ácido láctico a partir del sistema de biotransformación de hidrólisis enzimática por acción microbiana (*Aspergillus oryzae*) y fermentación láctica (*Lactobacillus delbrueckii*).

3.10.1. PREPARACIÓN Y CÁLCULO DEL INÓCULO DE *Aspergillus oryzae* PARA EXTRACTO ENZIMÁTICO

Llevar la cantidad determinada de *Aspergillus oryzae* al biorreactor que contiene cierta cantidad de cáscara molida de plátano hidratada con solución nutritiva, para que se produzcan las enzimas necesarias para la posterior hidrólisis; estas enzimas se extraerán (como extracto enzimático) para la conversión del almidón de la cáscara de plátano a azúcares fermentables, por triplicado.

Reactivos

- Solución estandarizada de *Aspergillus oryzae* al 5.7×10^6 UFC/ml (**sección 2.5.1**).
- Cáscara de plátano esterilizada.
- Buffer fosfato pH 5.5

Materiales

- Espátula
- Gaza y papel crepe.
- Pipeta monocal, Thermo Electron 100-1000 μ L

Equipo

- Cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2.
- Autoclave Tuttnauer, modelo 3870EL-D.
- Monitor de humedad Fisher Scientific, 4040.
- 18 erlenmeyer Kimax, 250 ml.
- Incubadora Precision Scientific.

Procedimiento: Preparación y cálculo de Inóculo de *Aspergillus oryzae* (Anexo 1, Figura A.11)

- Colocar 5 g de cáscara de plátano en cada uno de los Erlenmeyer.
- Humedecer la cáscara de plátano con solución nutritiva pH 6 en una relación de 1:4 buscando gelatinizar la cáscara molida (**ver tabla 3.10**).
- Llevar al autoclave los 18 Erlenmeyer, a 121 °C, 15 psi por 15 minutos.
- Inocular el biorreactor en cabina de flujo laminar al 10% v/v, respecto al volumen del medio semisólido, con la solución estandarizada de *Aspergillus oryzae*. Tapar los Erlenmeyer con gasa, algodón (torundas) y papel crepe.
- Colocar los Erlenmeyer sobre recipientes que contengan agua (para mantener la humedad, alrededor de 70%) en la incubadora a 32 °C.

Tabla 3.12: Solución nutritiva para hidratación de medio *Aspergillus oryzae*.

Compuesto	Concentración
NaCl	0.9 % p/v
MnSO ₄	0.05 g/L
Extracto de levadura	14 g/L

3.10.2. VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR ACCIÓN MICROBIANA

El objetivo es controlar aquellos parámetros de operación que aseguren el buen crecimiento del *Aspergillus oryzae* en cáscara de plátano para la óptima producción del extracto enzimático.

Equipo

- Incubadora (Lab Gravity Convection Incubator) Precision Scientific.
- Monitor de humedad Fisher Scientific, 4040.

Procedimiento: Verificación y cumplimiento de parámetros de operación

- I. Monitorear que la temperatura sea de 32 °C dentro de la incubadora con ayuda del monitor de humedad (alrededor de 70%).

3.10.3. PREPARACIÓN Y CÁLCULO PARA LA REALIZACIÓN DE LA CURVA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN

El objetivo es verificar en qué tiempo la producción de azúcares reductores es máxima, partiendo del almidón de la cáscara de plátano y extracto enzimático del *Aspergillus oryzae* preparando condiciones requeridas por fermentación láctica.

Reactivo

- Muestras en erlenmeyer (sección 3.10.1 romano V).
- Carbón activado.
- Solución salina 0.9% p/v.

Materiales

- Balón de 200 ml.
- Espátula.
- Kitasato.
- Filtro de membrana de celulosa regenerada Sartorius, poro 0.45 µm.
- Pipeta monocal, Thermo electron Finnpiptette 100-1000 µL, modelo 4500.
- Pipeta electrónica, Thermo Scientific Finnpiptette Novus 1-10 ml 46200800.
- Sostenedor de filtro con membrana de filtración de 0.105 mm.
- Beaker de 250ml.
- Agitador magnético.
- Frasco lavador.

Equipo

- Hot plate (Cimarec , Barnstead ThermoLyne, SP46920).
- Recipiente de plástico con tapón de rosca.
- Máquina para baño maría Shel Lab, modelo WS17.
- Espectrofotómetro Hach, modelo DR 3900.
- Cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2.
- Balanza analítica A&D Weighing, modelo GH-252.

Procedimiento: Procedimiento de construcción de curva de hidrólisis enzimática por acción microbiana (Anexo 1, Figura A.12)

- I. Trabajar en cabina de flujo laminar y cada 12 horas se tomarán los tres Erlenmeyer inoculados con *Aspergillus oryzae* correspondiente; agregarles 20 ml de solución salina y raspar con espátula para homogenizar.
- II. Agitar lo obtenido del paso anterior por 30 minutos en hot plate a 120 rpm.
- III. Filtrar con ayuda del sostenedor de filtro con membrana de filtración de 0.105 mm, kitasato y bomba al vacío, para obtener el extracto enzimático.
- IV. Realizar la metodología DNS (**sección 2.6**) al extracto enzimático. Pesar en balanza analítica 0.1735 g de cáscara molida que se colocará en un recipiente de plástico con tapón de rosca (esta cantidad pesada se basa en la concentración final deseada de azúcares reductores totales: 25 g/L y servirá para construir la curva de tiempo vs concentración),
- V. Adicionar a la cáscara del paso anterior 0.5 ml de solución salina y llevar a baño maría a 75 °C por 10 minutos (para gelatinizar), dejar enfriar y agregar 2 ml de extracto enzimático.
- VI. Llevar a la máquina de baño maría los contenidos del paso anterior, por 40 minutos a 37 °C (temperatura a la cual trabaja la enzima α -amilasa) y por 40 minutos a 65 °C (temperatura en la que trabaja la enzima β -amilasa).
- VII. Trasladar cuantitativamente a un balón de 200 ml la cáscara de plátano del paso anterior y aforar con agua destilada.
- VIII. Realizar lectura de azúcares reductores totales por el método del DNS (**sección 2.6**), se debe considerar que al tomar una alícuota del balón para realizar este método se debe agregar carbón activado (por cada 25 ml de muestra, son 0.25 g de carbón activado) y filtrar con filtro de 0.45 μ m.
- IX. Realizar la curva de producción de azúcares reductores (tiempo vs concentración de azúcares reductores, AHE), en esta curva solo se presentará lo hidrolizado por el extracto.

$$ART = AHE + AEE$$

Dónde: **ART**: Azúcares reductores totales, **AHE**: Azúcares hidrolizados enzimáticamente y **AEE**: Azúcares en el extracto enzimático.

- X. Tomar en cuenta que los valores de cantidad de cáscara, solución salina y volumen de extracto enzimático van a cambiar cuando se quiera producir el licor que se utilizará en la posterior fermentación láctica (debido a que los valores optimizan recursos en la construcción de la curva concentración vs tiempo), las cantidades a ocupar para crear el licor son: cáscara molida: 10.4167 g, solución salina: 30.02 ml y extracto enzimático: 119.98 ml.

3.10.4. RESULTADOS HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR ACCIÓN MICROBIANA CON *Aspergillus oryzae*

Siguiendo los procedimientos descritos en la **sección 3.10.1** y **sección 3.6.2**, se presenta en el “**Anexo 3: Resultados de la etapa experimental, Tabla A.6**” los valores de tiempo (en horas, variable independiente), absorbancia (para cada tiempo), concentración de azúcares reductores totales en el licor (en ppm, variable dependiente), concentración de azúcares reductores en el extracto enzimático y la cantidad de azúcares creados por hidrólisis enzimática.

Se pesó 5 g de cáscara molida para 18 erlenmeyer, esto para la creación de la curva de producción de azúcares reductores, y se les adicionó 20 ml de solución nutritiva, se llevó al autoclave Tuttnauer, por 15 minutos (15 psi, 121°C), se llevó a temperatura ambiente y se inoculó al 10% v/v (2 ml), posteriormente los erlenmeyer inoculados se muestrean cada 12 horas en la incubadora (32 °C, 70% de humedad).

Al cumplirse los intervalos de 12 horas, se tomaban tres erlenmeyer, a los cuales se le añadía 20 ml de solución nutritiva, se raspaba y se agitaba por 30 min en hot plate, se filtraba y se leía la absorbancia (por triplicado) para saber la cantidad de azúcares reductores que se encontraban en el extracto (metodología DNS). Posteriormente se pesaba 0.1735 g de cáscara de plátano (esta cantidad para reducir los materiales a ocupar, posteriormente se explicará el cálculo de esta medida), al que se le adicionaban 0.5 ml de solución salina y se llevaba a baño maría (75 °C, 10 minutos), se dejaba enfriar y se agregaba 2 ml de extracto enzimático, esta mezcla luego era llevada a baños maría de 37 °C y otro de 65 °C (40 minutos cada una), transferir cuantitativamente a balón de 200 ml y se aforaba con agua destilada (esto con el fin de que el espectrofotómetro fuera capaz de realizar una lectura confiable), finalmente se toma una alícuota para método DNS.

Se busca crear una solución de 25 g/L de azúcares reductores totales al pesar 0.1735 g de cáscara de plátano, los azúcares no reductores en ella será:

$$\text{Azúcares no reductores} = 0.1735 * 0.36 = 0.06246 \text{ g}$$

$$\text{Volumen total} = 2 \text{ ml de extracto} + 0.5 \text{ ml de sln salina} = 2.5 \text{ ml}$$

$$\text{Concentración azúcares reductores deseados} = \frac{0.06249 \text{ g}}{0.0025 \text{ l}} = 24.984 \text{ g/l}$$

Para encontrar la concentración a partir de la absorbancia leída con el espectrofotómetro Hach, modelo DR 3900, se utilizó la regresión creada por Excel.

$$\text{Absorbancia} = 0.0008 * (\text{concentración, ppm}) - 0.0151$$

Se debe tomar en cuenta que en el extracto enzimático se formaron azúcares reductores (estos le sirven como alimento al *Aspergillus oryzae* para crear luego enzimas hidrolizantes del almidón), es decir que la concentración final de azúcares reductores totales en el licor es una suma de los azúcares formados en el extracto enzimático y los azúcares formados por hidrólisis enzimática del almidón presente en la cáscara de plátano verde.

$$ART = AHE + AEE$$

Dónde: **ART**: Azúcares reductores totales, **AHE**: Azúcares hidrolizados enzimáticamente y **AEE**: Azúcares en el extracto enzimático.

Estos azúcares reductores totales y azúcares hidrolizados enzimáticamente se leen con ayuda del espectrofotómetro, del “Anexo 3: Resultados de la etapa experimental, Tabla A.6” se pueden crear tres gráficas (tiempo vs concentración de azúcares reductores totales en el licor, tiempo vs concentración de azúcares reductores en el extracto y tiempos vs concentración de azúcares reductores hidrolizados por el extracto enzimático, se graficaron estos comportamientos, la ecuación de regresión y el trabajo estadístico para los datos obtenidos:

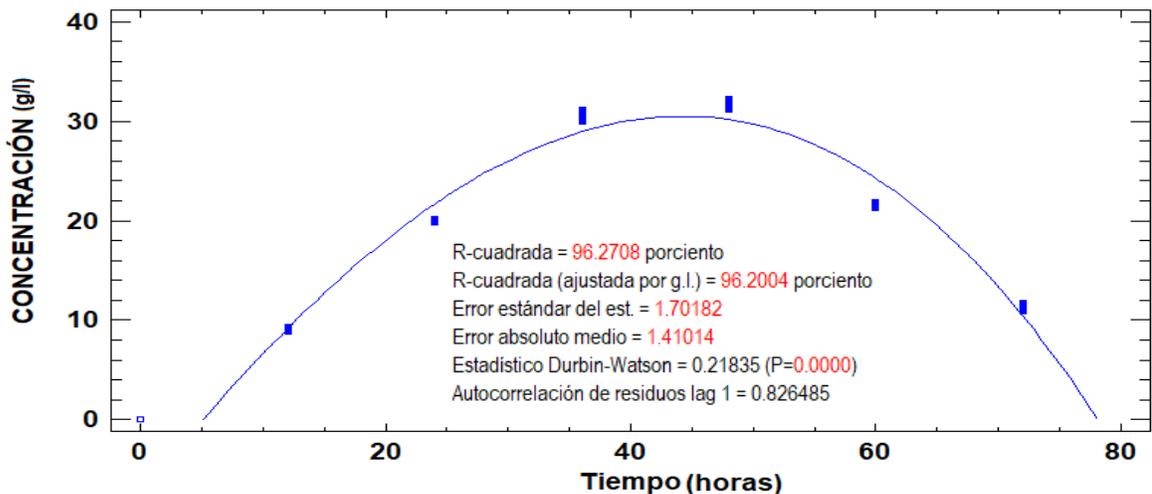


Figura 3.6: Gráfica tiempo (horas) contra concentración de azúcares reductores totales en el licor (g/L) producidos por hidrólisis enzimática con *Aspergillus oryzae*.

$$C_{LICOR} = -9.00866E^{-5}t^3 - 0.0115414t^2 + 1.54831t - 7.61804$$

$$R^2 = 0.9627$$

C_{LICOR} : Concentración azúcares reductores en el licor (g/L); t: tiempo (horas)

Tabla 3.13: Análisis de varianza (ANOVA) de azúcares reductores totales en el licor producidos por hidrólisis enzimática con *Aspergillus oryzae*.

Parámetro	Estimado	Error		Estadístico	
		Estándar	T	Valor-P	
CONSTANTE	-7.61804	0.970184	-7.85216	0.0000	
TIEMPO	1.54831	0.093678	16.528	0.0000	
TIEMPO^2	-0.0115414	0.00255173	-4.52297	0.0000	
TIEMPO^3	0.0000900866	0.0000204585	-4.40339	0.0000	
Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	11887.8	3	3962.59	1368.21	0.0000
Residual	460.492	159	2.89618		
Total (corr)	12348.3	162			

Puesto que el valor-P en la tabla 3.13 es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Concentración de azúcares reductores totales en el licor y el tiempo con un nivel de confianza del 95%.

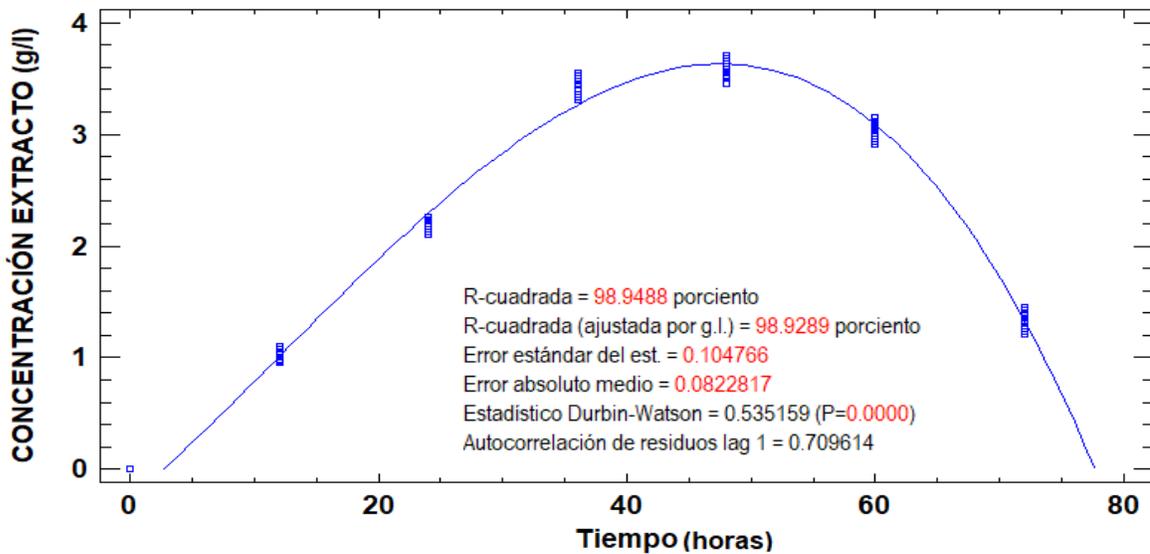


Figura 3.7: Gráfica tiempo (horas) contra concentración de azúcares reductores totales en el extracto enzimático (g/L) del *Aspergillus oryzae*.

$$C_{EXTRACTO} = -2.89998E^{-5}t^3 + 0.0010188t^2 + 0.0993981t - 0.28126$$

$$R^2 = 0.9895$$

$C_{EXTRACTO}$: Concentración azúcares reductores en extracto (g/L); t: tiempo (horas)

Tabla 3.14: Análisis de varianza (ANOVA) de azúcares reductores totales en el extracto enzimático producidos por hidrólisis enzimática con *Aspergillus oryzae*.

Parámetro	Estimado	Error		Estadístico	
		Estándar	T	Valor-P	
CONSTANTE	-0.28126	0.0597255	-4.709922	0.0000	
TIEMPO	0.0993981	0.00576691	17.2359	0.0000	
TIEMPO^2	0.0010188	0.000157087	6.4856	0.0000	
TIEMPO^3	-0.0000289998	0.00000125944	-23.0259	0.0000	
Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	164.264	3	54.7546	4988.66	0.0000
Residual	1.74515	159	0.0109758		
Total (corr)	166.009	162			

Puesto que el valor-P en la Tabla 3.14 es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Concentración de azúcares reductores totales en el licor y el tiempo con un nivel de confianza del 95%.

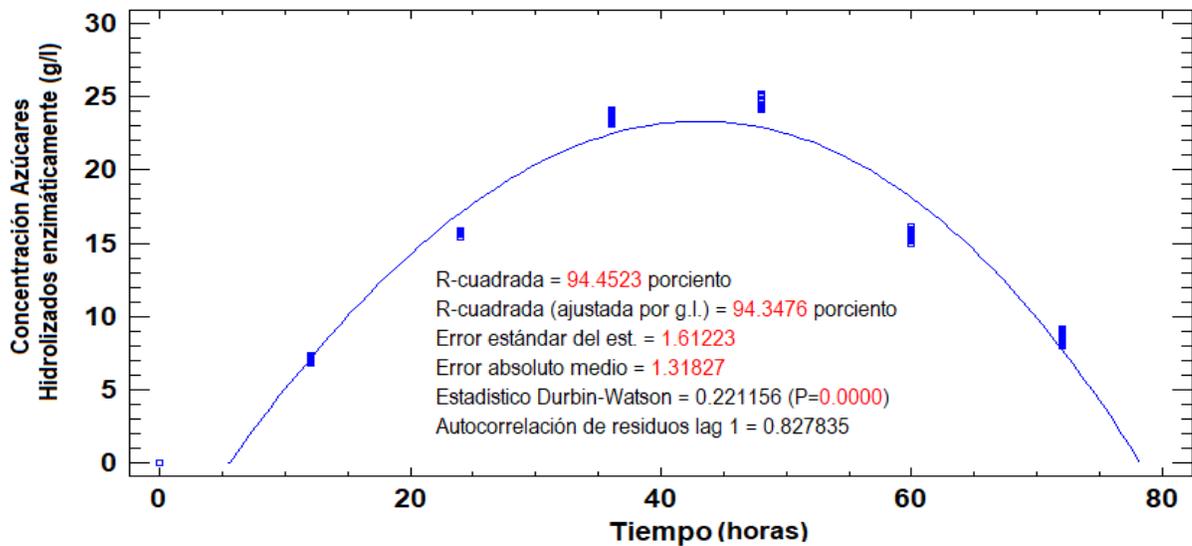


Figura 3.8: Gráfica tiempo (horas) contra concentración de azúcares reductores totales hidrolizados por el extracto enzimático (g/L) del *Aspergillus oryzae*.

$$C_{AZ.HIDRO} = -3.20871E^{-5}t^3 - 0.013579t^2 + 1.34951t - 7.05552$$

$$R^2 = 0.9445$$

$C_{AZ.HIDRO}$: Concentración azúcares reductores hidrolizados por extracto (g/L); t: tiempo (horas)

Tabla 3.15: Análisis de varianza (ANOVA) de azúcares reductores hidrolizados por extracto enzimático producidos por hidrólisis enzimática con *Aspergillus oryzae*.

		<i>Error</i>		<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>		<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	-7.05552	0.91911		-7.67647	0.0000
TIEMPO	1.34951	0.0887464		15.2064	0.0000
TIEMPO^2	-0.013579	0.0024174		-5.6172	0.0000
TIEMPO^3	0.0000320871	0.0000193815		-1.65556	0.0998
Análisis de Varianza					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	7036.34	3	2345.45	902.35	0.0000
Residual	413.284	159	2.59927		
Total (corr)	7449.62	162			

Puesto que el valor-P en la Tabla 3.15 Análisis de ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de azúcares hidrolizados por el extracto enzimático y tiempo, nivel de confianza 95%.

En vista de que sí se pudo comprobar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre concentración de azúcares reductores en el licor y tiempo, entre concentración de azúcares reductores en el extracto y tiempo, y entre concentración de azúcares reductores hidrolizados por el extracto y tiempo; con todos los datos obtenidos de la hidrólisis enzimática por acción microbiana de la cáscara de plátano verde, se procedió a la producción de un licor rico en azúcares fermentables que pueda ser aprovechado la posterior fermentación láctica.

A partir de la ecuación generada por el programa Statgraphics Centurion (2010) se puede llegar a conocer el momento donde la cantidad de azúcares reductores totales del licor alcanza un máximo, siendo la primera derivada de esa función:

$$C_{LICOR}' = -0.00027026t^2 - 0.0230828t + 1.54831$$

Igualando la primera derivada a cero, se obtienen los máximos y mínimos de la regresión para la hidrólisis enzimática por acción microbiana de la cáscara:

$$t_1 = -129.611 \text{ horas} \quad \text{ó} \quad t_2 = 44.2013 \text{ horas}$$

Se descarta el primer valor (t_1) ya que es negativo, por lo que a las 44 horas la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática por acción microbiana está en su punto más alto de concentración.

