

**EXTRACCIÓN Y FERMENTACIÓN DE ALMIDÓN DEL PLÁTANO (PULPA)  
CADUCO, PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO CON UN BAL (BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS) PARA SU POSIBLE USO EN LA FABRICACIÓN DE ÁCIDO  
POLILÁCTICO (PLA)**

**Juan Alberto Correa Rubio**

**Código: 1094277876**



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER- COLOMBIA  
2019**

**EXTRACI3N Y FERMENTACI3N DE ALMID3N DEL PL3TANO (PULPA)  
CADUCO, PARA LA OBTENCI3N DE 3CIDO L3CTICO CON UN BAL (BACTERIAS  
3CIDO L3CTICAS) PARA SU POSIBLE USO EN LA FABRICACI3N DE 3CIDO  
POLIL3CTICO (PLA)**

Trabajo presentado para optar por el t3tulo de Ingeniero Qu3mico por:

**Juan Alberto Correa Rubio**

**C3digo:** 1094277876

**Director:**

3ngela Maritza Cajiao Pedraza

**Cotutor:**

Daissy Lorena Restrepo



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA  
FACULTAD DE INGENIER3AS Y ARQUITECTURA  
PROGRAMA DE INGENIER3A QU3MICA  
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER- COLOMBIA  
2019**

# CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	
1. OBJETIVOS.....	12
1.1 GENERAL.....	12
1.2 ESPECIFICOS.....	12
2. ALCANCE.....	13
3. INTRODUCCIÓN.....	14
3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
3.2 ÁCIDO LÁCTICO: OBTENCIÓN, APLICACIÓN E INVESTIGACIONES.....	18
3.3 MARCO TEÓRICO.....	20
3.3.1 Plátano: Generalidades.....	20
3.3.2 Almidón y caracterización.....	21
3.3.3 Hidrólisis Enzimática.....	26
3.3.4 Fermentación láctica.....	27
3.3.5 Microorganismos para la fermentación ácido láctica.....	28
4. METODOLOGÍA.....	30
4.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE PLÁTANO.....	30
4.1.1 Obtención del almidón del plátano.....	30
4.1.2 Molienda y tamizado .....	31
4.1.3 Caracterización del almidón del plátano.....	31
4.1.3.1 Materia Seca.....	31
4.1.3.2 Pulpa o Fibra.....	32

4.1.3.3 Cenizas y Humedad .....	32
4.1.3.4 Acidez y pH .....	32
4.1.3.5 Color.....	32
4.1.3.6 Densidad aparente y empacada. ....	33
4.1.3.7 Índice de absorción, solubilidad y poder de hinchamiento.....	33
4.1.3.8 Temperatura de Gelatinización.....	33
4.2 AISLAMIENTO, CULTIVO, CONTEO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ÁCIDO LÁCTICOS.....	34
4.3 MÉTODO DE CURVA DE CLORURO FÉRRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	34
4.3.1 Preparación de la curva de ácido láctico y la solución de cloruro férrico.....	35
4.4 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA EL ALMIDÓN .....	35
4.5 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN (HIDROLIZADO Y NO HIDROLIZADO) A ÁCIDO LÁCTICO.....	36
4.6 CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1 Obtención del almidón.....	38
5.2 Caracterización del almidón.....	39
5.3 Aislamiento, cultivo y conteo de los microorganismos ácido lácticos.....	40
5.4 Evaluación de las condiciones óptimas de fermentación para el almidón.....	41
5.4.1 Seguimiento de pH.....	42
5.4.2 Producción de AL a través del tiempo.....	43
5.4.3 Rendimientos de ácido lácticos.....	44
5.5 Fermentación del almidón (hidrolizado y no hidrolizado).....	46
5.6 Caracterización y cuantificación del ácido láctico.....	48

5.7 Proceso para la obtención de ácido láctico con microorganismos aislados de yogurt.....	49
6. CONCLUSIONES.....	51
7. RECOMENDACIONES.....	53
8. REFERENCIAS.....	54
ANEXOS.....	60