La concentración de azúcares reductores para las 44 horas sería entonces:

$$C_{Licor44 \text{ horas}} = 30.4895 \text{ g/l}$$

También es importante conocer el tiempo donde la concentración de azúcares reductores producidos por el extracto enzimático está en su punto más alto, para esto se tomará la ecuación generada para el comportamiento de los datos obtenidos, se derivará y se igualará a cero:

$$C_{AZ.HIDRO}' = -9.62613E^{-5}t^2 + 0.027158t - 1.34951$$

$$t_1 = -325.233 \text{ horas} \quad \text{ó} \quad t_2 = 43.1052 \text{ horas}$$

Se descarta el primer valor (t_1) por ser negativo, entonces a las 43 horas la producción de azúcares reductores obtenidos por medio del extracto enzimático está en su máximo punto, se presenta a continuación esta concentración

$$C_{AZ.HIDRO \ 43 \ HORAS} = 23.3147 \text{ g/l}$$

Para preparar aproximadamente 800 ml de solución de azúcares reductores con concentración cercana a 32 g/L a partir de cáscara de plátano verde molida y el extracto enzimático creado por *Aspergillus oryzae*, se procedió de la forma:

Se trabajó con 32 erlenmeyer (esa cantidad con el fin de crear tres licores para ser utilizados en la fermentación láctica), a los que se les agregó 5 g de cáscara a cada uno (160.0 g de cáscara en total), 20 ml de solución nutritiva (640 ml en total), 2 ml de inóculo de solución estandarizada (64 ml en total), se dejaron en la incubadora por 48 horas, pasado este tiempo se recolectó el extracto enzimático (640 ml aproximadamente, se tomó tres alícuotas de 1 ml para hacer metodología DNS); aparte se gelatinizó 55.56 g de cáscara (para obtener una concentración de azúcares no reductores de 25 g/L = $55.56 \text{ g} \cdot 0.36 / 0.8 \text{ L}$) con solución salina (160 ml) a una temperatura de 75 °C por 10 minutos, se dejaba enfriar y se agregaba los 640 ml del extracto enzimático, esta mezcla luego era llevada a baño maría primero de 37 °C y después de 65 °C (40 minutos cada una), finalizado este tiempo, se dejó enfriar y se tomó tres muestras de 2.5 ml que se transferían cuantitativamente a balones de 200 ml y se aforaba con agua destilada (esto con el fin de que el espectrofotómetro fuera capaz de realizar una lectura confiable), finalmente se toma una alícuota para realizar la metodología DNS.

Para lecturas de absorbancia del licor creado por hidrólisis enzimática por acción microbiana, se tomaron tres alícuotas de 2.5 ml, las que se llevaron a aforo de 200 ml, finalmente se cuantificó azúcares reductores con la metodología DNS: La concentración final del licor a partir de cáscara de plátano con *Aspergillus oryzae* es 32.243 g/L, pero la concentración creada por el extracto enzimático es 25.23 g/L.

Tabla 3.16: Resultados de hidrólisis de cáscara de plátano con *Aspergillus oryzae*.

N° de tubo	Licor 1	Licor 2	Licor 3	Promedio
Absorbancia del Licor	0.308	0.308	0.306	
Concentración de azúcares reductores del Licor (ppm)	403.88	403.88	401.38	403.04
Concentración de azúcares reductores del Licor (g/L)	32.310	32.310	32.110	32.243
Gramos de Azúcares reductores del licor en la muestra de 2.5 ml	0.0808	0.0808	0.0803	0.0806
N° de tubo	Extracto 1	Extracto 2	Extracto 3	Promedio
Absorbancia del extracto	0.054	0.056	0.055	
Concentración de azúcares reductores del extracto (ppm)	86.375	88.875	87.625	87.625
Concentración de azúcares reductores del extracto (g/L)	3.4550	3.5550	3.5050	3.5050
Gramos de Azúcares reductores del extracto en la muestra de 1 ml	0.0086	0.0089	0.0088	0.0088
Azúcar hidrolizada de la cáscara (g/L)	25.400	25.200	25.100	25.233

3.10.5. ENRIQUECIMIENTO POSTERIOR A HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE NUTRIENTES MÍNIMOS PARA TRANSFORMACIÓN A ÁCIDO LÁCTICO

El propósito en esta etapa es agregar todos los nutrientes que necesita el *Lactobacillus delbrueckii* para que pueda producir eficientemente ácido láctico con el contenido de azúcares fermentables del licor hidrolizado con *Aspergillus oryzae*.

El extracto enzimático ya cuenta con los requerimientos nutricionales mínimos que permitan el crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii*, por lo que no es necesario adicionar ningún nutriente en esta etapa. Ver reactivos, material y equipo en **sección 3.9.5** y el procedimiento experimental en **Anexo 1, Figura A.8**.

3.10.6. PREPARACIÓN Y CÁLCULO DEL INÓCULO *Lactobacillus delbrueckii*

Llevar una cantidad conocida y necesaria de microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* al biorreactor para que este proporcione la máxima eficiencia de la conversión de azúcares reductores a ácido láctico.

Reactivos

- Solución estandarizada de *Lactobacillus delbrueckii* (**sección 2.5.2**), la solución deberá tener una concentración de 3.1×10^8 UFC/ml.
- Licor de la hidrólisis ácida de **sección 3.9.5**.

Materiales

- Pipeta electrónica, Thermo Scientific Finnpipette Novus 1-10 ml 46200800.

Equipo

- Biorreactor de borosilicato de 500 ml con tres boquillas.
- pHmetro Fisher Scientific, accumet basic AB15 Plus.
- Cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2.

Procedimiento: Preparación y cálculo de inóculo *Lactobacillus delbrueckii* (Anexo 1, Figura A.9)

- I. Colocar 250 ml del licor de la hidrólisis enzimática en el biorreactor.
- II. Inocular, dentro de la cabina de flujo laminar, con la solución estandarizada de microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* al biorreactor al 2% con respecto al volumen del licor puesto en el biorreactor (250 ml); la inoculación sería de 5 ml de la solución estandarizada.

3.10.7. VERIFICACIÓN Y CUMPLIMIENTO DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEL SISTEMA DE BIOTRANSFORMACIÓN

Establecer las condiciones óptimas de funcionamiento del biorreactor y definir los controles fisicoquímicos que se llevarán en el tiempo de fermentación para la obtención de ácido láctico.

Reactivos

- HCl 2 N.
- Solución de CaCO₃ 10% p/v.
- Bicarbonato de sodio.
- Agua destilada estéril.

Materiales

- Tapaderas.
- Mangueras conectoras.
- Cámara de anaerobiosis.
- Agitador magnético.
- Trampa de agua para CO₂.
- Filtro de agua.

Equipo

- Incubadora (Lab Gravity Convection Incubator) Precision Scientific.
- pHmetro Fisher Scientific, accumet basic AB15 Plus.
 - Cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2.
 - Termómetro de mercurio.
 - Bomba de presión de vacío Gast, modelo DOA-P104-AA.

Procedimiento: Verificación y cumplimiento de parámetros de operación del sistema de biotransformación (Anexo 1, Figura A.10)

- I. Trabajar en la cabina de flujo laminar.
- II. Ajustar el pH del biorreactor de 500 ml que contiene el licor de la hidrólisis enzimática con carbonato de calcio a 7.0.

- III. Colocar todos los dispositivos de funcionamiento del biorreactor (cámara ambientadora anaeróbica, filtro de agua, magneto, trampa de agua para CO₂, tapaderas, bomba al vacío y mangueras conectoras).
- IV. Encender la bomba y esperar a generar vacío dentro del biorreactor, cerrar las válvulas, desconectar la bomba y acoplar la trampa de CO₂.
- V. Colocar en la cámara de anaerobiosis 15 g bicarbonato de sodio y 100 ml ácido clorhídrico 2 N, y abrir inmediatamente las válvulas A y B.
- VI. Antes de cerrar las válvulas A y B, cerciorarse que la trampa de CO₂ no siga expulsando gas.
- VII. Desacoplar la cámara ambientadora de CO₂ y filtro de agua.
- VIII. Colocar el biorreactor dentro de la incubadora y la trampa de CO₂, este deberá estar montado sobre un agitador magnético a 120 rpm y a 40 °C.
- IX. Monitorear y muestrear cada 12 horas para cuantificar la formación de ácido láctico y para mantener el pH en óptimas condiciones.
 - a) **Muestreo:** recoger 10 ml de licor del biorreactor.
 - b) **pH:** medir el pH a los 10 ml de muestra y luego ajustar el pH del biorreactor con carbonato de calcio a 7.0.
 - c) **Temperatura:** La temperatura deberá ser constante de 40 °C en la incubadora y dentro del biorreactor.
 - d) **Condiciones anaeróbicas:** después del muestreo utilizar la cámara de anaerobiosis, agregar 15 g de bicarbonato de sodio y 100 ml de HCl 2 N.

3.10.8. CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO PRODUCIDO EN BIORREACTOR

Contabilizar la concentración de ácido láctico contra tiempo producida por el *Lactobacillus delbrueckii*. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, se llevará por triplicado este experimento.

Reactivos

- Ácido sulfúrico 2N.
- Licor de la **sección 3.10.7**.

Materiales

- Balón de 200 ml.
- Filtro de membrana 0.45 µm.

Equipo

- Hot plate (Cimarec stirring hot plate) Barnstead ThermoLyne, modelo SP46920.
- pHmetro Fisher Scientific, accumet basic AB15 Plus.
- Centrífuga Thermo Scientific, Labofuge 200.
- Pipeta monocanal, Thermo electron Finnpipette 100-1000 µL, modelo 4500.

- Pipeta electrónica, Thermo Scientific Finnpipette Novus 1-10 ml 46200800.
- Espectrofotómetro Hach, modelo DR 3900.

**Procedimiento: Cuantificación de ácido láctico producido en el biorreactor
(Anexo 1, A.3)**

- I. Tomar 5 ml de muestra de la **sección 3.10.7**.
- II. Llevar la muestra a baño maría a 75 °C en hot plate por 10 minutos, esto con el fin de pasteurizarla.
- III. Dejar que la muestra llegue a temperatura ambiente.
- IV. Ajustar el pH de la muestra aproximadamente a 3.3 con H₂SO₄ 2N.
- V. Llevar la muestra cuantitativamente a un balón de 200 ml, agregar solución previamente preparada de FeCl₃ (método cloruro férrico, **sección 2.6**) para cuantificar el ácido láctico producido, en una relación de 10 ml de FeCl₃ por cada 100 ml de solución total, se afora con agua destilada.
- VI. Del aforo tomar una alícuota de 10 ml, centrifugarla a 3500 rpm por 15 min.
- VII. Filtrar el sobrenadante a 0.45 µm.
- VIII. Leer absorbancia a una longitud de onda de 435 nm (método cloruro férrico, **sección 2.6**).
- IX. El monitoreo termina cuando ya no hay cambio significativo entre una muestra y otra, las lecturas se realizan cada 12 horas, se deberá hacer lectura de azúcares reductores totales cuando termine el proceso de fermentación láctica (método DNS, **sección 2.6**).

3.10.9. RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA CON *Lactobacillus delbrueckii* A PARTIR DEL LICOR PRODUCIDO POR LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR ACCIÓN MIROBIANA CON *Aspergillus oryzae*

Las muestras tomadas para realizar las mediciones de absorbancia con el método FeCl₃, **sección 2.6**, tuvieron que ser diluidas para que las lecturas se mantuvieran dentro de la curva concentración de ácido láctico vs absorbancia.

Siguiendo los procedimientos descritos en la **sección 3.10.6**, **sección 3.10.7** y **sección 3.10.8**, se presenta en el “**Anexo 3: Resultados de la etapa experimental, Tabla A.7**” los valores de tiempo (en horas, variable independiente), absorbancias y concentración de ácido láctico (en ppm y g/L, variable dependiente).

El porcentaje de inoculación del *Lactobacillus delbrueckii* fue del 2%, teniendo un volumen de licor de 250 ml, entonces la inoculación fue de 5 ml, esta se realizó dentro de una cabina de flujo laminar Labconco, clase II, tipo A2; una vez inoculado se conectaron todos los dispositivos necesarios para crear el ambiente

anaeróbico que necesita este microorganismo para crecer y se llevó a una incubadora (Lab Gravity Convection Incubator) Precision Scientific a 40°C, cada 12 horas se tomaba una muestra de 10 ml de los tres biorreactores, a estas muestras se les tomaba el pH y se llevaba con carbonato de calcio el pH de los tres reactores a 7 (este valor es muy importante, ya que el *Lactobacillus* es muy sensible a ambientes ácidos), una vez terminado el muestreo, se conectaban nuevamente todos los dispositivos para establecer una vez más el ambiente anaeróbico y posteriormente se trasladó el biorreactor a la incubadora.

De cada uno de los tres biorreactores se tomaban 5 ml (a estas alícuotas no se les elevaba el pH a 7), que se llevaron a baño maría (75 °C, 10 minutos), se dejaban enfriar a temperatura ambiente, se ajustaban los pH a 3.3 con ácido sulfúrico 2 N y se transferían cuantitativamente a balones de 200 ml, se adicionó a cada balón una solución previamente preparada de FeCl₃, para realizar la cuantificación de ácido láctico por el método de cloruro férrico, en la relación de 10 ml por cada 100 ml de solución total, es decir que se adicionó en total 20 ml de esta solución a cada balón de 200 ml, posteriormente se aforaba con agua destilada, de esta última solución preparada se tomaba 10 ml que se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos, filtrándose el sobrenadante a 0.45 µm, y se lee absorbancia a 435 nm.

Para encontrar la concentración a partir de la absorbancia leída con el espectrofotómetro Hach, modelo DR 3900, se utilizó la regresión creada por Excel:

$$\text{Absorbancia} = 0.0025 * (\text{concentración, ppm}) + 0.0022$$

Se pudo graficó el tiempo de producción de ácido láctico (horas) vs su concentración (g/L) para cada hora, la ecuación de regresión y trabajo estadístico:

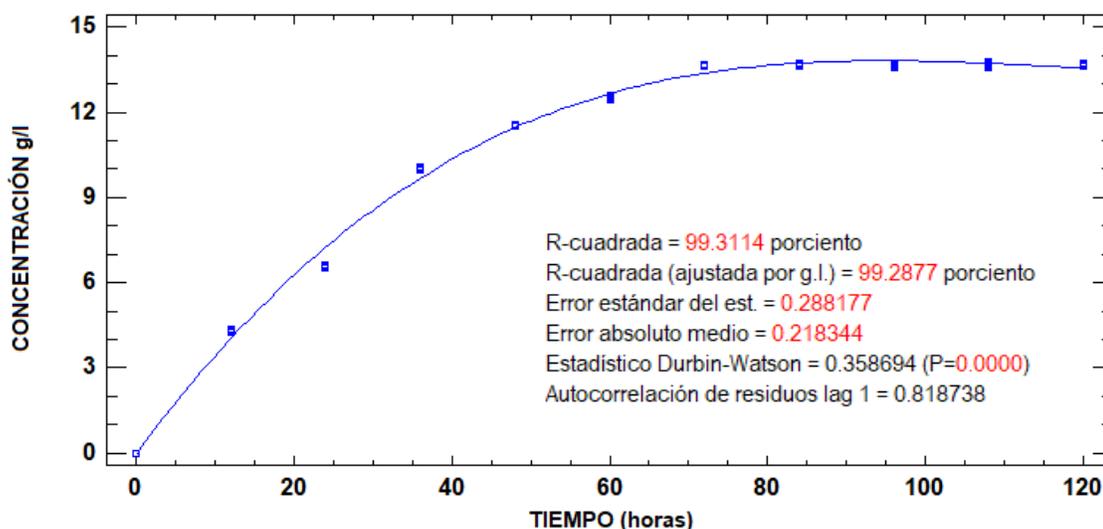


Figura 3.9: Gráfica tiempo (horas) contra concentración de ácido láctico (g/L) producidos por los azúcares provenientes de hidrólisis enzimática con *Aspergillus oryzae*.

$$C = (9.59753E^{-6})t^3 - (3.36618E^{-3})t^2 + 0.379261t - 0.0549765$$

$$R^2 = 0.993114$$

C: Concentración ácido láctico (g/L); t: tiempo (horas)

Tabla 3.17: Análisis de varianza (ANOVA) de fermentación láctica de la hidrólisis enzimática.

		<i>Error</i>		<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>		<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	-0.0549765	0.156531		-0.351219	0.7263
TIEMPO	0.379261	0.0100325		37.8033	0.0000
TIEMPO^2	-0.00336618	0.000177062		-19.0114	0.0000
TIEMPO^3	0.00000959753	9.0204E-7		10.6397	0.0000
Análisis de Varianza					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1012.05	3	347.349	4182.61	0.0000
Residual	7.225	87	0.0830459		
Total (corr)	1049.27	90			

Puesto que el valor-P en la **tabla 3.17** es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Concentración y Tiempo con un nivel de confianza del 95%. En vista de que sí se pudo comprobar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre concentración y tiempo con todos los datos obtenidos de la fermentación láctica a partir del licor creado por la hidrólisis enzimática por acción microbiana de la cáscara de plátano verde, se procedió a verificar en qué tiempo la concentración de ácido láctico se encuentra en su máximo punto, esto a través de la primera derivada de la ecuación generada es:

$$C' = 2.879259E - 5t^2 - 0.00673236t + 0.379261$$

Igualando la primera derivada a cero, se obtienen los máximos y mínimos de la regresión para la fermentación láctica a partir del licor generado por hidrólisis química de la cáscara de plátano verde.

$$t_1 = 94.6384 \text{ horas} \quad t_2 = 139.184 \text{ horas}$$

Los dos valores (t_1 y t_2) pueden ser tomados, ya que son reales, pero si se toma en cuenta la tendencia de la curva, esta nos indica que no existirá tanta diferencia entre estos dos tiempos para la concentración de ácido láctico generado, lo que sí cuenta son las horas extra invertidas de un tiempo a otro, aun así se resolverá la ecuación de regresión de concentración de ácido láctico vs horas.

La concentración de ácido láctico para las 94 y 139 horas (valores teóricos a partir de la regresión) es entonces, respectivamente:

$$C_{94 \text{ horas}} = 13.8235 \text{ g/l} \quad C_{139 \text{ horas}} = 13.3996 \text{ g/l}$$

La concentración de ácido láctico promedio para las 96 horas (valor que se obtuvo en el trabajo de laboratorio, ver **Anexo 3, Tabla A.7**) es:

$$C_{96 \text{ horas}} = 13.6710 \text{ g/l}$$

3.10.10. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL BIORREACTOR

- I. Calcular el rendimiento del biorreactor para la etapa de hidrólisis enzimática por acción microbiana con *Aspergillus oryzae*, utilizando los datos de los muestreos donde la concentración obtenida de azúcares reductores es máxima (ver **sección 4.1.3**).
- II. Calcular el rendimiento del biorreactor para la etapa de fermentación láctica utilizando los datos de los muestreos donde la concentración obtenida de ácido láctico es máxima (ver **sección 4.1.4**).

CAPÍTULO IV.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En el presente capítulo se detallarán los rendimientos de los resultados obtenidos derivados de la ejecución de los procedimientos de la etapa experimental de la investigación, basados en las metodologías detalladas en el capítulo dos del presente trabajo de graduación. El análisis de los resultados será detallado posterior al desarrollo de los cálculos de los rendimientos.

4.1. RENDIMIENTO DEL BIORREACTOR EN LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y COMPARACIÓN ENTRE AMBOS PROCESOS

Se procede a calcular los rendimientos generados en la conversión de ambos tipos de hidrólisis y la fermentación láctica del trabajo de investigación.

4.1.1. RENDIMIENTO HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

De acuerdo a los valores obtenidos en la **sección 3.9.3** detallados en el **Anexo 3: Resultados de etapa experimental, Tabla A.4**, se obtiene:

- ✓ Rendimiento de hidrólisis ácida:

$$R_{hidrólisis} = \frac{\frac{g/l \text{ Azúcares reductores}_{m\acute{a}ximo}}{g/l \text{ Azúcares no reductores}}}{\frac{32.14 \text{ g/l}}{(90.7882 \text{ g cáscara} * 0.36/l)}} = 0.9834 \frac{g \text{ azúcares reductores}}{g \text{ azúcares no reductores}}$$

- ✓ Rendimiento del proceso:

$$R_{proceso} = \frac{\frac{g/l \text{ Azúcares reductores}_{m\acute{a}ximo}}{g/l \text{ cáscara de plátano}}}{\frac{32.14 \text{ g/l}}{90.7882 \text{ g cáscara/l}}} = 0.3540 \frac{g \text{ azúcares reductores}}{g \text{ cáscara de plátano}}$$

4.1.2. RENDIMIENTO DE FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL LICOR CREADO A PARTIR DE HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

De acuerdo a los valores obtenidos en la **sección 3.9.9** “detallados en el **Anexo 3: Resultados de la etapa experimental, Tabla A.5**, se obtiene:

- ✓ Rendimiento fermentación láctica:

$$R_{fermentación} = \frac{\frac{g/l \text{ ácido láctico}}{g/l \text{ Azúcares no reductores}_{m\acute{a}ximo}}}{\frac{22.7008 \text{ g/l}}{32.14 \text{ g/l}}} = 0.7063 \frac{g \text{ ácido láctico}}{g \text{ azúcares no reductores}}$$

- ✓ Rendimiento global del proceso:

$$R_{global} = \frac{g/l \text{ ácido láctico}}{g/l \text{ cáscara de plátano}}$$

$$R_{global} = \frac{22.7008 \frac{g}{l}}{90.7882 g \frac{cáscara}{l}} = 0.2500 \frac{g \text{ ácido láctico}}{g \text{ cáscara de plátano}}$$

4.1.3. RENDIMIENTO HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR ACCIÓN MICROBIANA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

NOTA: Para estos rendimientos se debe tener en cuenta que los gramos de cáscara total ocupados son los de los 41 Erlenmeyer (para realizar el extracto enzimático) y los gramos pesados para ser hidrolizados por el extracto (cáscara hidrolizada).