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Propiedades fisicoquímicas del ácido Láctico.....	18
<b>Tabla 2.</b> Valores ppm vs absorbancia curva ácido láctico.....	35
<b>Tabla 3.</b> Rendimientos de Almidón.....	38
<b>Tabla 4.</b> Propiedades fisicoquímicas almidón de plátano.....	39
<b>Tabla 5.</b> Conteo de colonias (bacterias del yogurt y liofilizadas).....	40
<b>Tabla 6.</b> Propiedades del ácido láctico.....	48

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.</b> Molécula de Amilosa.....	22
<b>Figura 2.</b> Molécula de Amilopectina.....	23
<b>Figura 3.</b> Reacción de hidrólisis.....	26
<b>Figura 4.</b> Tamizado del almidón.....	31
<b>Figura 5.</b> Evaluación de las condiciones de fermentación.....	36
<b>Figura 6.</b> Fermentación en medios hidrolizados y no hidrolizado.....	37
<b>Figura 7.</b> Cultivos liofilizados y aislados de yogurt .....	40
<b>Figura 8.</b> Microscopia cultivos liofilizados(a) y aislados de yogurt (b).....	41
<b>Figura 9.</b> pH vs Tiempo (yogurt).....	42
<b>Figura 10.</b> pH vs tiempo (liofilizados).....	42
<b>Figura 11.</b> Producción A.L vs tiempo (yogurt).....	43
<b>Figura 12.</b> Producción A.L vs tiempo (Liofilizadas).....	43
<b>Figura 13.</b> Rendimientos A.L vs tiempo (yogurt).....	44
<b>Figura 14.</b> Rendimientos A.L vs tiempo (Liofilizadas).....	44
<b>Figura 15.</b> Producción A.L;pH vs tiempo (yogurt).....	47
<b>Figura 16.</b> Comparación de rendimientos hidrolizados y no hidrolizado.....	47
<b>Figura 17.</b> Diagrama de flujo proceso de obtención de ácido láctico.....	49

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
<b>ANEXO 1.</b> Metodología obtención del almidón.....	61
<b>ANEXO 2.</b> Ficha Técnica de los tamices.....	62
<b>ANEXO 3.</b> Estandarización de microorganismos (Akerberg; 1998).....	63
<b>ANEXO 4.</b> Preparación curva de calibración.....	63
<b>ANEXO 5.</b> Color de almidón.....	64
<b>ANEXO 6.</b> Valores de medidas de pH.....	65
<b>ANEXO 7.</b> Montaje de destilación para el ácido láctico.....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APL</b>	Ácido poliláctico
<b>h</b>	Horas
<b>HPLC</b>	Cromatografía liquida de alta resolución
<b>BAL</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MRS</b>	Man Rogosa y Shape
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno
<b>A.L</b>	Ácido Láctico
<b>Mg</b>	Miligramos
<b>SPC</b>	Plate count agar
<b>Lb</b>	<i>Lactobacillus</i>

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó un proceso para la obtención de ácido láctico a través de la fermentación de almidón extraído del plátano usando bacterias ácido lácticas aisladas de yogurt artesanal y cepas comerciales; el proceso consistió en cuatro etapas fundamentales; la obtención del almidón de plátano a través del método en seco, la segunda caracterización del almidón, la tercera etapa el aislamiento-cultivo-conteo y caracterización de las bacterias ácido lácticas implementadas en el proceso y como última etapa la fermentación del almidón. El proceso de fermentación se realizó a nivel de laboratorio en medios de almidón hidrolizado y no hidrolizado, en los cuales se hizo un seguimiento de pH; y medición de absorbancia por el método colorimétrico de cloruro férrico cada 6 horas por 30 horas, para cuantificar de la producción de ácido láctico derivado del proceso fermentativo. El caldo fermentado se filtró y destiló para extraer el ácido láctico y así determinar su concentración y realizar su caracterización. Como resultados se considera la materia prima propuesta como buena fuente de almidón, ya que se obtuvo un rendimiento promedio de 41,89 %, comparados con valores obtenidos en estudios de método de extracción en seco para cultivos de plátano en Colombia y una caracterización acertada comparando los resultados con valores de la literatura. El ácido láctico obtenido presentó una concentración de 1,147 mg/L determinada a través de la curva de calibración, apoyado en los resultados se considera apropiado el proceso planteado y el ácido láctico obtenido como precursor para la fabricación de ácido poliláctico.