De acuerdo a los valores obtenidos en la **sección 3.10.4** detallados en el **Anexo 3: Resultados de la etapa experimental, Tabla A.6**, se obtiene:

- ✓ Rendimiento de hidrólisis enzimática por acción microbiana:

$$R_{hidrólisis} = \frac{g/l \text{ Azúcares reductores hidrolizados}_{máximo}}{g/l \text{ Azúcares no reductores}}$$

$$R_{hidrólisis} = \frac{25.233 g/l}{25 g/l} = 1.0093 \frac{g \text{ azúcares reductores hidrolizados}}{g \text{ azúcares no reductores}}$$

- ✓ Rendimiento del proceso:

$$R_{proceso} = \frac{g/l \text{ Azúcares reductores}_{máximo}}{g/l \text{ cáscara hidrolizada}}$$

$$R_{proceso} = \frac{25.233 g/l}{55.56 g/0.8 l} = 0.3633 \frac{g \text{ azúcares reductores}}{g \text{ cáscara hidrolizada}}$$

- ✓ Rendimiento total:

$$R_{total} = \frac{g/l \text{ Azúcares reductores}_{máximo}}{g/l \text{ cáscara de plátano verde ocupada}}$$

$$R_{total} = \frac{25.233 g/l}{(160 g + 55.56 g)/0.8 l} = 0.1171 \frac{g \text{ azúcares reductores}}{g \text{ cáscara de plátano}}$$

4.1.4. RENDIMIENTO DE FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL LICOR CREADO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CÁSCARA DE PLÁTANO

NOTA: La misma consideración de la nota de la sección 4.1.

De acuerdo a los valores obtenidos en la **sección 3.10.9** se detallan en el **Anexo 3: Resultados de la etapa experimental, Tabla A.7**, se obtiene:

- ✓ Rendimiento fermentación láctica:

$$R_{fermentación} = \frac{g/l \text{ ácido láctico}}{g/l \text{ Azúcares no reductores}_{máximo}}$$

$$R_{fermentación} = \frac{13.6710 \text{ g/l}}{25.233 \text{ g/l}} = 0.5418 \frac{g \text{ ácido láctico}}{g \text{ azúcares no reductores}}$$

- ✓ Rendimiento global del proceso:

$$R_{global} = \frac{g/l \text{ ácido láctico}}{g/l \text{ cáscara hidrolizada}} = \frac{13.6710 \text{ g/l}}{55.56 \text{ g}/0.8 \text{ l}} = 0.1968 \frac{g \text{ ácido láctico}}{g \text{ cáscara hidrolizada}}$$

- ✓ Rendimiento total:

$$R_{global} = \frac{g/l \text{ ácido láctico}}{g/l \text{ cáscara de plátano total ocupada}}$$

$$R_{global} = \frac{13.6710 \text{ g/l}}{(160 \text{ g} + 55.56 \text{ g})/0.8 \text{ l}} = 0.0507 \frac{g \text{ ácido láctico}}{g \text{ cáscara de plátano}}$$

4.2. AZÚCARES NO FERMENTADOS EN PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Se presenta a continuación las lecturas finales de las absorbancias para azúcares no fermentados en los dos procesos de producción de ácido láctico:

Tabla 4.1: Azúcar no fermentada en la producción de ácido láctico de hidrólisis ácida.

N° de tubo	Promedio absorbancia de azúcar no fermentada	Concentración de azúcar no fermentada en licor (ppm)	Azúcar reductor del licor en la muestra (g)	Concentración de azúcar reductor del licor (g/L)
Reactor 1	0.024	48.88	0.0098	3.91
Reactor 2	0.017	40.13	0.0080	3.21
Reactor 3	0.013	35.13	0.0070	2.81
Promedio		41.38	0.01	3.31

Tabla 4.2: Azúcar no fermentada en la producción de ácido láctico de hidrólisis enzimática.

N° de tubo	Promedio absorbancia de azúcar no fermentada	Concentración de azúcar no fermentada en licor (ppm)	Azúcar reductor del licor en la muestra (g)	Concentración de azúcar reductor del licor (g/L)
Reactor 1	0.103	147.63	0.0295	11.81
Reactor 2	0.098	141.38	0.0283	11.31
Reactor 3	0.110	156.38	0.0313	12.51
Promedio		148.46	0.03	11.88

4.3. ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Se presenta a continuación la tabla resumen de rendimientos de procesos (ver unidades en **sección 4.1**):

Tabla 4.3: Rendimientos de los procesos investigados.

	R _{hidrólisis}	R _{proceso}	R _{Fermentación}	R _{Global}	R _{Total}
Hidrólisis ácida	0.9834	0.3540	N/A	N/A	0.3540
Fermentación láctica después hidrólisis ácida	N/A	N/A	0.7063	0.2500	0.2500
Hidrólisis enzimática	1.0093	0.3633	N/A	N/A	0.1171
Fermentación láctica después hidrólisis enzimática	N/A	N/A	0.5418	0.1968	0.0507

- I. A partir de los resultados obtenidos del proceso de producción de ácido láctico mediante la cáscara de plátano por hidrólisis química y fermentación anaeróbica con *Lactobacillus delbrueckii* se puede determinar lo siguiente:
 - a. En la hidrólisis química, el tiempo donde mayor azúcares reductores se obtienen a nivel de laboratorio es de 15 minutos, después de ese tiempo (20 minutos) los azucare reductores hidrolizados inician un proceso de degradación y en la Figura 4.7 se puede observar una disminución.
 - b. En la fermentación láctica a partir de la hidrolisis química el tiempo donde alcanza su mayor producción es a las 132 horas, después de este tiempo la producción de ácido láctico se detiene.
 - c. Valorando la propuesta del “proceso de producción de ácido láctico a partir de la cáscara de plátano por hidrólisis química y fermentación anaeróbica con *lactobacillus delbrueckii*” a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio se puede concluir para una futura industrialización basado en su rendimiento global que es mayor al del “proceso de producción de ácido láctico a partir de la cáscara de plátano mediante hidrólisis enzimática por acción microbiana del *Aspergillus oryzae* y fermentación anaeróbica con *Lactobacillus delbrueckii*”
- II. La identificación de los nutrientes de la cáscara de plátano en cada proceso es de vital importancia para saber cuáles son las fortificaciones nutricionales que se deberán hacer para que los microorganismo puedan hacer las transformaciones metabólicas eficientemente para la producción de ácido láctico en el trayecto fermentativo.

CONCLUSIONES

1. La ventaja que se tiene de usar cáscara de plátano como materia prima para la producción de ácido láctico está en su composición, ya que es rica en compuestos básicos y necesarios para el crecimiento del *Aspergillus oryzae* y del *Lactobacillus delbrueckii*, logrando así que la cantidad de elementos para enriquecer el sustrato sean mínimos (extracto de levadura, sulfato de manganeso, fosfato de sodio, cloruro de sodio).
2. Se trabajaron dos sistemas de transformación, cada uno de estos contaba con dos etapas: la hidrólisis del almidón de la cáscara de plátano y la fermentación láctica de los azúcares reductores creados por esas hidrólisis. El primer sistema contaba con una hidrólisis química de la cáscara en la cual se obtuvo una concentración de azúcares reductores de 32.14 g/L y al fermentarlos se obtiene una concentración de ácido láctico de 22.70 g/L. El segundo sistema contaba con una hidrólisis enzimática con *Aspergillus oryzae* de la cáscara en la cual se obtuvo una concentración de azúcares reductores de 25.23 g/L y al fermentarlos se obtiene una concentración de ácido láctico de 13.67 g/L.
3. Para producir aproximadamente 20 ml de extracto enzimático del *Aspergillus oryzae* que sea capaz de hidrolizar 0.6246 g de almidón de la cáscara de plátano (1.735 g de cáscara de plátano al 36% p/p de almidón), se necesita un área del biorreactor de 46.57 cm² y un espesor de sustrato de 0.5 cm para la inoculación en estado sólido del *Aspergillus oryzae*; dando una relación de 1 g de azúcar hidrolizada por 74.56 cm² de área. Para llevar este proceso a escala industrial se presentaría la limitante de la capacidad instalada y los costos generados para cumplir condiciones de incubación (32 °C, 70% H).
4. En los dos sistemas creados para elaborar ácido láctico a partir de cáscaras de plátano verde, se pudo obtener este producto, pero con diferentes concentraciones, rendimientos, tiempos de producción y costos. Para el primer sistema los rendimientos en base a masa de plátano total ocupada fueron: hidrólisis del almidón de la cáscara con ácido sulfúrico 5% p/v de $0.354 \frac{\text{g azúcares reductores}}{\text{g cáscara de plátano}}$ y fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii* de $0.250 \frac{\text{g ácido láctico}}{\text{g cáscara de plátano}}$; para el segundo sistema los rendimientos en base a masa de plátano total ocupada fueron: hidrólisis enzimática por acción

microbiana del almidón del *Aspergillus oryzae* de $0.1171 \frac{\text{g azúcares reductores}}{\text{g cáscara de plátano}}$ y fermentación láctica con *Lactobacillus delbrueckii* de $0.0507 \frac{\text{g ácido láctico}}{\text{g cáscara de plátano}}$

5. El bajo rendimiento global que se obtuvo del proceso de “Hidrólisis Enzimática-Fermentación Láctica” comparado con “Hidrólisis Ácida-Fermentación Láctica” pueda ser por la calidad de azúcares reductores obtenidos del almidón de la cáscara (entre mayor cantidad de glucosa obtenida mayor rendimiento en la fermentación láctica); en la hidrólisis enzimática se obtiene una variedad de azúcares reductores tales como glucosa, maltosas y dextrinas; en la hidrólisis ácida se obtiene en su mayoría de azúcares reductores como glucosa.
6. La concentración de azúcares totales en la cáscara de plátano varía con respecto al grado de maduración de este, la concentración va disminuyendo en la cáscara en la medida que el proceso de maduración del fruto va en aumento, esto es debido a que se extraen azúcares reductores de la cáscara para luego ser incorporadas al fruto, por lo que al utilizar cáscara de plátano verde se cuenta con una mayor cantidad de azúcares para ser aprovechadas en el proceso de producción de ácido láctico y también se asegura trabajar con un residuo agroindustrial (siendo este fruto en estado verde el más utilizado dentro de la industria alimenticia) que no afectará a la seguridad alimentaria.
7. En base a los datos de producción de la empresa seleccionada del uso del plátano verde como materia prima (2,180 kg/mes), se tendría una disponibilidad de cáscara de plátano de 51.2406 kg/mes como materia prima para la producción de ácido láctico, dando una producción mensual de:
 - a. Método de hidrólisis ácida y fermentación láctica: 12.8102 kg/mes de ácido láctico.
 - b. Método de hidrólisis enzimática por acción microbiana y fermentación láctica: 2.5979 kg/mes de ácido láctico.

Los valores de producción de ácido láctico establecidos en los literales anteriores podría incrementar: si se contara con más residuos de cáscara de plátano verde de otras industrias alimenticias, incrementando los valores de concentración de azúcares reductores de 32 g/L (valor máximo alcanzado en el laboratorio) a 100 g/L (valor óptimo acorde a investigaciones bibliográficas) en el licor previo a la fermentación láctica.

OBSERVACIONES

1. El potencial que tiene la cáscara de plátano para ser aprovechado como materia prima en diversas industrias (alimento para ganado, abono, fuente de energía, producción de alcohol, producción de papel, plástico, industria de jabones, industria farmacéutica, industria alimentaria, etc.) es creciente, derivado de la cantidad de producción nacional del fruto y las importaciones que tienen una tendencia en aumento respecto a los años, lo que deja una mayor disponibilidad de este residuo alimenticio para su explotación.
2. Los rendimientos de producción de ácido láctico a partir de la cáscara verde de plátano se hubieran mejorado si:
 - a. Se hubiera contado con los equipos necesarios en el laboratorio para elevar la concentración de azúcares reductores de 32 g/L a 100 g/L previo a la fermentación láctica, como un evaporador rotario al vacío.
 - b. La fibra de la cáscara de plátano verde hubiese sido removida por métodos mecánicos (equipos especiales de micro filtración en el laboratorio con bombas de impulsión) previo a las hidrolisis, ya que la fibra afecta el manejo de la muestra haciendo de esta un líquido muy viscoso, por lo tanto se manejó a concentraciones bajas de azúcares totales de 32 g/L.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar investigaciones específicas orientadas a mejorar el rendimiento y la optimización de los procesos en la obtención de ácido láctico haciendo que las variables fijas sean las variables de investigación, siempre y cuando se garanticen las condiciones de trabajo de los microorganismos, con el objetivo de alcanzar un máximo de rendimiento global para hacer rentable la industrialización de este producto a partir del residuo del fruto del plátano, **las variables de estudio sugeridas son:**
 - a. Más de 90.79 g/L de cáscara de plátano verde.
 - b. Basado en el volumen del reactor que se seleccione: el inóculo de *Aspergillus oryzae* menor al 10% p/v y del *Lactobacillus delbrueckii* mayor al 2% v/v (concentración de inóculo vs rendimiento).
 - c. Una opción de microorganismos fermentadores lácticos es *Rhizopus oryzae* y otros microorganismos del genero *Lactobacillus*.
 - d. Una cantidad de extracto levadura mayor a 14 g/L.
 - e. Realizar pruebas de escalamiento del proceso ensayado a nivel de laboratorio, con los resultados de la optimización de la concentración inicial de azúcares reductores en el sustrato.
2. De utilizarse en futuras investigaciones con los sistemas de transformación que fueron empleados en el presente trabajo de graduación, se recomienda encontrar una fuente de abastecimiento de cáscara de plátano que no posea un tratamiento preliminar de baño térmico con CaCO_3 debido a que los carbohidratos son diluidos en él y se pierde una cantidad considerable que podría ser aprovechado por los sistemas de transformación.
3. En investigaciones bibliográficas consultadas se establece que al alcanzar rendimientos óptimos de producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus delbrueckii* a una concentración de azúcares reductores de 100 g/L, se recomienda idear un mecanismo para procesar el sustrato y que permita alcanzar la concentración planteada de azúcares reductores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aidoo, K., Hendry, R., Wood, B. (1982). Solid substrate fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.*, 28:201-38.
2. Akerberg, C.; Hofvendahl, L; Zacchi, G. (1998). Modelling the influence of pH, temperatura, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis ss lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 682-690.
3. Barragán, A., Domínguez, P., Hernández, J. (2012). Bioplásticos a partir del almidón de cáscara de banano: una alternativa novedosa y ecológica a los plásticos convencionales. *Publicaciones DYNA*, N° 69-4º-48009. España.
4. Barrientos, L.E. (2016). Obtención de bioetanol a base de la cáscara del plátano. Universidad Tecnológica del Sureste de Veracruz, México.
5. Bernard, P. (1842) *Le jardin des plantes: Description complète, historique et pittoresque du Muséum d'histoire naturelle, de la ménagerie, des serres, des galeries de minéralogie et d'anatomie, et de la vallée suisse.* Muséum D'Histoire Naturelle, De La Ménageire, Paris, France.
6. Bulut, S.; Elibol, M.; Ozer, D. (2004). Effect of different carbón source on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal* 21, 33/37.
7. Casablanca, E., Manríquez, N., Álvarez, M., Terrazas, E. (2009). Optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas con cepas bacterianas encapsuladas y libres. *BIOFARBO* 17(2) 2009 51-59.
8. (CAR/PL) Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia (2003). *Aplicaciones de la Biotecnología en la industria.* Barcelona, España.
9. Claassen, P., Van, J., López, A., Van, E., Sijtsma. L., Stams, A., de Vries, S., Weusthuis, R. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 741-755.
10. Cobeño Fariñas, L., Cobeño Fariñas, L. (2011). Identificación de la quinasa HalA y el estudio de su papel en la regulación de la homeostasis de cationes en «*Aspergillus nidulans*». Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, Madrid.
11. Conalepfelixtovar (2012). Cultivo industrial de microorganismos: tipos de cultivo. Recuperado el 4 de agosto de 2017 de:
<https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/10/31/cultivo-industrial-de-microorganismos-tipos-de-cultivo/>.

12. Cristancho, L., Monroy, R. (2014). Manual de métodos generales para la determinación de carbohidratos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Colombia.
13. Dong-Mei Bai, Min-Ze Jia, Xue-Ming Zhao, Rui Ban, Fei Shen, Xin-Gang Li, Shi-Min Xu. 2003. L (+) lactic acid production García - Ácido láctico por vía biotecnológica 20 by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical Engineering Science* 58 (3-6): 785-791.
14. Duque, S. (2014). Evaluación y simulación de la producción de glucosa a partir del plátano y sus residuos como alternativa competitiva en el mercado nacional. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales.
15. Ellaiah P, Adinarayana K, Bhavani Y, Padmaja P and Srinivasula B (2002) Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*, 38: 615–620.
16. 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.
17. Fausto, F; Díaz, D. (1997). Starch and starch derivatives in India. *Starch/Starke*, 49 (9), 1997, p. 338-340.
18. (FAO) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2004). Año Internacional del Arroz: el arroz es vida. FAO Food and Nutrition Division, Vialle delle Terme di Caracalla, Rome, Italy.
19. Galbe M., Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 618-628.
20. García, C., Arrázola, G., Durango, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas agrarios-volumen 15: (2) Julio-Diciembre 2010 (9-26)*.
21. Geissman, T. (1974). *Principios de Química Orgánica*. California, EEUU: Editorial Reverté, S.A.
22. Gil, R., Domínguez, R., & Pacho, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnología y Ciencia Ed. (IMIQ)*, vol. 23 núm.2.
23. Grand View Research, Inc. (2017). *Lactic Acid Market Analysis By Application (Industrial, F&B, Pharmaceuticals, Personal Care) & Polylactic Acid (PLA) Market Analysis By Application (Packaging, Agriculture, Transport, Electronics, Textiles), And Segment Forecasts, 2014 - 2025*. Grand View Research, Inc.

24. Hébert, E., Raya, R., Savoy, G. (2004). Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a Chemically Defined Medium. *Current microbiology*. Vol. 49 (2004), pp. 341-345.
25. Hernández, A. (2003). Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays*) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Volumen 5, Número 1: 45-55.
26. Herrera, A., Meers, R. (2013). Diseño de las etapas de hidrólisis de almidón y fermentación para producir bioetanol basado en la respuesta dinámica del sistema. Universidad de Cartagena.
27. Hesseltine, C. (1972). Solid state fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 14:517-32.
28. Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, February 1; 26 (2-4), 87-107.
29. Hoover, R. (2000). Acid treated starches. *Food Rev. Int.*, 16(3), 369–392.
30. (INI) Instituto Nacional de Normalización (1978). Determinación de humedad: NCH 841 OF78. Centro de Formación Técnica San Agustín de Talca, Chile.
31. Kainuma, K., French, D. (1971). *Biopolymers*, 10, 1673.
32. Komesu, A. (2017). Lactic Acid Production to Purification: A Review. *BioResources*, North Carolina State University.
33. Kumar, P., Lonsane, B., (1987). Gibberellic acid by solid state fermentation: Consistent and improve yields. *Biotechnol. Bioeng.*, 30:267-71.
34. Lavanya, K.; Abi Beulah, G.; Vani, G. (2016). *Musa paradisiaca*- A review on phytochemistry and pharmacology. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 2016, 2(6), 163-173.
35. Lonsane, B., Ghildyal, N., Budiartman, S., Ramakrishna, S. (1985). Aspects of Engineering of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 7:258-65.
36. Melo, D., Torres, Y., Serna, J.A., Torres, L. (2015). Aprovechamiento de pulpa y cáscara de plátano (*Musa paradisiaca* ssp) para la obtención de maltodextrina. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Volumen 13, # 2 (76-85).
37. Morales, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Tesis Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Madrid.
38. Moreira, K. (2013). Reutilización de residuos de la cáscara de bananos (*MUSA PARADISIACA*) y plátanos (*MUSA SAPIENTUM*) para la producción de alimentos destinados al consumo humano. Universidad de Guayaquil.

39. Oliva, J. (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense de Madrid.
40. (OMS) Organización Mundial de la Salud (2013). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Washington D.C., 2012.
41. Pacios, A., Cruz, Y., Bell, A., Carrera, E., Michalena, G. (2009). Síntesis y caracterización del lactato ferroso para fortificación de alimentos infantiles. *Redalyc*, XLIII(1), 36-43.
42. Pastrana, L. (1996). Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1:3, 4-12. Recuperado el 13 de julio de 2017 de:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358129609487556>
43. Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (2002). *Microbiología*. The McGraw-Hill Companies, Inc., España.
44. Rao, P., Jayaraman, K., Lakshmanan, C., (1993). Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 1: Determination of significant process variables. *Process Biochem.*, 28 (6): 385-90.
45. (RTCA) Reglamento Técnico Centroamericano (2009). Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. Consejo de Ministros de Integración Económica Centroamericana (COMIECO).
46. (RTCA) Reglamento Técnico Centroamericano (2009). Productos farmacéuticos, medicamentos de uso humano, buenas prácticas de manufactura para la industria farmacéutica. Consejo de Ministros de Integración Económica Centroamericana (COMIECO).
47. Samaniego, L., Sosa, M. (2000). *Lactobacillus spp.: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria.
48. Sánchez, O., Cardona, C. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30(11), 671-678. Recuperado en 28 de abril de 2017, de:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001100005&lng=es&tlng=es.
49. Sánchez, S (2017). Protocolo de fermentación para producción de Koji. Recuperado el 11 de noviembre de 2017 de:
<http://www.bculinarylab.com/2017/05/07/protocolo-de-fermentacion-para-produccion-de-koji/>.

50. Serna-Cock, L., Rodríguez-de Stouvenel, A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Volumen 5, Número 1, 54-65.
51. Sierra, C., Resa, P., Buckin, V., Elvira, L. (2012). Monitoring of Soluble Starch Hydrolysis Induced by α -amylase from *Aspergillus oryzae* Using Ultrasonic Spectroscopy. *International Congress on Ultrasonics*.
52. Southgate, D.A.T. (1991) *Determination of Food Carbohydrates*. United States, Elsevier Applied Science; 2 Sub edition (1709).
53. Statgraphics Centurion (XVI) [Software] (2010). Recuperado de <https://www.statgraphics.net/descargas/>
54. Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.
55. Torrado, A., Gonzalez, M., Murado, M., Montemayor, M., Miron, J., Pastrana, L., Pintado, J. (1993). Control del pH en cultivo en estado sólido para la producción de amilasas. *Actas del XVIII Congreso Nacional de Bioquímica*, San Sebastian. Pág. 173.
56. (USAC) Universidad de San Carlos (2005). Polisacáridos. Recuperado el 2 de octubre de 2017 del Portal Químico de Facultad de Ciencias Médicas de: http://medicina.usac.edu.gt/quimica/biomol2/carbohidratos/Polisac_ridos.htm
57. (USDA) Departamento de Agricultura de Estados Unidos, (IICA) Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (2016). Oportunidades y desafíos comerciales para la cadena productiva de plátano en El Salvador, en el marco del acuerdo comercial con los Estados Unidos. San José, Costa Rica (USDA:IICA).
58. Villa-Vélez, H., Carvalho, G., Telis-Romero, J. (2012). Determinación de las mejores condiciones de hidrólisis ácida de la cáscara del plátano. *Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista*.
59. Wang, M., Xu, Z., Qiu, T., Sun, X., Han, M. (2010). Kinetics of Lactic Acid Fermentation on Food Waste by *Lactobacillus bulgaricus*. *Trans Tech Publications, Switzerland*.
60. Welman, A.D. (2006). Metabolism associated with raised metabolic flux to sugar nucleotide precursors of exopolysaccharides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2006) 33: 391-400.
61. Zao, G. (2015). Transcriptome and Proteome Expression Analysis of the Metabolism of Amino Acids by the Fungus *Aspergillus oryzae* in Fermented Soy Sauce. *Tianjin University of Science and Technology*.

ANEXOS

ANEXO 1: Procedimientos de la etapa experimental de la investigación.

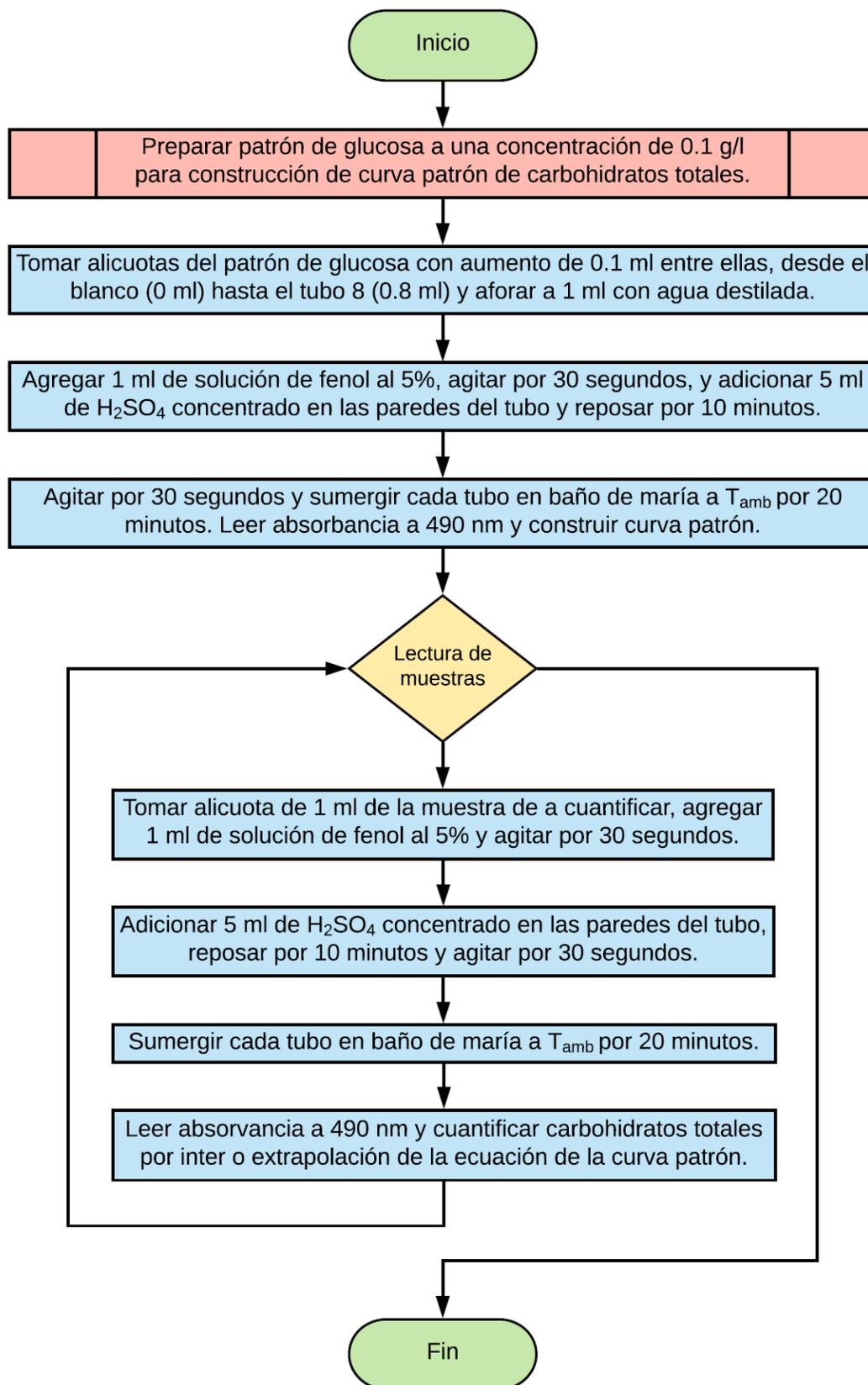


Figura A.1: Procedimiento de determinación de carbohidratos totales (Método fenol-sulfúrico).

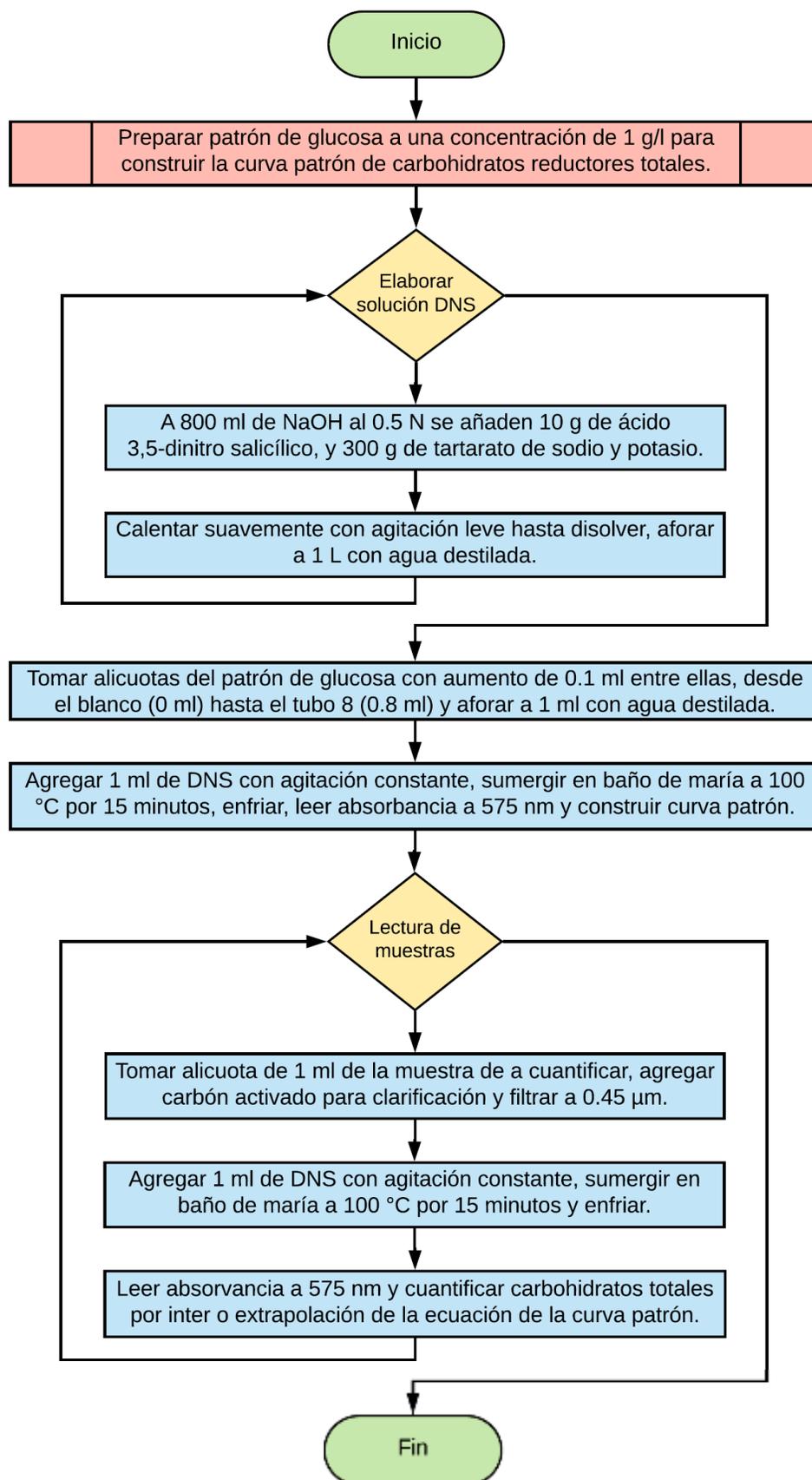


Figura A.2: Procedimiento de determinación de carbohidratos reductores totales (Método DNS).

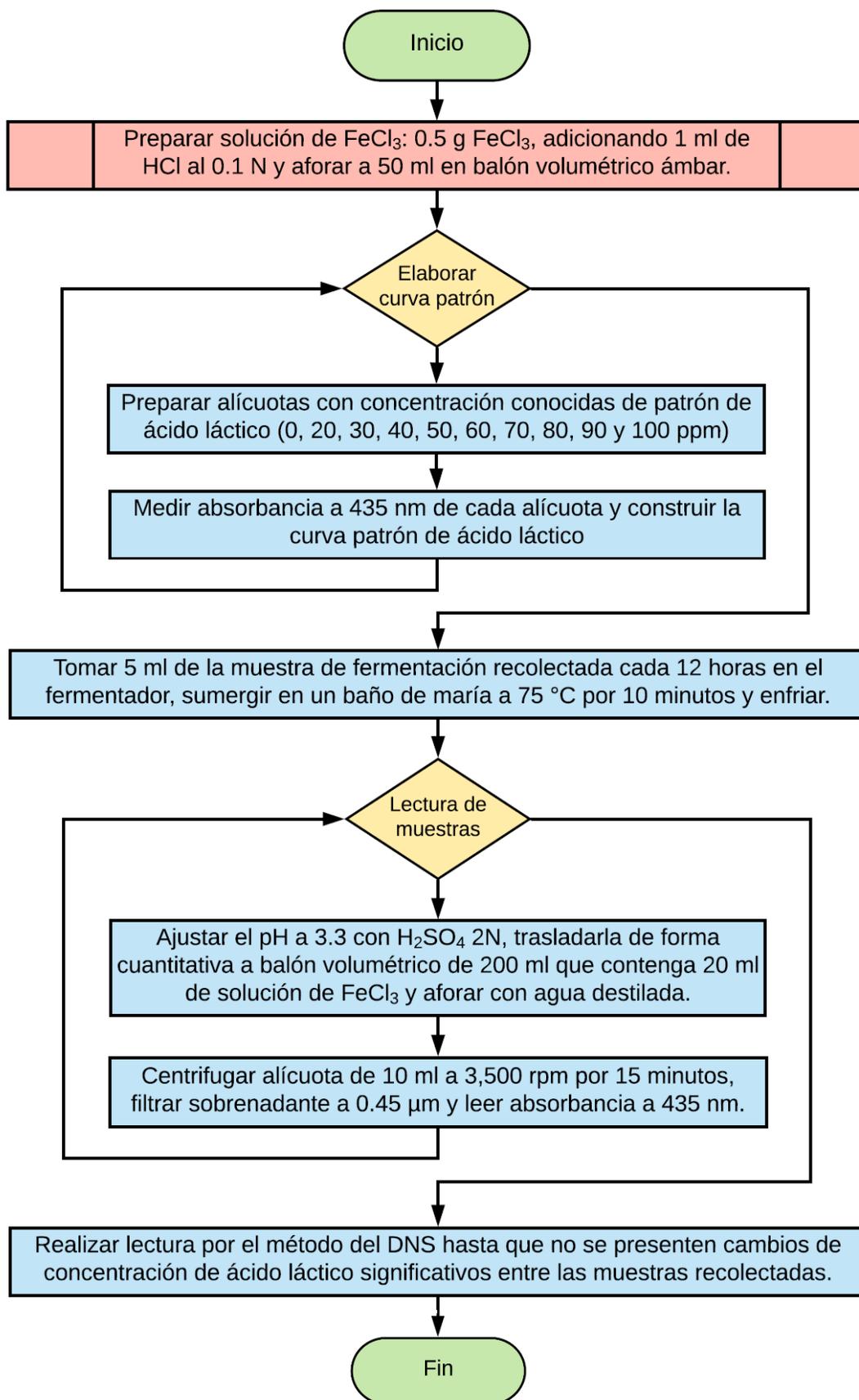


Figura A.3: Procedimiento de cuantificación de ácido láctico producido en el biorreactor.

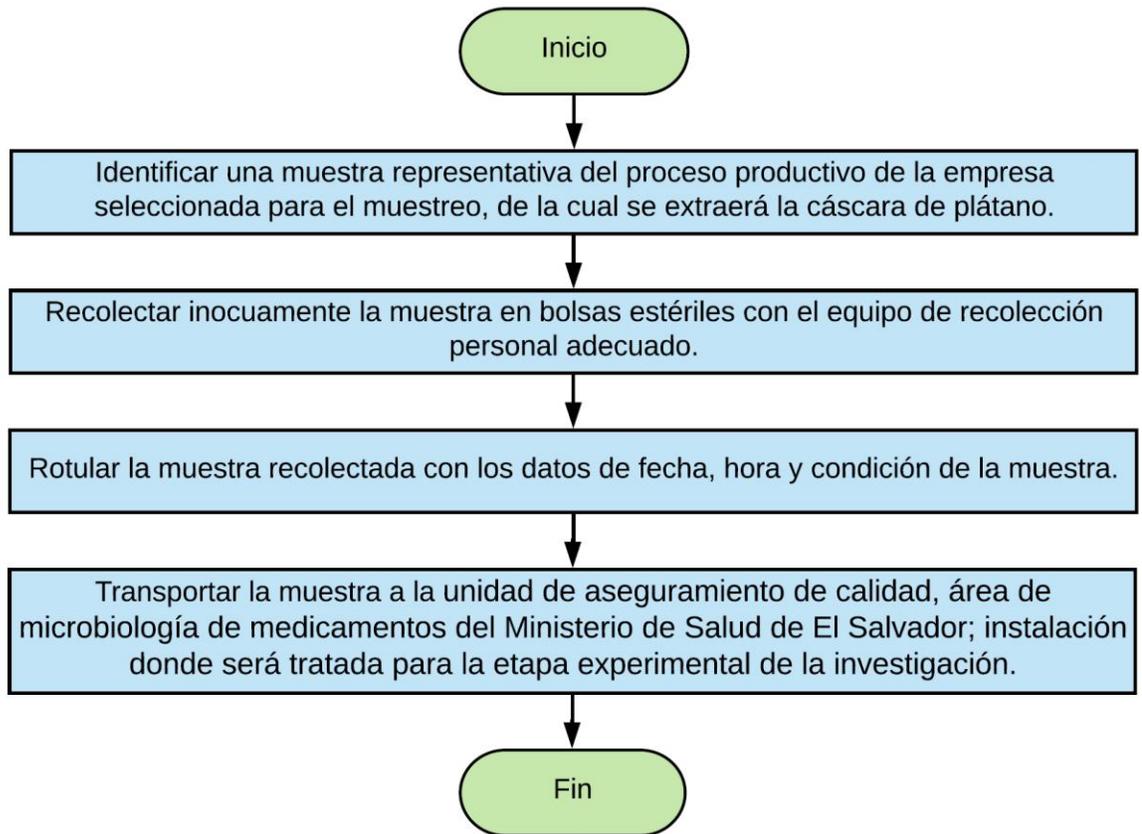


Figura A.4: Procedimiento de recolección de la cáscara de plátano.

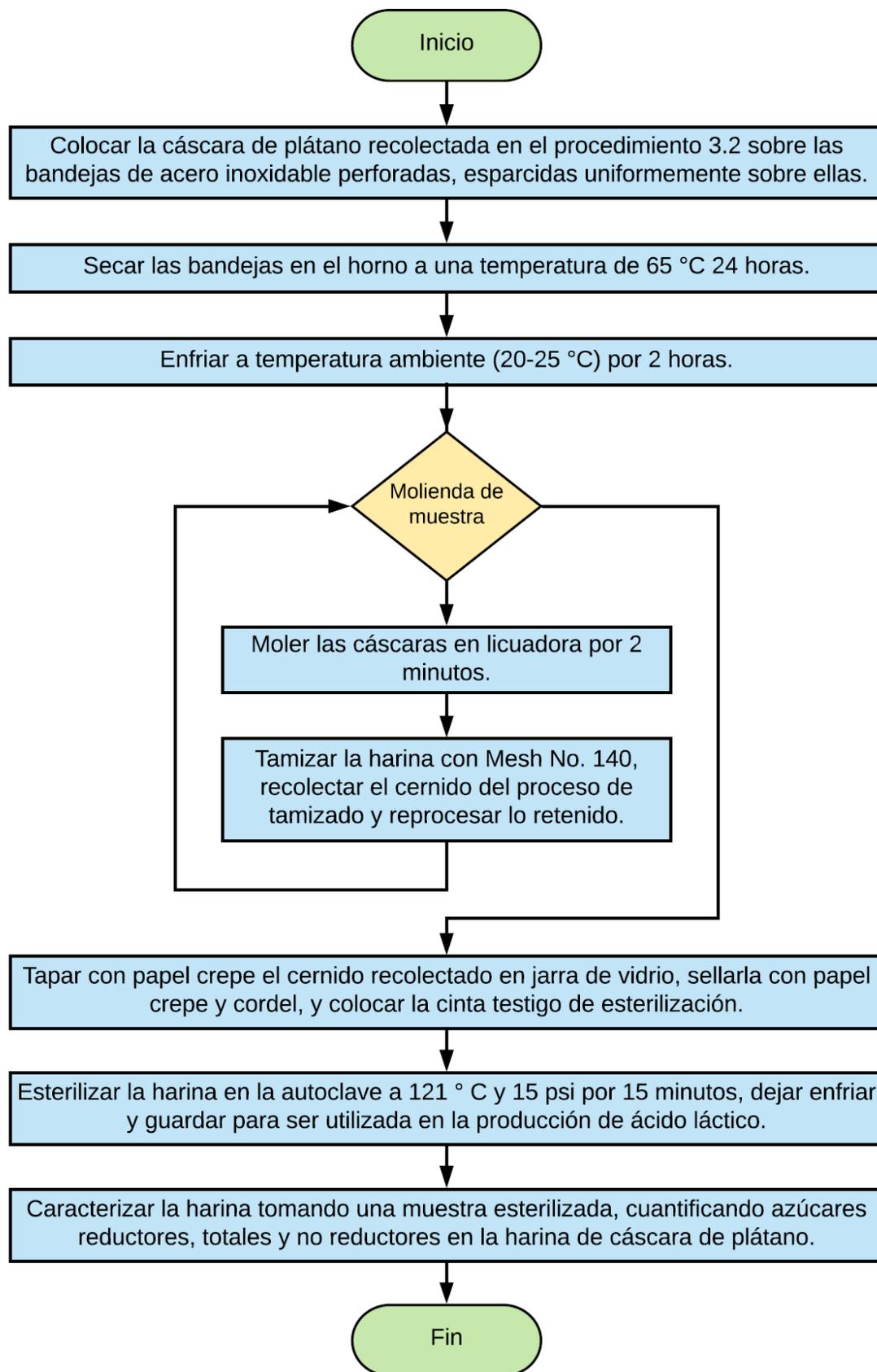


Figura A.5: Procedimiento de tratamiento preliminar de la cáscara de plátano.