Palabras clave: almidón, rendimientos, caracterización, fermentación láctica, ácido láctico.

## ABSTRACT

In the following work, it aims to evaluate a process for obtaining lactic acid through the fermentation of starch extracted from plantains, using lactic acid bacteria isolated from artisanal yogurt and commercial strains; the process consisted of four fundamental stages; obtaining banana starch through the dry method, the second characterization of starch, the third stage the isolation-culture-count and characterization of the lactic acid bacteria implemented in the process and as the last stage the fermentation of the starch. The fermentation process was carried out at the laboratory level in hydrolyzed and non-hydrolyzed starch media, in which pH was tracked; and measurement of absorbance by the colorimetric method of ferric chloride every 6 hours for 30 hours, to quantify the production of lactic acid derived from the fermenting process. The fermented broth was filtered and distilled to extract the lactic acid to determine its concentration and perform its characterization. The proposed raw material is considered as a good source of starch, as an average yield of 41.89% was obtained, compared to values obtained in dry extraction method studies for banana crops in Colombia and a correct characterization by comparing the results with values from the literature. The lactic acid obtained presented a concentration of 1,147 mg/L determined through the calibration curve, supported by the results is considered appropriate the process proposed and the lactic acid obtained as a precursor for the manufacture of polylactic acid.

Key words: starch, yields, characterization, lactic acid fermentation, lactic acid.

# 1. OBJETIVOS

## 1.1 GENERAL

Plantear un posible proceso sostenible para la obtención de ácido láctico aprovechando los residuos postcosecha de plátano del sector agrícola en Colombia, y obtener como producto un ácido láctico de uso industrial destinado principalmente para la síntesis del biopolímero PLA (ácido poliláctico).

## 1.2 ESPECIFICOS

- Evaluar los rendimientos y caracterizar el almidón obtenido a partir de residuos postcosecha de plátano proveniente de la región de Norte de Santander.
- Aislar, estudiar y comparar la adaptabilidad de las bacterias ácido láctico liofilizado comercial y bacterias ácido lácticas aisladas del yogurt en medios ricos en almidón.
- Evaluar y contrastar el rendimiento del ácido láctico con los cultivos en almidón hidrolizado y no hidrolizado, respectivamente.
- Evaluar las características fisicoquímicas posibles del ácido láctico obtenido del almidón de plátano como precursor de un biopolímero.

## **2. ALCANCE**

El alcance de la investigación se enfoca en determinar la factibilidad del proceso planteado, el cual está enmarcado en cuatro etapas, primera la extracción y caracterización de almidón del plátano; la segunda el aislamiento y caracterización de los microorganismos lácticos; como tercera etapa la fermentación del almidón con los microorganismos evaluar las condiciones óptimas de fermentación y los respectivos rendimientos en los dos medios de fermentación estudiados, y por último la caracterización del ácido láctico obtenido determinando su grado de concentración a través de una curva de calibración.

### 3. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico fue el primer ácido orgánico en ser producido a escala industrial en el año 1880 y desde entonces su demanda en forma monomérica se ha incrementado dramáticamente para la síntesis de ácido poliláctico (APL) (Joan et al., 2012; Mohamed et al., 2010; Harington y Hossain, 2008). El ácido láctico puede ser producido industrialmente a través de la fermentación microbiana o mediante la síntesis química. La ventaja de la fermentación microbiana sobre la síntesis química radica en que se obtiene un ácido láctico más puro o uniforme, haciendo referencia a sus isómeros ópticos puro (D y L), ya que la síntesis química genera una mezcla de ambos isómeros, lo cual hace tener un ácido láctico con características poco estables o uniformes. Otra ventaja importante sobre el método químico es el uso de materias primas baratas como desechos orgánicos ricos en almidón y polisacáridos sin almidón (Cuong et al., 2013; Wee y Kim, 2013; Abdel-Rahman et al., 2011).