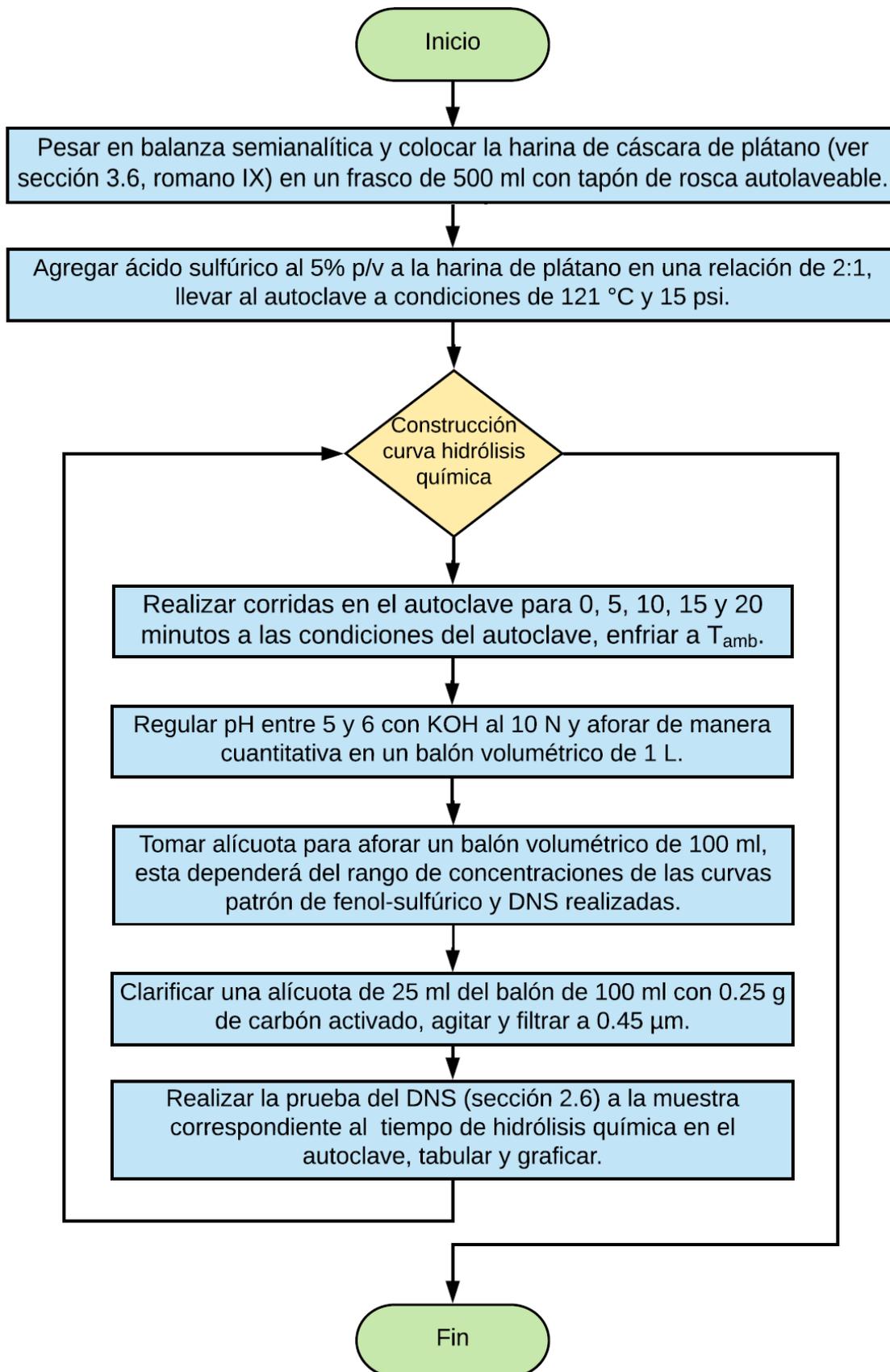


Figura A.6: Procedimiento para la construcción de la curva de la hidrólisis química.

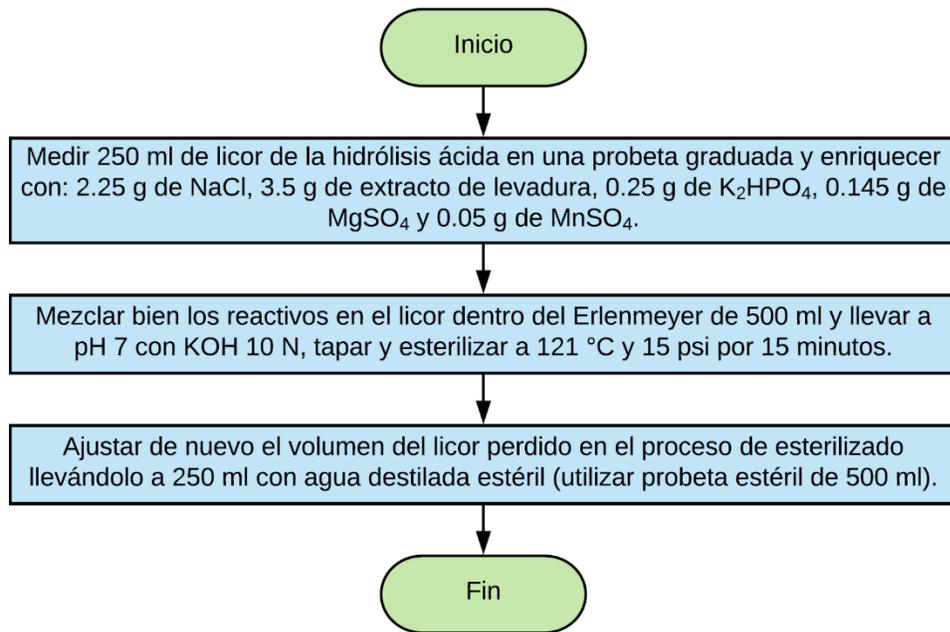


Figura A.8: Procedimiento para enriquecimiento de nutrientes mínimos posterior a hidrólisis química.

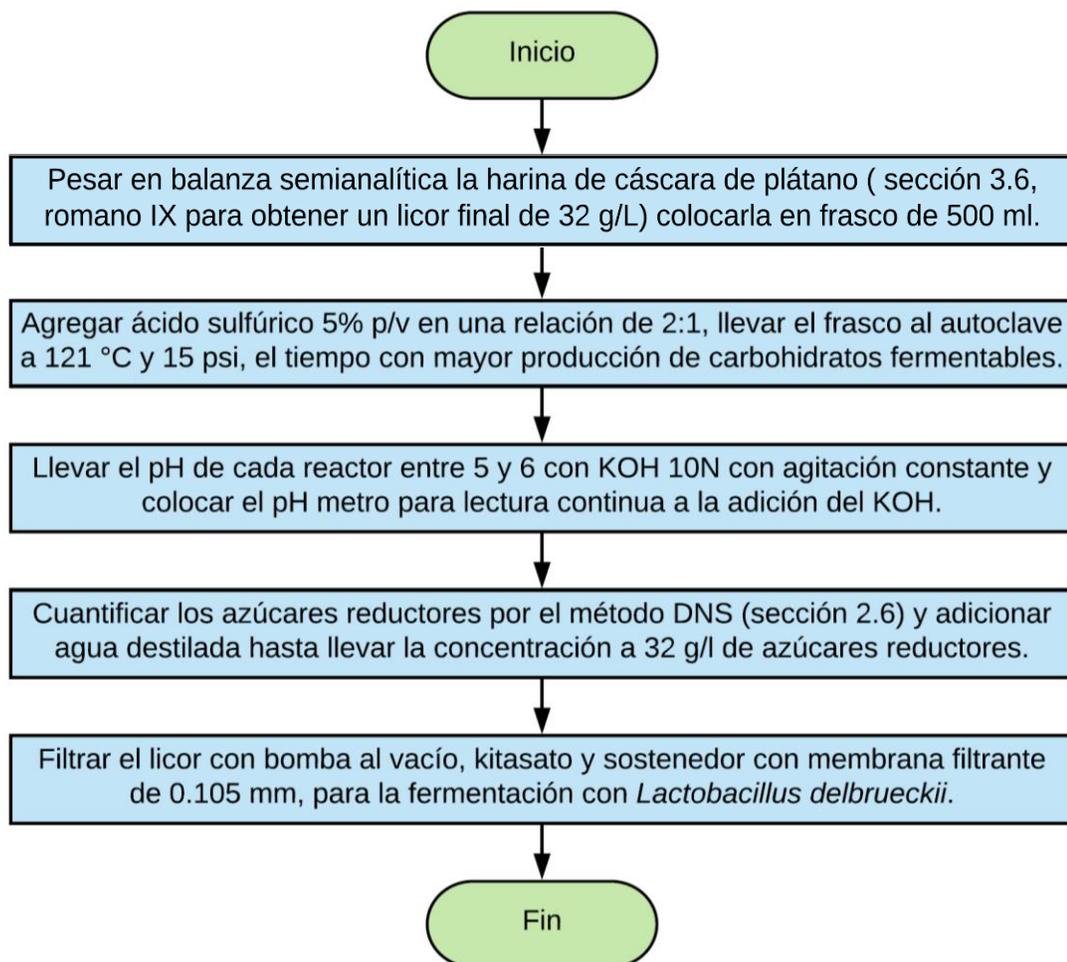


Figura A.7: Procedimiento de etapa final de hidrólisis química del almidón previo a fermentación láctica.

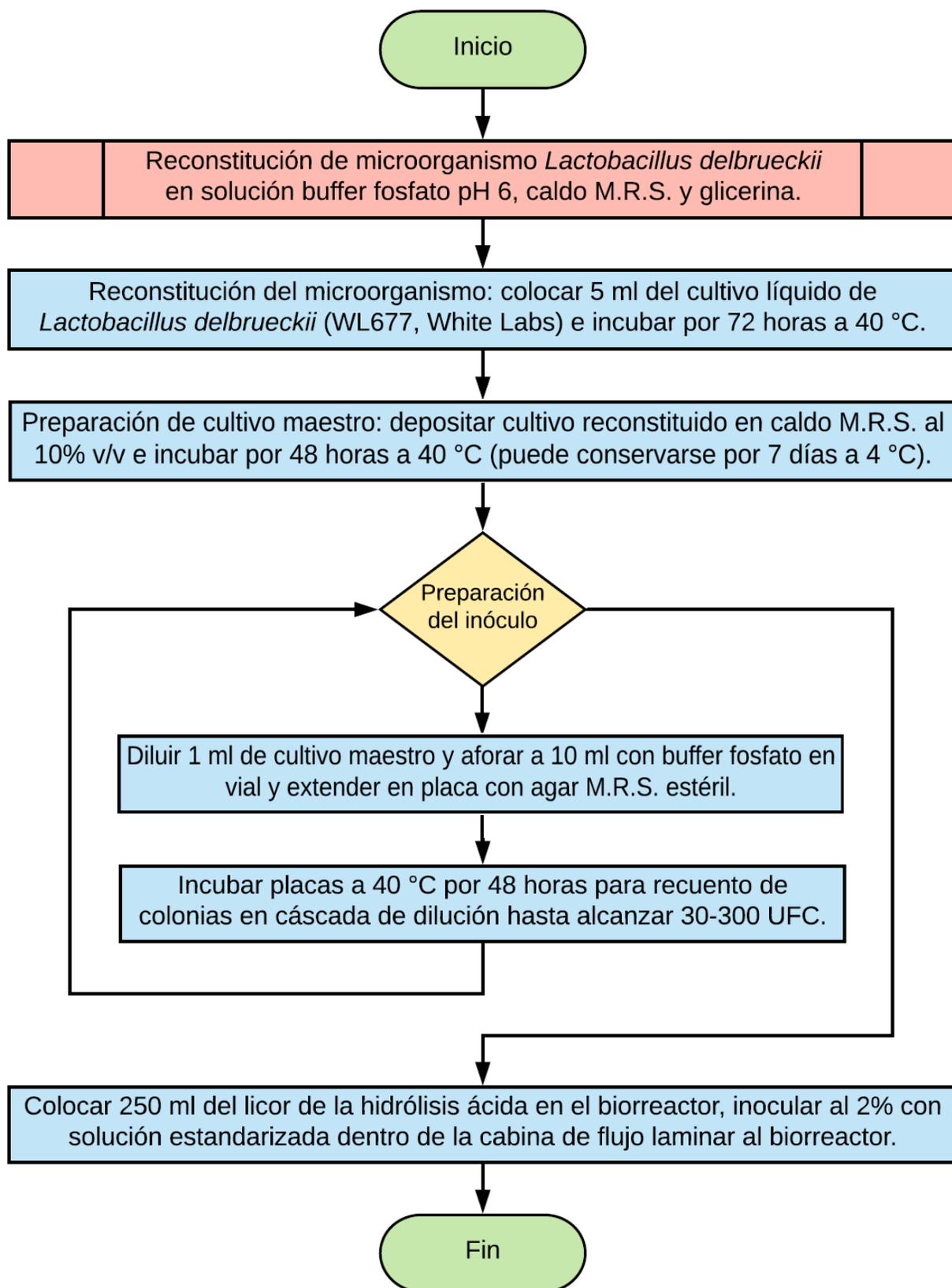


Figura A.9: Procedimiento para la preparación y cálculo del inóculo de *Lactobacillus delbrueckii*.

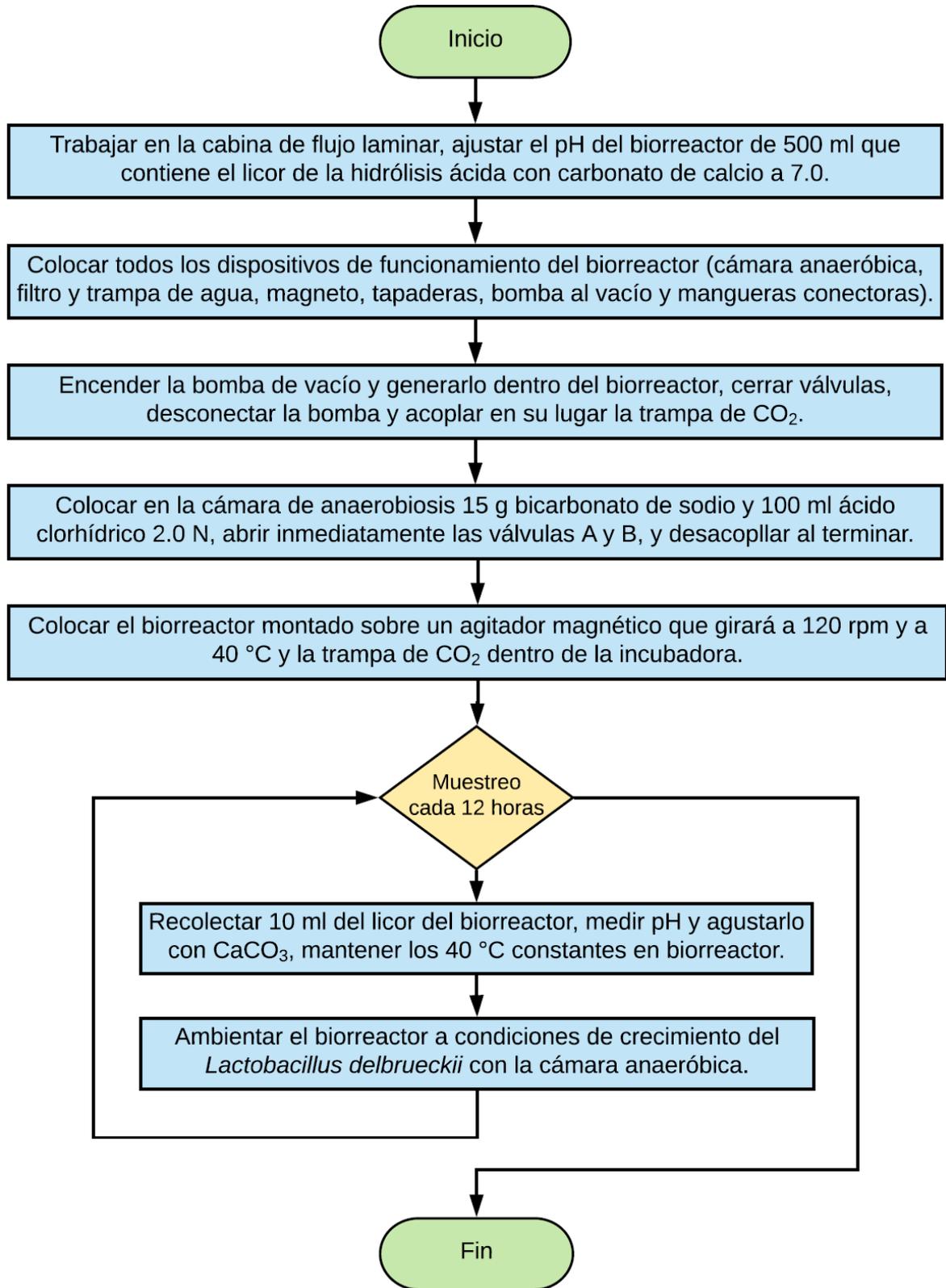


Figura A.10: Procedimiento para el cumplimiento de los parámetros de operación del biorreactor.

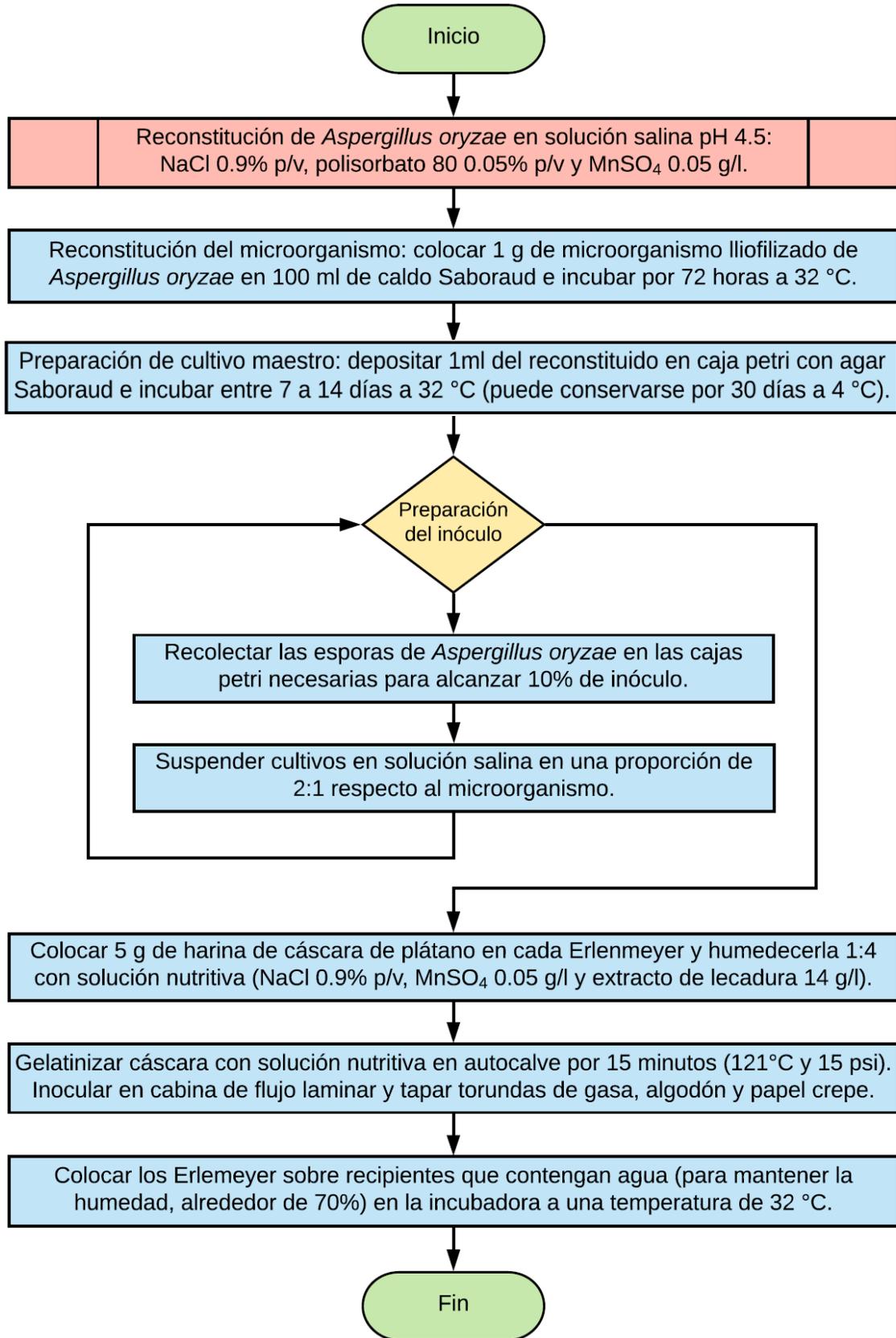


Figura A.11: Procedimiento de inoculación de *Aspergillus oryzae* para el extracto enzimático.

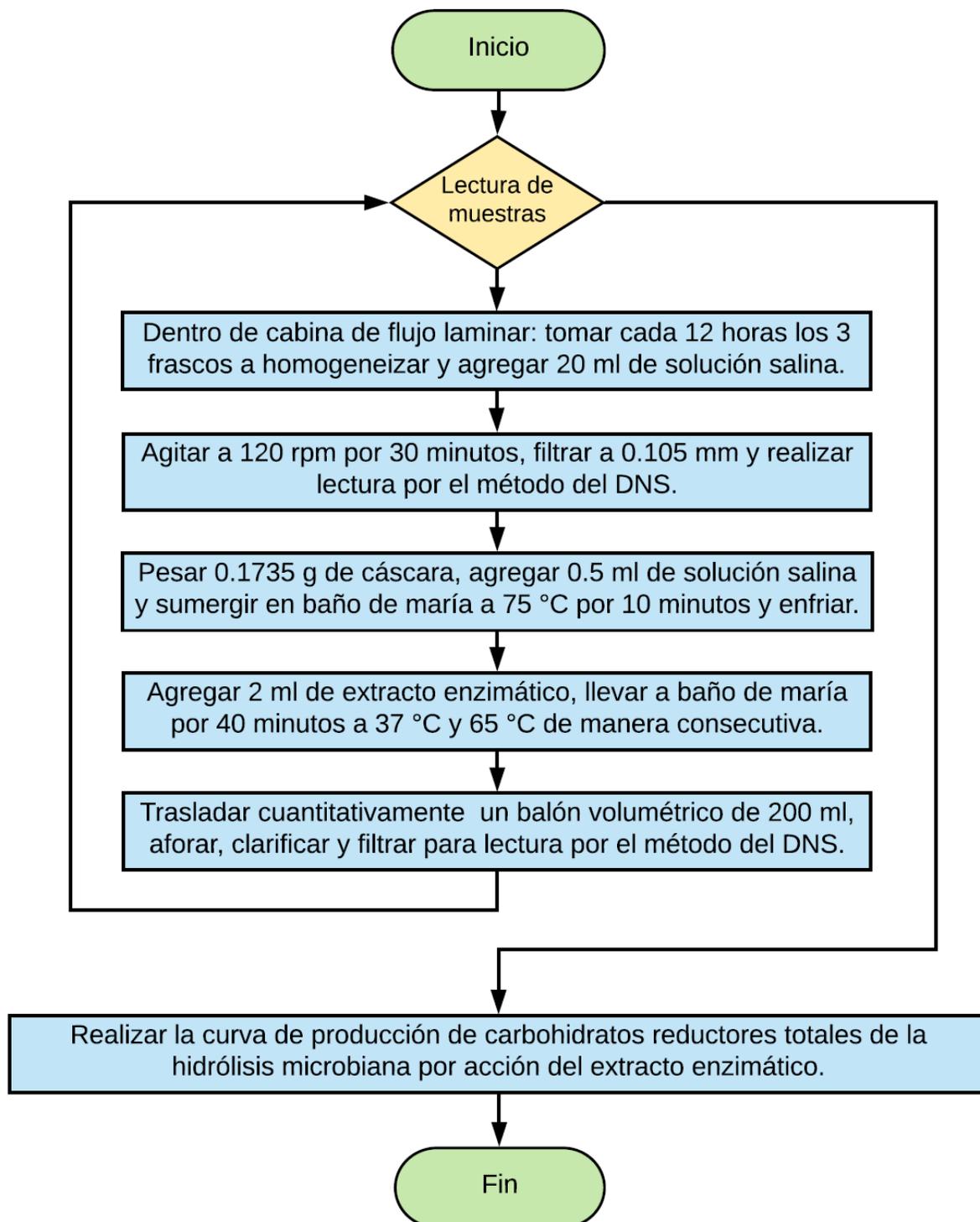


Figura A.12: Procedimiento de construcción de curva de hidrólisis enzimática por acción microbiana.

ANEXO 2: Validaciones estadísticas de curvas patrón de la investigación.

1. CURVA PATRÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Tabla A.1: Resultados de validación estadística de curva patrón de carbohidratos totales.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999586775
Coefficiente de determinación R ²	0.99917372
R ² ajustado	0.99905568
Error típico	0.006377528
Observaciones	9

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.34428375	0.34428375	8464.705314	4.72081E-12
Residuos	7	0.00028471	4.06729E-05		
Total	8	0.34456846			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0.000466667	0.00391986	0.119051874	0.908578818	-0.008802329	0.009735662	-0.008802329	0.009735662
Concentración (ppm)	0.007575	8.23335E-05	92.00383315	4.72081E-12	0.007380312	0.007769688	0.007380312	0.007769688

Análisis de los residuales

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico Absorbancia</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
1	0.000466667	-0.000466667	-0.078225872
2	0.076216667	-0.001216667	-0.203946024
3	0.151966667	0.005133333	0.860484594
4	0.227716667	0.004283333	0.718001755
5	0.303466667	-0.008466667	-1.419240823
6	0.379216667	-0.003216667	-0.539199762
7	0.454966667	0.006133333	1.028111462
8	0.530716667	-0.008716667	-1.46114754
9	0.606466667	0.006533333	1.09516221

Resultados de datos de probabilidad

<i>Percentil</i>	<i>Absorbancia</i>
5.555555556	0
16.66666667	0.075
27.77777778	0.1571
38.88888889	0.232
50	0.295
61.11111111	0.376
72.22222222	0.4611
83.33333333	0.522
94.44444444	0.613

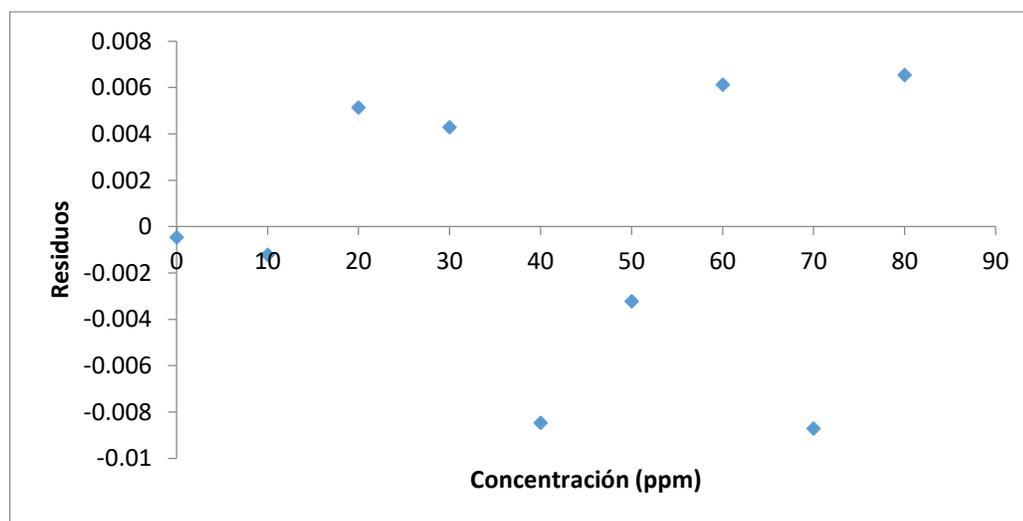
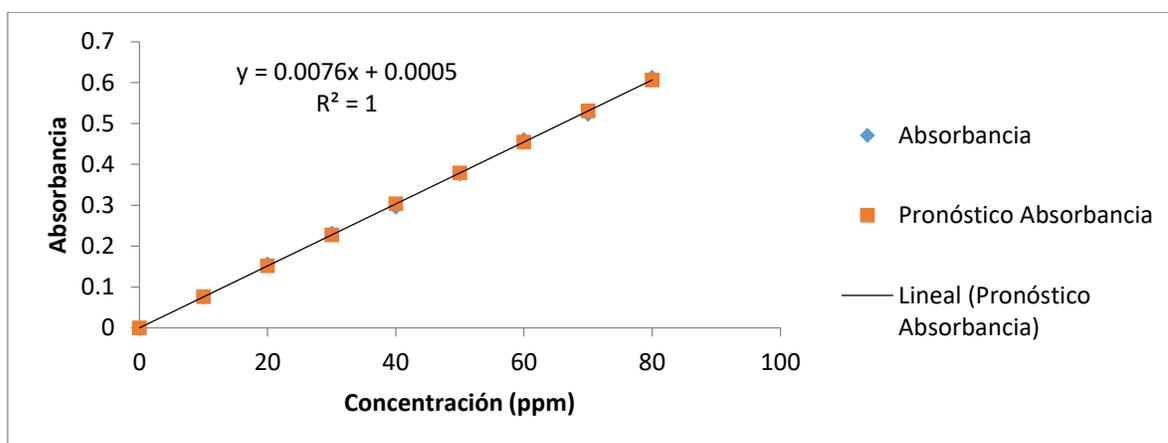
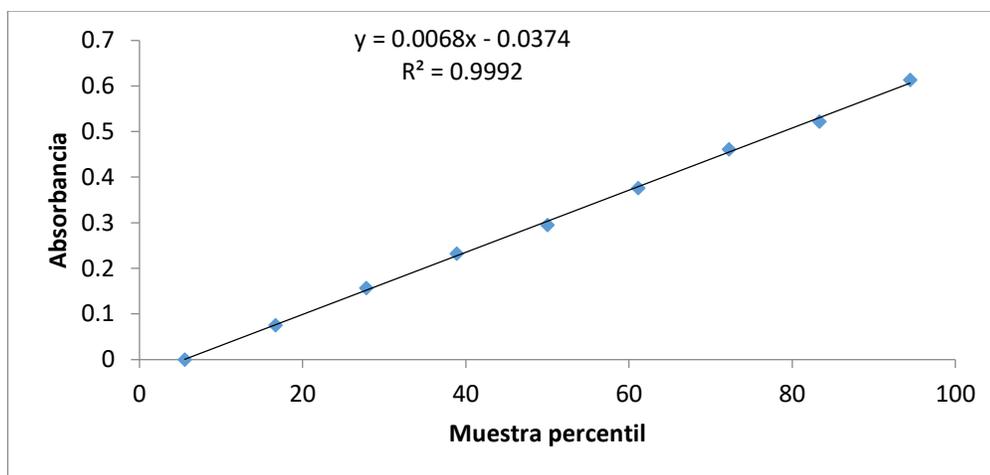


Figura A.13: Gráficas resultados validación estadística de curva carbohidratos totales.

Figura A.13.a): Gráfica de probabilidad normal.

Figura A.13.b): Gráfica de concentración (ppm), curva de regresión ajustada.

Figura A.13.c): Gráfica de concentración (ppm), gráfico de los residuales.

2. CURVA PATRÓN DE CARBOHIDRATOS REDUCTORES TOTALES

Tabla A.2: Resultados de validación estadística de curva patrón de azúcares reductores totales.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999258762
Coefficiente de determinación R ²	0.998518073
R ² ajustado	0.998306369
Error típico	0.009516282
Observaciones	9

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.4271316	0.427131563	4716.58	3.64818E-11
Residuos	7	0.0006339	9.05596E-05		
Total	8	0.4277655			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	-0.015126667	0.0058491	-2.58617399	0.03614568	-0.02895748	-0.00129586	-0.02895748	-0.001295856
Concentración (ppm)	0.000843733	1.229E-05	68.67735155	3.6482E-11	0.000814683	0.00087278	0.000814683	0.000872784

Análisis de los residuales

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico Absorbancia</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
1	-0.015126667	0.0151267	1.699307276
2	0.069246667	-0.0082467	-0.92641829
3	0.15362	0.00468	0.525744252
4	0.237993333	-0.0059933	-0.673282169
5	0.322366667	-0.0123667	-1.389252973
6	0.40674	-0.00474	-0.532484563
7	0.491113333	0.0008867	0.099606817
8	0.575486667	0.0005133	0.057667105
9	0.65986	0.01014	1.139112546

Resultados de datos de probabilidad

<i>Percentil</i>	<i>Absorbancia</i>
5.555555556	0
16.66666667	0.061
27.77777778	0.1583
38.88888889	0.232
50	0.31
61.11111111	0.402
72.22222222	0.492
83.33333333	0.576
94.44444444	0.67

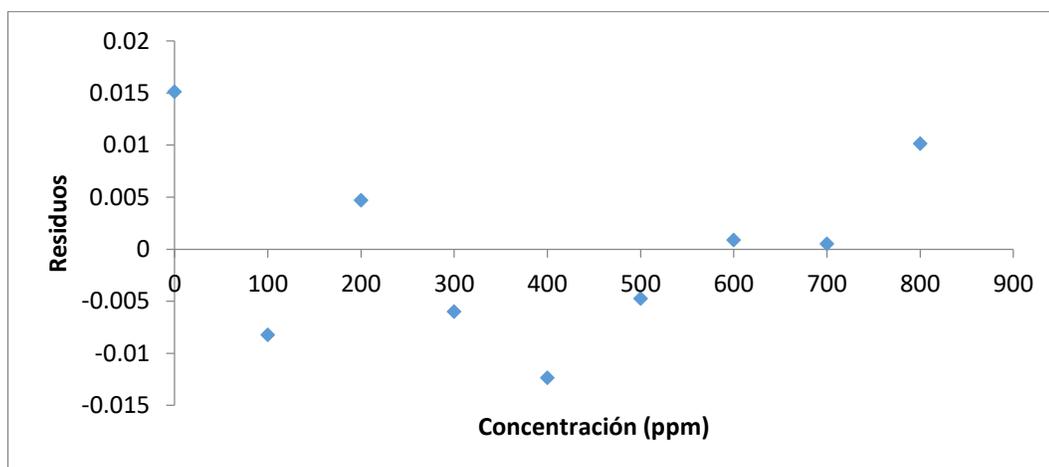
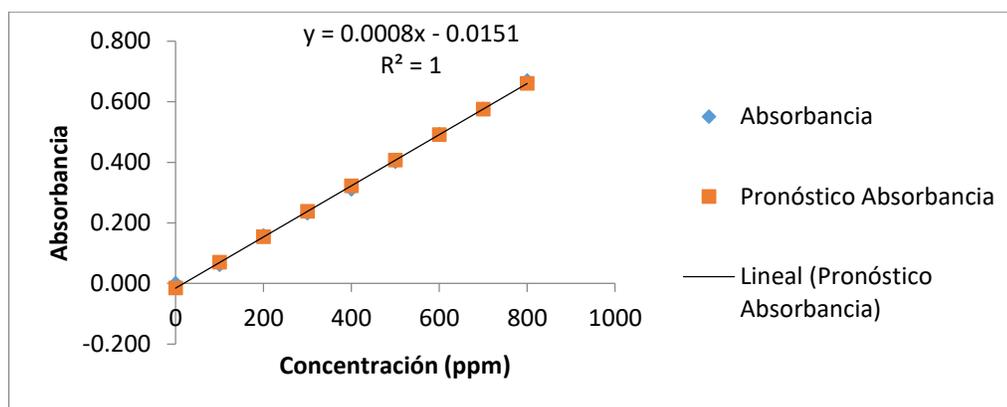
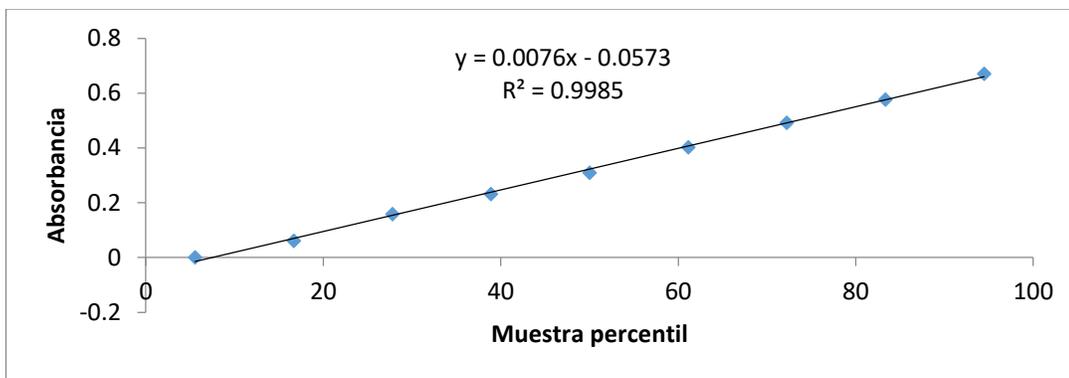


Figura A.14: Gráficas de validación estadística de curva azúcares reductores totales.

Figura A.14.a): Gráfica de probabilidad normal.

Figura A.14.b): Gráfica de concentración (ppm), curva de regresión ajustada.

Figura A.14.c): Gráfica de concentración (ppm), gráfico de los residuales.

3. CURVA PATRÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Tabla A.3: Resultados de ANOVA con un factor a curva patrón de ácido láctico.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.9997808
Coeficiente de determinación R ²	0.99956165
R ² ajustado	0.99951295
Error típico	0.00183384
Observaciones	11

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.069016925	0.069016925	20522.65	2.00005E-16
Residuos	9	3.02667E-05	3.36296E-06		
Total	10	0.069047192			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0.002242424	0.001034424	2.167799232	0.05832214	-9.7606E-05	0.004582455	-9.76061E-05	0.004582455
Concentración (ppm)	0.002504848	1.7485E-05	143.2572999	2.0001E-16	0.002465295	0.002544402	0.002465295	0.002544402

Análisis de los residuales

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico Absorbancia</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
1	0.002242424	-0.002242424	-1.288948255
2	0.027290909	-0.001624242	-0.933616574
3	0.052339394	0.000993939	0.571317605
4	0.077387879	0.000945455	0.543448454
5	0.102436364	0.003563636	2.048382633
6	0.127484848	-0.001151515	-0.661892347
7	0.152533333	0.001133333	0.651441415
8	0.177581818	0.000751515	0.431971848
9	0.202630303	0.000369697	0.21250228
10	0.227678788	-0.000678788	-0.39016812
11	0.252727273	-0.002060606	-1.184438937

Resultados de datos de probabilidad

<i>Percentil</i>	<i>Absorbancia</i>
4.545454545	0
13.63636364	0.025666667
22.72727273	0.053333333
31.81818182	0.078333333
40.90909091	0.106
50	0.126333333
59.09090909	0.153666667
68.18181818	0.178333333
77.27272727	0.203
86.36363636	0.227
95.45454545	0.250666667

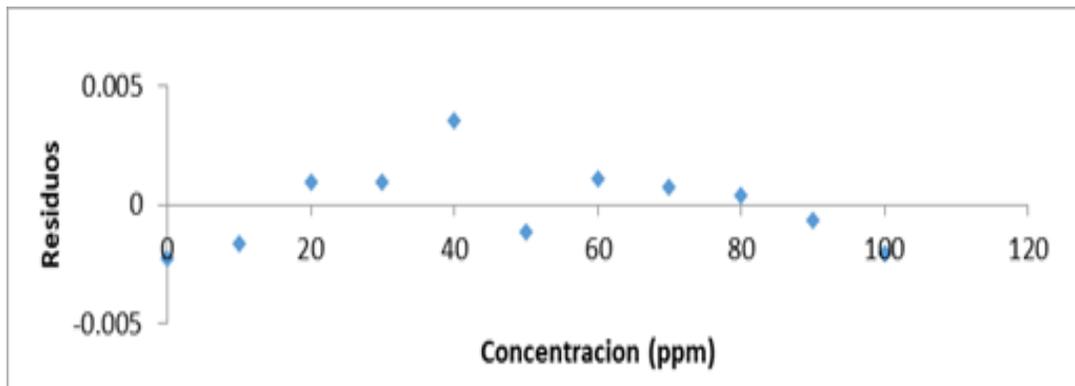
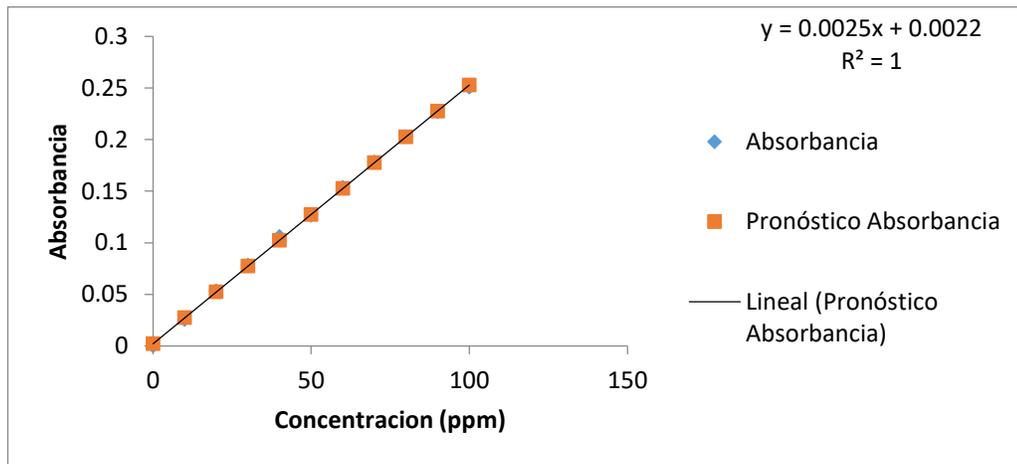
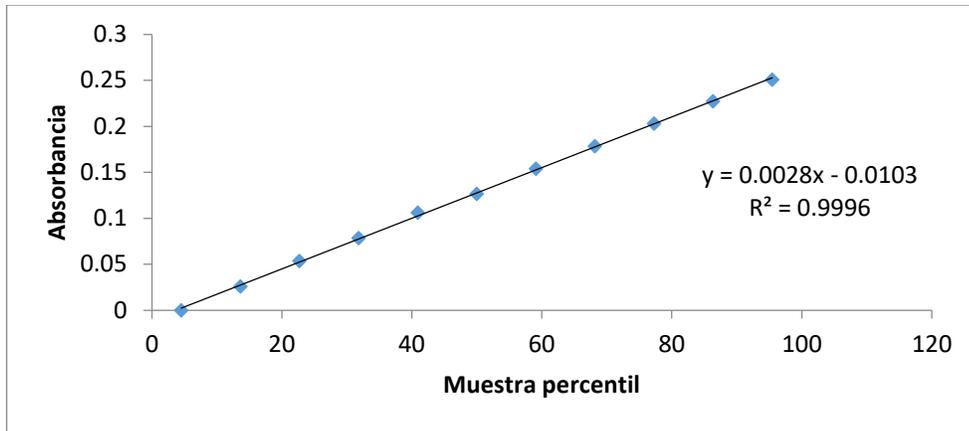


Figura A.15: Gráficas de validación estadística de curva ácido láctico.

Figura A.15.a): Gráfica de probabilidad normal.

Figura A.15.b): Gráfica de concentración (ppm), curva de regresión ajustada.

Figura A.15.c): Gráfica de concentración (ppm), gráfico de los residuales.

ANEXO 3: Resultados de la etapa experimental.