El plátano es un alimento rico en almidón, por lo cual podría representar un gran potencial para la fabricación de ácido láctico a partir de él. En Colombia se estimó que para los años 2015 había aproximadamente un total de 448,958 hectáreas sembradas de cultivo de plátano, teniendo el departamento del Norte de Santander el 2,7 % de la participación con un área sembrada que iba alrededor de las 11,931 hectáreas de cultivo, por lo cual, es un departamento con potencial para el estudio del proyecto. Los almidones están formados por gránulos de diferentes tamaños (diámetros entre 10 a 100  $\mu\text{m}$ ) y formas (redonda, elíptica, ovalada, lenticular o poligonal) dependiendo de la fuente biológica de donde provengan y son parcialmente semicristalinos e insolubles en agua a temperatura ambiente (Bello et al., 1998; Vandeputte y Delcour, 2004). Su contenido de amilosa y amilopectina, temperatura de

gelatinización, consistencia del gel y textura, comportamiento viscoso y propiedades térmicas, permite su utilización en la industria alimenticia como estabilizante, agente de relleno, adhesivo, ligante, en turbante, formador de películas, estabilizante de espumas, agente de antienviejamiento de pan, gelificante, glaseante, humectante y espesante (Singh et al., 2005).

El estudio y el conocimiento de las fermentaciones bacterianas tienen importancia práctica, porque proporciona productos industriales que son útiles en el laboratorio para identificar las diferentes especies. Entonces, según los productos finales, tenemos diferentes tipos de fermentación: alcohólica, homoláctica, heteroláctica, del ácido propiónico, ácido mixta, de butanodiol y del ácido butírico. La fermentación homoláctica es generada todos los miembros del género *Streptococcus*, *Pediococcus* y muchas especies de *Lactobacillus* fermentan la glucosa fundamentalmente a ácido láctico con poca acumulación de otros productos finales. En esta reacción el piruvato se reduce a ácido láctico por acción de la enzima láctica, actuando el Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH) como dador de electrones. Esto ocurre en la tercer etapa de la vía glucolítica.

El presente estudio plantea la evaluación del aprovechamiento de los residuos postcosecha de plátano como materia prima, para proporcionar un proceso económico y eficiente en la fermentación del almidón de plátano usando bacterias ácido lácticas principalmente de del género *Lactobacillus*, aisladas de yogurt artesanal y microorganismos liofilizados comerciales, para comparar resultados, también se busca evaluar la adaptación de estos microorganismos en medios hidrolizados y no hidrolizados comparando rendimientos para determinar así, si es

necesario o no implementar la hidrólisis enzimática en el proceso y reducir costos en el proceso, se espera obtener un ácido láctico de alta pureza.

### **3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN**

Actualmente el uso de energías renovables es más que una alternativa para contrarrestar el impacto ambiental generado por el uso excesivo de los combustibles fósiles, uno de los principales contaminantes derivados de las fuentes fósiles son los polímeros sintéticos, los cuales son utilizados a diario en empaques para diversos usos comerciales, estos se convierten en un factor negativo al ambiente debido a que su tiempo de degradación es muy lenta en el ambiente llegando a provocar la obstrucción de alcantarillas, contaminación en los ríos, mortandad de peces, riesgos en la salud del ser humano, el cambio climático, efecto invernadero. Al presente se han utilizado políticas donde se prohíbe el uso de estos polímeros sintéticos, por lo cual hace necesario investigar materiales que satisfagan estas necesidades sin generar algún tipo de contaminación.

En la actualidad a través de la investigación biotecnológica se ha logrado descubrir que es posible desarrollar un plástico biodegradable a partir de materias primas orgánicas que proceden de fuentes renovables, como el plátano, la yuca, la celulosa, las legumbres que contienen grandes cantidades de ácido láctico y polisacáridos. Algunas plantas a nivel industriales ubicadas en Estados Unidos y Europa producen este plástico biodegradable, pero presenta un coste de producción muy elevado, por lo cual hace necesario investigar en países como Colombia que son productores de materia orgánica como el plátano, la posibilidad de aprovechar estos residuos y brindar así nuevas rutas biotecnológicas que ayuden en la producción de este material biodegradable. La fabricación de ácido poliláctico ha tenido gran



acrecentamiento en la última década, sobre todo porque es un polímero biodegradable con diversas aplicaciones industriales y médicas muy importantes.