Tabla A.4: Resultados de hidrólisis de cáscara de plátano, H₂SO₄ 5% p/v.

Condiciones	N° de tubo	MUESTRA (ml)	DNS (ml)	Agua (ml)	Absorbancia	Concentración (ppm)
N/A	Blanco	1 ml H ₂ O	1	10	0.000	0.00
0 min (Autoclave) 121°C, 15 psi, tratamiento con carbón activado	A1	1	1	10	0.077	115.13
	A2	1	1	10	0.075	112.63
	A3	1	1	10	0.073	110.13
	B1	1	1	10	0.067	102.63
	B2	1	1	10	0.065	100.13
	B3	1	1	10	0.067	102.63
	C1	1	1	10	0.061	95.13
	C2	1	1	10	0.068	103.88
	C3	1	1	10	0.061	95.13
5 min (Autoclave) 121°C, 15 psi, tratamiento con carbón activado	D1	1	1	10	0.189	255.13
	D2	1	1	10	0.185	250.13
	D3	1	1	10	0.189	255.13
	E1	1	1	10	0.156	213.88
	E2	1	1	10	0.152	208.88
	E3	1	1	10	0.155	212.63
	F1	1	1	10	0.148	203.88
	F2	1	1	10	0.144	198.88
	F3	1	1	10	0.145	200.13
10 min (Autoclave) 121°C, 15 psi, tratamiento con carbón activado	G1	1	1	10	0.274	361.38
	G2	1	1	10	0.273	360.13
	G3	1	1	10	0.273	360.13
	H1	1	1	10	0.279	367.63
	H2	1	1	10	0.270	356.38
	H3	1	1	10	0.268	353.88
	I1	1	1	10	0.302	396.38
	I2	1	1	10	0.306	401.38
	I3	1	1	10	0.303	397.63
15 min (Autoclave) 121°C, 15 psi, tratamiento con carbón activado	J1	1	1	10	0.367	477.63
	J2	1	1	10	0.367	477.63
	J3	1	1	10	0.369	480.13
	K1	1	1	10	0.395	512.63
	K2	1	1	10	0.393	510.13
	K3	1	1	10	0.392	508.88
	L1	1	1	10	0.381	495.13
	L2	1	1	10	0.380	493.88
	L3	1	1	10	0.381	494.50
20 min (Autoclave) 121°C, 15 psi, tratamiento con carbón activado	M1	1	1	10	0.325	425.13
	M2	1	1	10	0.331	432.63
	M3	1	1	10	0.329	430.13
	N1	1	1	10	0.267	352.63
	N2	1	1	10	0.276	363.88
	N3	1	1	10	0.267	352.63
	O1	1	1	10	0.415	537.63
	O2	1	1	10	0.404	523.88
	O3	1	1	10	0.412	533.88

Tabla A.5: Resultados de fermentación láctica a partir de licor producido con hidrólisis química.

Condiciones	N° de tubos	Muestra (ml)	Solución FeCl ₃ 10 g/L (ml)	Absorbancia	Concentración Ácido Láctico (ppm)	Factor de dilución x200/5	Concentración Ácido Láctico (g/L)
0 h	Blanco	10 ml H ₂ O	5	0.000	0	0	0
12h	A1	10	5	0.040	15.12	604.8	0.6048
	A2	10	5	0.042	15.92	636.8	0.6368
	A3	10	5	0.038	14.32	572.8	0.5728
	B1	10	5	0.045	17.12	684.8	0.6848
	B2	10	5	0.040	15.12	604.8	0.6048
	B3	10	5	0.040	15.12	604.8	0.6048
	C1	10	5	0.039	14.72	588.8	0.5888
	C2	10	5	0.041	15.52	620.8	0.6208
24h	A1	10	5	0.122	47.92	1916.8	1.9168
	A2	10	5	0.124	48.72	1948.8	1.9488
	A3	10	5	0.123	48.32	1932.8	1.9328
	B1	10	5	0.125	49.12	1964.8	1.9648
	B2	10	5	0.124	48.72	1948.8	1.9488
	B3	10	5	0.123	48.32	1932.8	1.9328
	C1	10	5	0.125	49.12	1964.8	1.9648
	C2	10	5	0.124	48.72	1948.8	1.9488
36h	A1	10	5	0.143	56.32	2252.8	2.2528
	A2	10	5	0.143	56.32	2252.8	2.2528
	A3	10	5	0.143	56.32	2252.8	2.2528
	B1	10	5	0.146	57.52	2300.8	2.3008
	B2	10	5	0.142	55.92	2236.8	2.2368
	B3	10	5	0.142	55.92	2236.8	2.2368
	C1	10	5	0.144	56.72	2268.8	2.2688
	C2	10	5	0.145	57.12	2284.8	2.2848
48h	A1	10	5	0.171	67.52	2700.8	2.7008
	A2	10	5	0.169	66.72	2668.8	2.6688
	A3	10	5	0.170	67.12	2684.8	2.6848
	B1	10	5	0.172	67.92	2716.8	2.7168
	B2	10	5	0.174	68.72	2748.8	2.7488
	B3	10	5	0.166	65.52	2620.8	2.6208
	C1	10	5	0.172	67.92	2716.8	2.7168
	C2	10	5	0.170	67.12	2684.8	2.6848
C3	10	5	0.171	67.52	2700.8	2.7008	

Continúa...

Tabla A.5.a: Resultados de fermentación láctica a partir de licor producido con hidrólisis química.

Condiciones	N° de tubos	Muestra (ml)	Solución FeCl ₃ 10 g/L (ml)	Absorbancia	Concentración Ácido Láctico (ppm)	Factor de dilución x200/5	Concentración Ácido Láctico (g/l)
60h	A1	10	5	0.359	142.72	5708.8	5.7088
	A2	10	5	0.360	143.12	5724.8	5.7248
	A3	10	5	0.360	143.12	5724.8	5.7248
	B1	10	5	0.361	143.52	5740.8	5.7408
	B2	10	5	0.359	142.72	5708.8	5.7088
	B3	10	5	0.357	141.92	5676.8	5.6768
	C1	10	5	0.363	144.32	5772.8	5.7728
	C2	10	5	0.362	143.92	5756.8	5.7568
	C3	10	5	0.358	142.32	5692.8	5.6928
72h	A1	10	5	0.489	194.72	7788.8	7.7888
	A2	10	5	0.490	195.12	7804.8	7.8048
	A3	10	5	0.491	195.52	7820.8	7.8208
	B1	10	5	0.488	194.32	7772.8	7.7728
	B2	10	5	0.492	195.92	7836.8	7.8368
	B3	10	5	0.490	195.12	7804.8	7.8048
	C1	10	5	0.491	195.52	7820.8	7.8208
	C2	10	5	0.490	195.12	7804.8	7.8048
	C3	10	5	0.488	194.32	7772.8	7.7728
84h	A1	10	5	0.722	287.92	11516.8	11.5168
	A2	10	5	0.720	287.12	11484.8	11.4848
	A3	10	5	0.720	287.12	11484.8	11.4848
	B1	10	5	0.720	287.12	11484.8	11.4848
	B2	10	5	0.721	287.52	11500.8	11.5008
	B3	10	5	0.722	287.92	11516.8	11.5168
	C1	10	5	0.718	286.32	11452.8	11.4528
	C2	10	5	0.719	286.72	11468.8	11.4688
	C3	10	5	0.740	295.12	11804.8	11.8048
96h	A1	10	5	0.880	351.12	14044.8	14.0448
	A2	10	5	0.879	350.72	14028.8	14.0288
	A3	10	5	0.886	353.52	14140.8	14.1408
	B1	10	5	0.881	351.52	14060.8	14.0608
	B2	10	5	0.874	348.72	13948.8	13.9488
	B3	10	5	0.882	351.92	14076.8	14.0768
	C1	10	5	0.880	351.12	14044.8	14.0448
	C2	10	5	0.880	351.12	14044.8	14.0448
	C3	10	5	0.878	350.32	14012.8	14.0128

Continúa...

Tabla A.5.b: Resultados de fermentación láctica a partir de licor producido con hidrólisis química.

Condiciones	N° de tubos	Muestra (ml)	Solución FeCl ₃ 10 g/L (ml)	Absorbancia	Concentración Ácido Láctico (ppm)	Factor de dilución x200/5	Concentración Ácido Láctico (g/L)
108h	A1	10	5	1.156	461.52	18460.8	18.4608
	A2	10	5	1.158	462.32	18492.8	18.4928
	A3	10	5	1.159	462.72	18508.8	18.5088
	B1	10	5	1.157	461.92	18476.8	18.4768
	B2	10	5	1.157	461.92	18476.8	18.4768
	B3	10	5	1.153	460.32	18412.8	18.4128
	C1	10	5	1.155	461.12	18444.8	18.4448
	C2	10	5	1.156	461.52	18460.8	18.4608
	C3	10	5	1.154	460.72	18428.8	18.4288
120h	A1	10	5	1.405	561.12	22444.8	22.4448
	A2	10	5	1.402	559.92	22396.8	22.3968
	A3	10	5	1.403	560.32	22412.8	22.4128
	B1	10	5	1.399	558.72	22348.8	22.3488
	B2	10	5	1.407	561.92	22476.8	22.4768
	B3	10	5	1.405	561.12	22444.8	22.4448
	C1	10	5	1.401	559.52	22380.8	22.3808
	C2	10	5	1.405	561.12	22444.8	22.4448
	C3	10	5	1.338	534.32	21372.8	21.3728
132h	A1	10	5	1.420	567.12	22684.8	22.6848
	A2	10	5	1.421	567.52	22700.8	22.7008
	A3	10	5	1.419	566.72	22668.8	22.6688
	B1	10	5	1.424	568.72	22748.8	22.7488
	B2	10	5	1.420	567.12	22684.8	22.6848
	B3	10	5	1.421	567.52	22700.8	22.7008
	C1	10	5	1.420	567.12	22684.8	22.6848
	C2	10	5	1.423	568.32	22732.8	22.7328
	C3	10	5	1.421	567.52	22700.8	22.7008
144h	A1	10	5	1.420	567.12	22684.8	22.6848
	A2	10	5	1.418	566.32	22652.8	22.6528
	A3	10	5	1.417	565.92	22636.8	22.6368
	B1	10	5	1.418	566.32	22652.8	22.6528
	B2	10	5	1.418	566.32	22652.8	22.6528
	B3	10	5	1.419	566.72	22668.8	22.6688
	C1	10	5	1.420	567.12	22684.8	22.6848
	C2	10	5	1.420	567.12	22684.8	22.6848
	C3	10	5	1.419	566.72	22668.8	22.6688

Tabla A.6: Resultados de hidrólisis enzimática por acción microbiana.

Hora	N° de tubo (Licor)	Absorbancia del Licor	Concentración de azúcares reductores		Azúcares reductores en la muestra (g)	N° de tubo (extracto enzimático)	Absorbancia del extracto enzimático	Concentración de azúcares reductores del extracto		Azúcares reductores en la muestra (g)	Azúcar hidrolizada de la cascara (g/l)	
			(ppm)	(g/l)				(ppm)	(g/l)			
0	Blanco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
12	1A1 i	0.074	111.38	8.91	0.022275	1A1 Ext i	0.004	23.88	0.955	0.0023875	7	
	1A1 ii	0.076	113.88	9.11	0.022775	1A1 Ext ii	0.006	26.38	1.055	0.0026375	7	
	1A1 iii	0.075	112.63	9.01	0.022525	1A1 Ext iii	0.005	25.13	1.005	0.0025125	7	
	1A2 i	0.073	110.13	8.81	0.022025	1A2 Ext i	0.005	25.13	1.005	0.0025125	6.8	
	1A2 ii	0.076	113.88	9.11	0.022775	1A2 Ext ii	0.005	25.13	1.005	0.0025125	7.1	
	1A2 iii	0.075	112	8.96	0.0224	1A2 Ext iii	0.005	25.13	1.005	0.0025125	6.95	
	1A3 i	0.074	110.75	8.86	0.02215	1A3 Ext i	0.005	24.5	0.98	0.00245	6.9	
	1A3 ii	0.076	113.88	9.11	0.022775	1A3 Ext ii	0.004	23.88	0.955	0.0023875	7.2	
	1A3 iii	0.075	112.31	8.985	0.0224625	1A3 Ext iii	0.004	24.19	0.9675	0.00241875	7.05	
	1B1 i	0.077	115.13	9.21	0.023025	1B1 Ext i	0.006	26.38	1.055	0.0026375	7.1	
	1B1 ii	0.078	116.38	9.31	0.023275	1B1 Ext ii	0.004	23.88	0.955	0.0023875	7.4	
	1B1 iii	0.076	113.88	9.11	0.022775	1B1 Ext iii	0.006	26.38	1.055	0.0026375	7	
	1B2 i	0.078	116.38	9.31	0.023275	1B2 Ext i	0.005	25.13	1.005	0.0025125	7.3	
	1B2 ii	0.075	112.63	9.01	0.022525	1B2 Ext ii	0.006	26.38	1.055	0.0026375	6.9	
	1B2 iii	0.077	114.5	9.16	0.0229	1B2 Ext iii	0.006	25.75	1.03	0.002575	7.1	
	1B3 i	0.076	113.88	9.11	0.022775	1B3 Ext i	0.007	27.63	1.105	0.0027625	6.9	
	1B3 ii	0.077	115.13	9.21	0.023025	1B3 Ext ii	0.006	26.38	1.055	0.0026375	7.1	
	1B3 iii	0.077	114.5	9.16	0.0229	1B3 Ext iii	0.007	27	1.08	0.0027	7	
	1C1 i	0.074	111.38	8.91	0.022275	1C1 Ext i	0.004	23.88	0.955	0.0023875	7	
	1C1 ii	0.074	111.38	8.91	0.022275	1C1 Ext ii	0.005	25.13	1.005	0.0025125	6.9	
	1C1 iii	0.074	111.38	8.91	0.022275	1C1 Ext iii	0.005	24.5	0.98	0.00245	6.95	
	1C2 i	0.075	112.63	9.01	0.022525	1C2 Ext i	0.004	23.88	0.955	0.0023875	7.1	
	1C2 ii	0.076	113.25	9.06	0.02265	1C2 Ext ii	0.006	26.38	1.055	0.0026375	6.95	
	1C2 iii	0.075	112.94	9.035	0.0225875	1C2 Ext iii	0.005	25.13	1.005	0.0025125	7.025	
	1C3 i	0.075	112.31	8.985	0.0224625	1C3 Ext i	0.006	26.06	1.0425	0.00260625	6.9	
	1C3 ii	0.077	114.5	9.16	0.0229	1C3 Ext ii	0.005	25.13	1.005	0.0025125	7.15	
	1C3 iii	0.076	113.41	9.0725	0.0226813	1C3 Ext iii	0.005	25.59	1.02375	0.00255938	7.025	
	24	2A1 i	0.186	251.38	20.11	0.050275	2A1 Ext i	0.028	53.88	2.155	0.0053875	15.8
		2A1 ii	0.187	252.63	20.21	0.050525	2A1 Ext ii	0.03	56.38	2.255	0.0056375	15.7
		2A1 iii	0.187	252	20.16	0.0504	2A1 Ext iii	0.029	55.13	2.205	0.0055125	15.75
2A2 i		0.185	250.13	20.01	0.050025	2A2 Ext i	0.029	55.13	2.205	0.0055125	15.6	
2A2 ii		0.187	252.63	20.21	0.050525	2A2 Ext ii	0.03	56.38	2.255	0.0056375	15.7	
2A2 iii		0.186	251.38	20.11	0.050275	2A2 Ext iii	0.03	55.75	2.23	0.005575	15.65	
2A3 i		0.186	250.75	20.06	0.05015	2A3 Ext i	0.029	54.5	2.18	0.00545	15.7	
2A3 ii		0.187	252.63	20.21	0.050525	2A3 Ext ii	0.03	56.38	2.255	0.0056375	15.7	
2A3 iii		0.186	251.69	20.135	0.0503375	2A3 Ext iii	0.029	55.44	2.2175	0.00554375	15.7	
2B1 i		0.183	247.63	19.81	0.049525	2B1 Ext i	0.029	55.13	2.205	0.0055125	15.4	
2B1 ii		0.184	248.88	19.91	0.049775	2B1 Ext ii	0.028	53.88	2.155	0.0053875	15.6	
2B1 iii		0.185	250.13	20.01	0.050025	2B1 Ext iii	0.029	54.5	2.18	0.00545	15.65	
2B2 i		0.187	252.63	20.21	0.050525	2B2 Ext i	0.028	53.88	2.155	0.0053875	15.9	
2B2 ii		0.185	250.13	20.01	0.050025	2B2 Ext ii	0.027	52.63	2.105	0.0052625	15.8	
2B2 iii		0.186	251.38	20.11	0.050275	2B2 Ext iii	0.028	53.25	2.13	0.005325	15.85	
2B3 i		0.186	251.38	20.11	0.050275	2B3 Ext i	0.028	53.88	2.155	0.0053875	15.8	
2B3 ii		0.186	251.38	20.11	0.050275	2B3 Ext ii	0.027	52.63	2.105	0.0052625	15.9	
2B3 iii		0.186	251.38	20.11	0.050275	2B3 Ext iii	0.028	53.25	2.13	0.005325	15.85	
2C1 i		0.185	249.5	19.96	0.0499	2C1 Ext i	0.027	52.63	2.105	0.0052625	15.75	
2C1 ii		0.186	250.75	20.06	0.05015	2C1 Ext ii	0.03	56.38	2.255	0.0056375	15.55	
2C1 iii		0.185	250.13	20.01	0.050025	2C1 Ext iii	0.029	54.5	2.18	0.00545	15.65	
2C2 i		0.186	251.38	20.11	0.050275	2C2 Ext i	0.029	54.5	2.18	0.00545	15.75	
2C2 ii		0.186	251.38	20.11	0.050275	2C2 Ext ii	0.03	56.38	2.255	0.0056375	15.6	
2C2 iii		0.186	251.38	20.11	0.050275	2C2 Ext iii	0.029	55.44	2.2175	0.00554375	15.675	
2C3 i		0.186	251.06	20.085	0.0502125	2C3 Ext i	0.028	53.88	2.155	0.0053875	15.775	
2C3 ii		0.187	252	20.16	0.0504	2C3 Ext ii	0.03	56.38	2.255	0.0056375	15.65	
2C3 iii		0.186	251.53	20.1225	0.0503063	2C3 Ext iii	0.029	55.13	2.205	0.0055125	15.7125	

Continúa...

Tabla A.6.a: Resultados de hidrólisis enzimática por acción microbiana.