Este biopolímero se obtiene de la polimerización del ácido láctico, monómero producido biotecnológicamente a partir de sustratos como glucosa, lactosa, almidón, y celulosa, que son de alto costo, lo que coloca el proceso en desventajas frente a otras fuentes de producción de biopolímeros y polímeros derivados del petróleo, sin embargo para disminuir costos de producción se han inducido nuevas investigaciones para encontrar fuentes y sustratos viables y más económicos (Serna & Albán, 2011).

Estudios actuales en el marco de la región han evaluado otros medios de obtención de ácido láctico para su polimerización, como es el caso de (Tejado Ronald,2015).Donde se estudia el almidón de ñame como precursor de ácido láctico, usando microorganismos ácido lácticos específicos, además se evalúa la polimerización de este ácido láctico, en este estudio se logró obtener un ácido láctico de una concentración del 16.26% determinada por HPLC, considerando apropiado el almidón de ñame y los microorganismos utilizados para la obtención del ácido láctico. El tiempo de reacción de la poli condensación se completó en 13 horas; al término del cual se le realizó un análisis Infrarrojo (IR) al producto obtenido y en consecuencia de este, dada la ausencia de un pico característico en la longitud de onda del grupo alquilo CH<sub>3</sub>-CH, se descarta la posibilidad de considerar que el producto obtenido en la presente investigación fuera ácido poliláctico (APL).

### 3.2 ÁCIDO LÁCTICO: OBTENCIÓN, APLICACIÓN E INVESTIGACIONES

El ácido láctico o ácido 2-hidroxiopropanoico, es un compuesto muy versátil utilizado en las industrias química, farmacéutica, de alimentos y del plástico. Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littleton inicia la fermentación a escala industrial (Suriderp, 1995; Parés et al., 1997). El ácido láctico tiene un carbono asimétrico lo cual da lugar a actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D (-) láctico y L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas L (+) y D (-). A diferencia del isómero D (-), la configuración L (+) es metabolizada por el organismo humano. Tanto las dos formas ópticamente activas como la forma racémica se encuentran en estado líquido, siendo incoloros y solubles en agua. Las propiedades fisicoquímicas del ácido láctico se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido Láctico (tomado de Dean 1987)**

Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08
Índice de refracción	1,4414
Punto de fusión	L(+) y D(-): 52,8 a 54°C DL (según composición): 16,8 a 33°C
Punto de ebullición	125 –140°C
Gravedad específica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40,33 mNsm <sup>-2</sup>
Densidad	1,249
Constante dieléctrica	22 ε

El ácido láctico y sus derivados como sales y ésteres son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, química, farmacéutica, del plástico, textil, la agricultura, alimentación animal entre otros (Chan-Blanco et al., 2003; Boonmee, 2003; Kourkoutas et al., 2004; Suriderp, 1995). En la industria alimenticia se usa como acidulante y conservante. Las industrias

químicas lo utilizan como solubilizador y como agente controlador de pH. En las curtiembres es utilizado para remojar los cueros. En la producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como solvente biodegradable. En la industria farmacéutica, sus sales de hierro y calcio tienen un importante uso en la producción de drogas. En la industria textil ayuda en el teñido e impresión. En la agricultura se utiliza como acidulante ( Suriderp, 1995 ) y en la industria de plásticos es utilizado como precursor del ácido poliláctico ( PLA ), un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y la medicina; se considera que ésta es la principal aplicación del ácido y la causa por la cual ha aumentado considerablemente su demanda (Chang et al., 1999; Danner et al., 2002; Hujanen et al., 1996, 2001; Litchfield, 1996; Park et al., 2004; Vick Roy, 1985 ).

La obtención de ácido láctico a través de medios fermentativos de ha evaluado en diferentes tipos de almidones, como nos muestra el siguiente estudio (Ortíz, Camilo; Ospina, Lizeth; Sánchez, Sara,2014).Aquí se evaluó la producción de ácido láctico a partir de almidón de yuca, este proceso implemento un BAL(bacterias ácido lácticas) aisladas de yogurt comercial Alpina ®, los medios de fermentación fueron todos hidrolizados para aumentar la concentración de glucosa y facilitar el trabajo enzimático de las bacterias, las concentraciones de sustrato implementadas fueron de 60, 90 y 120 g/L. La mayor concentración de ácido láctico fue de 51,15 g/L obtenida al tercer día de fermentación con una concentración de almidón de yuca hidrolizado de 120 g/L. El máximo rendimiento se obtuvo a una concentración de 60 g/L al tercer día de fermentación, con un valor igual a 84,81 % (mol/mol) o 42,03% (g/g) teniendo como base el sustrato hidrolizado (glucosa).