Hora	N° de tubo (Licor)	Absorbancia del Licor	Concentración de azúcares reductores		Azúcares reductores en la muestra (g)	N° de tubo (extracto enzimático)	Absorbancia del extracto enzimático	Concentración de azúcares reductores del extracto		Azúcares reductores en la muestra (g)	Azúcar hidrolizada de la cascara (g/l)	
			(ppm)	(g/l)				(ppm)	(g/l)			
36	3A1 i	0.285	375.13	30.01	0.075025	3A1 Ext i	0.052	83.88	3.355	0.0083875	23.3	
	3A1 ii	0.286	376.38	30.11	0.075275	3A1 Ext ii	0.054	86.38	3.455	0.0086375	23.2	
	3A1 iii	0.284	373.88	29.91	0.074775	3A1 Ext iii	0.053	85.13	3.405	0.0085125	23.1	
	3A2 i	0.289	380.13	30.41	0.076025	3A2 Ext i	0.054	86.38	3.455	0.0086375	23.5	
	3A2 ii	0.287	377.63	30.21	0.075525	3A2 Ext ii	0.055	87.63	3.505	0.0087625	23.2	
	3A2 iii	0.288	378.88	30.31	0.075775	3A2 Ext iii	0.052	83.88	3.355	0.0083875	23.6	
	3A3 i	0.287	377.63	30.21	0.075525	3A3 Ext i	0.053	85.13	3.405	0.0085125	23.4	
	3A3 ii	0.287	377	30.16	0.0754	3A3 Ext ii	0.055	87	3.48	0.0087	23.2	
	3A3 iii	0.287	377.31	30.185	0.0754625	3A3 Ext iii	0.054	86.06	3.4425	0.00860625	23.3	
	3B1 i	0.288	378.88	30.31	0.075775	3B1 Ext i	0.052	83.88	3.355	0.0083875	23.6	
	3B1 ii	0.287	377.63	30.21	0.075525	3B1 Ext ii	0.051	82.63	3.305	0.0082625	23.6	
	3B1 iii	0.288	378.25	30.26	0.07565	3B1 Ext iii	0.052	83.25	3.33	0.008325	23.6	
	3B2 i	0.291	382.63	30.61	0.076525	3B2 Ext i	0.054	86.38	3.455	0.0086375	23.7	
	3B2 ii	0.293	385.13	30.81	0.077025	3B2 Ext ii	0.052	83.88	3.355	0.0083875	24.1	
	3B2 iii	0.292	383.88	30.71	0.076775	3B2 Ext iii	0.055	87.63	3.505	0.0087625	23.7	
	3B3 i	0.29	380.75	30.46	0.07615	3B3 Ext i	0.053	85.13	3.405	0.0085125	23.65	
	3B3 ii	0.29	381.38	30.51	0.076275	3B3 Ext ii	0.051	82.63	3.305	0.0082625	23.9	
	3B3 iii	0.29	381.06	30.485	0.0762125	3B3 Ext iii	0.052	83.88	3.355	0.0083875	23.775	
	3C1 i	0.289	380.13	30.41	0.076025	3C1 Ext i	0.053	85.13	3.405	0.0085125	23.6	
	3C1 ii	0.294	386.38	30.91	0.077275	3C1 Ext ii	0.055	87.63	3.505	0.0087625	23.9	
	3C1 iii	0.292	383.25	30.66	0.07665	3C1 Ext iii	0.054	86.38	3.455	0.0086375	23.75	
	3C2 i	0.296	388.88	31.11	0.077775	3C2 Ext i	0.055	87.63	3.505	0.0087625	24.1	
	3C2 ii	0.295	387.63	31.01	0.077525	3C2 Ext ii	0.056	88.88	3.555	0.0088875	23.9	
	3C2 iii	0.296	388.25	31.06	0.07765	3C2 Ext iii	0.056	88.25	3.53	0.008825	24	
	3C3 i	0.288	379.19	30.335	0.0758375	3C3 Ext i	0.052	83.88	3.355	0.0083875	23.625	
	3C3 ii	0.288	379.19	30.335	0.0758375	3C3 Ext ii	0.051	82.63	3.305	0.0082625	23.725	
	3C3 iii	0.288	379.19	30.335	0.0758375	3C3 Ext iii	0.052	83.25	3.33	0.008325	23.675	
	48	4A1 i	0.305	400.13	32.01	0.080025	4A1 Ext i	0.054	86.38	3.455	0.0086375	25.1
		4A1 ii	0.307	402.63	32.21	0.080525	4A1 Ext ii	0.056	88.88	3.555	0.0088875	25.1
		4A1 iii	0.307	402.63	32.21	0.080525	4A1 Ext iii	0.055	87.63	3.505	0.0087625	25.2
4A2 i		0.304	398.88	31.91	0.079775	4A2 Ext i	0.056	88.88	3.555	0.0088875	24.8	
4A2 ii		0.306	401.38	32.11	0.080275	4A2 Ext ii	0.055	87.63	3.505	0.0087625	25.1	
4A2 iii		0.305	400.13	32.01	0.080025	4A2 Ext iii	0.056	88.25	3.53	0.008825	24.95	
4A3 i		0.305	399.5	31.96	0.0799	4A3 Ext i	0.055	87.63	3.505	0.0087625	24.95	
4A3 ii		0.307	402	32.16	0.0804	4A3 Ext ii	0.056	88.25	3.53	0.008825	25.1	
4A3 iii		0.306	400.75	32.06	0.08015	4A3 Ext iii	0.055	87.94	3.5175	0.00879375	25.025	
4B1 i		0.3	393.88	31.51	0.078775	4B1 Ext i	0.057	90.13	3.605	0.0090125	24.3	
4B1 ii		0.299	392.63	31.41	0.078525	4B1 Ext ii	0.058	91.38	3.655	0.0091375	24.1	
4B1 iii		0.3	393.25	31.46	0.07865	4B1 Ext iii	0.058	91.38	3.655	0.0091375	24.15	
4B2 i		0.302	396.38	31.71	0.079275	4B2 Ext i	0.058	91.38	3.655	0.0091375	24.4	
4B2 ii		0.301	395.13	31.61	0.079025	4B2 Ext ii	0.059	92.63	3.705	0.0092625	24.2	
4B2 iii		0.301	395.13	31.61	0.079025	4B2 Ext iii	0.059	92	3.68	0.0092	24.25	
4B3 i		0.301	395.13	31.61	0.079025	4B3 Ext i	0.058	90.75	3.63	0.009075	24.35	
4B3 ii		0.3	393.88	31.51	0.078775	4B3 Ext ii	0.059	92	3.68	0.0092	24.15	
4B3 iii		0.301	394.5	31.56	0.0789	4B3 Ext iii	0.058	91.38	3.655	0.0091375	24.25	
4C1 i		0.303	397	31.76	0.0794	4C1 Ext i	0.056	88.25	3.53	0.008825	24.7	
4C1 ii		0.303	397.63	31.81	0.079525	4C1 Ext ii	0.057	90.13	3.605	0.0090125	24.6	
4C1 iii		0.303	397.31	31.785	0.0794625	4C1 Ext iii	0.056	89.19	3.5675	0.00891875	24.65	
4C2 i		0.301	395.13	31.61	0.079025	4C2 Ext i	0.057	90.13	3.605	0.0090125	24.4	
4C2 ii		0.298	391.38	31.31	0.078275	4C2 Ext ii	0.057	90.13	3.605	0.0090125	24.1	
4C2 iii		0.3	393.25	31.46	0.07865	4C2 Ext iii	0.057	90.13	3.605	0.0090125	24.25	
4C3 i		0.297	390.13	31.21	0.078025	4C3 Ext i	0.056	89.19	3.5675	0.00891875	24.075	
4C3 ii		0.298	391.38	31.31	0.078275	4C3 Ext ii	0.057	90.13	3.605	0.0090125	24.1	
4C3 iii		0.298	390.75	31.26	0.07815	4C3 Ext iii	0.057	89.66	3.58625	0.00896563	24.0875	

Continúa...

Tabla A.6.b: Resultados de hidrólisis enzimática por acción microbiana.

Hora	N° de tubo (Licor)	Absorbancia del Licor	Concentración de azúcares reductores		Azúcares reductores en la muestra (g)	N° de tubo (extracto enzimático)	Absorbancia del extracto enzimático	Concentración de azúcares reductores del extracto		Azúcares reductores en la muestra (g)	Azúcar hidrolizada de la cascara (g/l)
			(ppm)	(g/l)				(ppm)	(g/l)		
60	5A1 i	0.201	270.13	21.61	0.054025	5A1 Ext i	0.046	76.38	3.055	0.0076375	15.5
	5A1 ii	0.203	272.63	21.81	0.054525	5A1 Ext ii	0.045	75.13	3.005	0.0075125	15.8
	5A1 iii	0.202	271.38	21.71	0.054275	5A1 Ext iii	0.046	75.75	3.03	0.007575	15.65
	5A2 i	0.2	268.88	21.51	0.053775	5A2 Ext i	0.048	78.88	3.155	0.0078875	15.2
	5A2 ii	0.198	266.38	21.31	0.053275	5A2 Ext ii	0.048	78.88	3.155	0.0078875	15
	5A2 iii	0.199	267.63	21.41	0.053525	5A2 Ext iii	0.048	78.88	3.155	0.0078875	15.1
	5A3 i	0.201	269.5	21.56	0.0539	5A3 Ext i	0.047	77.63	3.105	0.0077625	15.35
	5A3 ii	0.201	269.5	21.56	0.0539	5A3 Ext ii	0.047	77	3.08	0.0077	15.4
	5A3 iii	0.201	269.5	21.56	0.0539	5A3 Ext iii	0.047	77.31	3.0925	0.00773125	15.375
	5B1 i	0.204	273.88	21.91	0.054775	5B1 Ext i	0.043	72.63	2.905	0.0072625	16.1
	5B1 ii	0.202	271.38	21.71	0.054275	5B1 Ext ii	0.044	73.88	2.955	0.0073875	15.8
	5B1 iii	0.203	272.63	21.81	0.054525	5B1 Ext iii	0.044	73.25	2.93	0.007325	15.95
	5B2 i	0.203	272.63	21.81	0.054525	5B2 Ext i	0.045	75.13	3.005	0.0075125	15.8
	5B2 ii	0.203	272.63	21.81	0.054525	5B2 Ext ii	0.048	78.88	3.155	0.0078875	15.5
	5B2 iii	0.203	272.63	21.81	0.054525	5B2 Ext iii	0.044	73.88	2.955	0.0073875	15.9
	5B3 i	0.204	273.25	21.86	0.05465	5B3 Ext i	0.044	73.88	2.955	0.0073875	15.95
	5B3 ii	0.203	272	21.76	0.0544	5B3 Ext ii	0.046	76.38	3.055	0.0076375	15.65
	5B3 iii	0.203	272.63	21.81	0.054525	5B3 Ext iii	0.045	75.13	3.005	0.0075125	15.8
	5C1 i	0.203	272	21.76	0.0544	5C1 Ext i	0.045	74.5	2.98	0.00745	15.8
	5C1 ii	0.203	272	21.76	0.0544	5C1 Ext ii	0.045	74.5	2.98	0.00745	15.8
	5C1 iii	0.203	272	21.76	0.0544	5C1 Ext iii	0.045	74.5	2.98	0.00745	15.8
	5C2 i	0.202	270.75	21.66	0.05415	5C2 Ext i	0.047	77	3.08	0.0077	15.5
	5C2 ii	0.201	269.5	21.56	0.0539	5C2 Ext ii	0.048	78.88	3.155	0.0078875	15.25
	5C2 iii	0.201	270.13	21.61	0.054025	5C2 Ext iii	0.047	77.94	3.1175	0.00779375	15.375
5C3 i	0.202	271.38	21.71	0.054275	5C3 Ext i	0.046	75.75	3.03	0.007575	15.65	
5C3 ii	0.202	270.75	21.66	0.05415	5C3 Ext ii	0.046	76.69	3.0675	0.00766875	15.525	
5C3 iii	0.202	271.06	21.685	0.0542125	5C3 Ext iii	0.046	76.22	3.04875	0.00762188	15.5875	
72	6A1 i	0.096	138.88	11.11	0.027775	6A1 Ext i	0.012	33.88	1.355	0.0033875	8.4
	6A1 ii	0.095	137.63	11.01	0.027525	6A1 Ext ii	0.014	36.38	1.455	0.0036375	8.1
	6A1 iii	0.096	138.25	11.06	0.02765	6A1 Ext iii	0.013	35.13	1.405	0.0035125	8.25
	6A2 i	0.094	136.38	10.91	0.027275	6A2 Ext i	0.014	36.38	1.455	0.0036375	8
	6A2 ii	0.095	137.63	11.01	0.027525	6A2 Ext ii	0.014	36.38	1.455	0.0036375	8.1
	6A2 iii	0.095	137	10.96	0.0274	6A2 Ext iii	0.014	36.38	1.455	0.0036375	8.05
	6A3 i	0.095	137.63	11.01	0.027525	6A3 Ext i	0.013	35.13	1.405	0.0035125	8.2
	6A3 ii	0.095	137.63	11.01	0.027525	6A3 Ext ii	0.014	36.38	1.455	0.0036375	8.1
	6A3 iii	0.095	137.63	11.01	0.027525	6A3 Ext iii	0.014	35.75	1.43	0.003575	8.15
	6B1 i	0.1	143.88	11.51	0.028775	6B1 Ext i	0.01	31.38	1.255	0.0031375	9
	6B1 ii	0.101	145.13	11.61	0.029025	6B1 Ext ii	0.009	30.13	1.205	0.0030125	9.2
	6B1 iii	0.099	142.63	11.41	0.028525	6B1 Ext iii	0.01	30.75	1.23	0.003075	8.95
	6B2 i	0.102	146.38	11.71	0.029275	6B2 Ext i	0.01	31.38	1.255	0.0031375	9.2
	6B2 ii	0.1	143.88	11.51	0.028775	6B2 Ext ii	0.013	35.13	1.405	0.0035125	8.7
	6B2 iii	0.101	145.13	11.61	0.029025	6B2 Ext iii	0.012	33.25	1.33	0.003325	8.95
	6B3 i	0.101	145.13	11.61	0.029025	6B3 Ext i	0.01	31.38	1.255	0.0031375	9.1
	6B3 ii	0.101	144.5	11.56	0.0289	6B3 Ext ii	0.011	32.63	1.305	0.0032625	8.95
	6B3 iii	0.101	144.81	11.585	0.0289625	6B3 Ext iii	0.011	32	1.28	0.0032	9.025
	6C1 i	0.098	141.38	11.31	0.028275	6C1 Ext i	0.011	32.63	1.305	0.0032625	8.7
	6C1 ii	0.1	143.88	11.51	0.028775	6C1 Ext ii	0.012	33.25	1.33	0.003325	8.85
	6C1 iii	0.099	142.63	11.41	0.028525	6C1 Ext iii	0.011	32.94	1.3175	0.00329375	8.775
	6C2 i	0.098	141.38	11.31	0.028275	6C2 Ext i	0.012	33.88	1.355	0.0033875	8.6
	6C2 ii	0.098	140.75	11.26	0.02815	6C2 Ext ii	0.014	35.75	1.43	0.003575	8.4
	6C2 iii	0.097	140.13	11.21	0.028025	6C2 Ext iii	0.013	34.81	1.3925	0.00348125	8.425
6C3 i	0.099	142.63	11.41	0.028525	6C3 Ext i	0.012	33.25	1.33	0.003325	8.75	
6C3 ii	0.098	141.06	11.285	0.0282125	6C3 Ext ii	0.013	34.5	1.38	0.00345	8.525	
6C3 iii	0.1	143.88	11.51	0.028775	6C3 Ext iii	0.012	33.88	1.355	0.0033875	8.8	

Tabla A.7: Resultados de fermentación láctica a partir de hidrólisis enzimática.

Condiciones	N° de tubos	Muestra (ml)	Solución FeCl ₃ 10 g/L (ml)	Absorbancia	Concentración ácido láctico	
					(ppm)	(g/L)
0 h	Blanco	10 ml H ₂ O	5	0	0	0
12h	A1	10	5	0.271	107.52	4.3008
	A2	10	5	0.273	108.32	4.3328
	A3	10	5	0.27	107.12	4.2848
	B1	10	5	0.274	108.72	4.3488
	B2	10	5	0.269	106.72	4.2688
	B3	10	5	0.27	107.12	4.2848
	C1	10	5	0.272	107.92	4.3168
	C2	10	5	0.273	108.32	4.3328
	C3	10	5	0.271	107.52	4.3008
24h	A1	10	5	0.413	164.32	6.5728
	A2	10	5	0.415	165.12	6.6048
	A3	10	5	0.41	163.12	6.5248
	B1	10	5	0.412	163.92	6.5568
	B2	10	5	0.411	163.52	6.5408
	B3	10	5	0.416	165.52	6.6208
	C1	10	5	0.413	164.32	6.5728
	C2	10	5	0.413	164.32	6.5728
	C3	10	5	0.414	164.72	6.5888
36h	A1	10	5	0.628	250.32	10.0128
	A2	10	5	0.629	250.72	10.0288
	A3	10	5	0.629	250.72	10.0288
	B1	10	5	0.627	249.92	9.9968
	B2	10	5	0.629	250.72	10.0288
	B3	10	5	0.625	249.12	9.9648
	C1	10	5	0.63	251.12	10.0448
	C2	10	5	0.631	251.52	10.0608
	C3	10	5	0.625	249.12	9.9648
48h	A1	10	5	0.723	288.32	11.5328
	A2	10	5	0.724	288.72	11.5488
	A3	10	5	0.724	288.72	11.5488
	B1	10	5	0.726	289.52	11.5808
	B2	10	5	0.725	289.12	11.5648
	B3	10	5	0.722	287.92	11.5168
	C1	10	5	0.726	289.52	11.5808
	C2	10	5	0.723	288.32	11.5328
	C3	10	5	0.723	288.32	11.5328

Continúa...

Tabla A.7.a: Resultados de fermentación láctica a partir de hidrólisis enzimática.

Condiciones	N° de tubos	Muestra (ml)	Solución FeCl3 10 g/L (ml)	Absorbancia	Concentración ácido láctico	
					(ppm)	(g/L)
60h	A1	10	5	0.784	312.72	12.5088
	A2	10	5	0.787	313.92	12.5568
	A3	10	5	0.79	315.12	12.6048
	B1	10	5	0.785	313.12	12.5248
	B2	10	5	0.786	313.52	12.5408
	B3	10	5	0.784	312.72	12.5088
	C1	10	5	0.78	311.12	12.4448
	C2	10	5	0.781	311.52	12.4608
	C3	10	5	0.785	313.12	12.5248
72h	A1	10	5	0.857	341.92	13.6768
	A2	10	5	0.855	341.12	13.6448
	A3	10	5	0.856	341.52	13.6608
	B1	10	5	0.857	341.92	13.6768
	B2	10	5	0.858	342.32	13.6928
	B3	10	5	0.854	340.72	13.6288
	C1	10	5	0.855	341.12	13.6448
	C2	10	5	0.859	342.72	13.7088
	C3	10	5	0.859	342.72	13.7088
84h	A1	10	5	0.859	342.72	13.7088
	A2	10	5	0.858	342.32	13.6928
	A3	10	5	0.86	343.12	13.7248
	B1	10	5	0.853	340.32	13.6128
	B2	10	5	0.86	343.12	13.7248
	B3	10	5	0.854	340.72	13.6288
	C1	10	5	0.855	341.12	13.6448
	C2	10	5	0.855	341.12	13.6448
	C3	10	5	0.855	341.12	13.6448
96h	A1	10	5	0.856	341.52	13.6608
	A2	10	5	0.861	343.52	13.7408
	A3	10	5	0.855	341.12	13.6448
	B1	10	5	0.856	341.52	13.6608
	B2	10	5	0.862	343.92	13.7568
	B3	10	5	0.852	339.92	13.5968
	C1	10	5	0.859	342.72	13.7088
	C2	10	5	0.853	340.32	13.6128
	C3	10	5	0.856	341.52	13.6608

Continúa...

Tabla A.7.b: Resultados de fermentación láctica a partir de hidrólisis enzimática.

Condiciones	N° de tubos	Muestra (ml)	Solución FeCl ₃ 10 g/L (ml)	Absorbancia	Concentración ácido láctico	
					(ppm)	(g/L)
108h	A1	10	5	0.853	340.32	13.6128
	A2	10	5	0.853	340.32	13.6128
	A3	10	5	0.857	341.92	13.6768
	B1	10	5	0.857	341.92	13.6768
	B2	10	5	0.862	343.92	13.7568
	B3	10	5	0.863	344.32	13.7728
	C1	10	5	0.852	339.92	13.5968
	C2	10	5	0.853	340.32	13.6128
	C3	10	5	0.854	340.72	13.6288
120h	A1	10	5	0.854	340.72	13.6288
	A2	10	5	0.858	342.32	13.6928
	A3	10	5	0.854	340.72	13.6288
	B1	10	5	0.854	340.72	13.6288
	B2	10	5	0.854	340.72	13.6288
	B3	10	5	0.855	341.12	13.6448
	C1	10	5	0.857	341.92	13.6768
	C2	10	5	0.861	343.52	13.7408
	C3	10	5	0.86	343.12	13.7248

ANEXO 4: Datos técnicos de reactivos utilizados.

Tabla A.8: Datos técnicos de reactivos utilizados en el Trabajo de Graduación.

Nombre del Reactivo	Componentes/ Fórmula química	Función dentro de la experimentación
Caldo Sabouraud 2% dextrosa.	Composición típica en g/L Peptona a partir de carne 5.0, Peptona a partir de caseína 5.0, D(+) Glucosa 20.0.	Utilizado para la etapa de inoculación del microorganismo <i>Aspergillus oryzae</i> .
Agar Sabouraud 4% dextrosa	Composición típica en g/L Peptona a partir de carne 5.0, Peptona a partir de caseína 5.0, D(+) Glucosa 40.0, Agar-agar 15.0.	Utilizado para la etapa de inoculación del microorganismo <i>Aspergillus oryzae</i> .
Extracto de levadura.	Contiene Nitrógeno amino 4.76%, Cenizas 14%, Materia seca 95.1%, Cloruro de Sodio 0.36%, Total de Nitrógeno 10.80%.	Utilizado para la etapa de inoculación de los microorganismos <i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .
Caldo M.R.S.	Composición en g/L Proteosa peptona 10.0, Extracto de carne 10.0, Extracto de levadura 5.0, Dextrosa 20.0, Polisorbato 80 1.0, Citrato de amonio 2.0, Acetato de sodio 5.0, Sulfato de magnesio 0.1, Sulfato de manganeso 0.05, Fosfato dipotásico 2.0., pH final a 25°C 6.5.	Utilizado para la etapa de inoculación del microorganismo <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .
Agar M.R.S.	Composición en g/L Extracto de carne 8.0, Peptona A 10.0, Extracto de levadura 5.0, Citrato de amonio 2.0, Acetato de sodio 5.0, Sulfato de magnesio heptahidratado 0.2, Sulfato de manganeso tetrahidratado 0.05, Fosfato dipotásico 2.0., Anhidroglucosa 1.0, Polisorbato 80 1.0, Agar 12.0, pH final a 25°C 5.7.	Utilizado para la etapa de inoculación del microorganismo <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .
Fenol	Fórmula química: C ₆ H ₅ OH Peso molecular: 94.11 g/mol, Densidad 1.07 g/ml.	Utilizado para la determinación de carbohidratos totales.

Continúa...

Tabla A.8.a: Datos técnicos de reactivos utilizados en el Trabajo de Graduación.

Nombre del Reactivo	Componentes/ Fórmula química	Función dentro de la experimentación
Ácido Sulfúrico	Fórmula química: H ₂ SO ₄ , Peso molecular: 98.079 g/mol, Densidad 1.84 g/ml.	Utilizado para la determinación de carbohidratos totales, para la hidrólisis ácida de la cáscara de plátano verde y la cuantificación de ácido láctico producido.
Glucosa monohidratada	Fórmula química: CH ₂ OH(CHOH) ₄ CHO · H ₂ O Contiene: Metales pesados ≤0.0005%, Maltosa ≤0.2%, Agua 8-10%.	Utilizada para la determinación de carbohidratos totales y azúcares reductores.
Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	Fórmula: C ₇ H ₄ N ₂ O ₇ . Peso molecular: 228.12 g/mol, Pureza (HPLC) ≥97.5%	Utilizado para la determinación de azúcares reductores.
Patrón almidón de papa	Contiene almidón hidrolizado de papa.	Utilizado para la determinación de azúcares reductores.
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	Fórmula química: FeCl ₃ ·6H ₂ O, Peso molecular: 270.195 g/mol,	Utilizado para la determinación colorimétrica de ácido láctico.
Ácido láctico	Fórmula química: C ₃ H ₆ O ₃ , Peso molecular: 90.08 g/mol,	Utilizado para la determinación colorimétrica de ácido láctico.