### 3.3 MARCO TEÓRICO

#### 3.3.1 Plátano: Generalidades

El plátano es una planta herbácea monocotiledónea, de la familia *Musaceae*, originaria del sudeste asiático y traída a nuestro país por los españoles en el siglo XVI (Corpoica, 2006). Es considerado el cuarto cultivo más importante del mundo, por tratarse de un producto básico y de exportación, fuente de empleo e ingresos en numerosos países del trópico y subtrópico. Las variedades de plátano cultivadas en Colombia son: dominico-hartón, dominico, hartón, peli pita, morado, cachaco, popocho, pompo, maqueño, guineo y trucho (Universidad Nacional de Colombia, 2007). Este es un producto muy importante en la canasta de los alimentos que consumen los colombianos; en el IPC de los alimentos está ubicado en el grupo de los tubérculos, raíces y plátanos, donde tiene un peso del 33%. De esta forma, en el presente artículo se adelantará una descripción de las condiciones necesarias para el cultivo del plátano, asimismo de su proceso productivo, teniendo en cuenta las diferentes etapas como obtención de la semilla, establecimiento del cultivo, manejo del cultivo, control integrado de plagas y enfermedades, cosecha y postcosecha.

#### **Condiciones agroecológicas para el cultivo del plátano:**

**Altitud:** Es una condición que determina el periodo vegetativo del plátano de acuerdo con la variedad, adaptándose en un amplio rango que va desde los cero metros hasta los 2000 msnm (Universidad de Córdoba, 2011).

**Temperatura:** Es un factor que determina la frecuencia de emisión de las hojas y de ella depende que el periodo vegetativo de la planta sea más largo o más corto.

**Precipitación:** El cultivo del plátano requiere, para su normal desarrollo y buena producción, precipitaciones bien distribuidas durante el año. Vientos: No se recomienda establecer el

cultivo en zonas que presenten fuertes vientos, superiores a los 20 kilómetros/hora, dado que causan daños en las hojas como doblamiento o rotura, afectando la producción.

**Humedad relativa:** La humedad relativa del ambiente debe ser adecuada (75-80 %), dado que condiciones de alta humedad podrían favorecer la presencia de enfermedades causadas por hongos (Corpoica, 2006).

**Luminosidad:** Se debe contar con buena cantidad de luz día, para que las plantas se desarrollen adecuadamente (hojas, racimos, yemas o brotes laterales). En el caso contrario, la baja disponibilidad de luz retrasa la producción y afecta la calidad del fruto (Universidad de Córdoba, 2011).

**Suelo:** El plátano requiere de suelos con topografía ondulada a plana, profunda, bien drenada, fértil y con buena cantidad de materia orgánica, de texturas medias y sueltas (franco arenoso a franco-arcillo-arenosos). En la tabla 1 se presentan los rangos óptimos para el desarrollo del cultivo de plátano de acuerdo con la variedad. (Dane)

### **3.3.2 Almidón y caracterización**

El almidón es una materia prima con un amplio campo de aplicaciones que van desde la impartición de textura y consistencia en alimentos hasta la manufactura de papel, adhesivos y empaques biodegradables (Zhao; Whistler, 1994). Debido a que el almidón es el polisacárido más utilizado como ingrediente funcional (espesante, estabilizante y gelificante) en la industria alimentaria, es necesario buscar nuevas fuentes de extracción, ya que con una producción mundial de 48,5 millones de ton/año (Faostat, 2001), existe una demanda insatisfecha del mismo. De las calorías consumidas por los humanos, cerca del 70 al 80% provienen del almidón. Es la principal fuente de almacenamiento de energía en los vegetales, ya que se encuentra en grandes cantidades en las diversas variedades de plantas, como, por

ejemplo, en los granos de cereales, los cuales contienen entre 60 y 75% de su peso seco de almidón, así como también, puede encontrarse en tubérculos, semillas de leguminosas y en algunas frutas, y su concentración varía con el estado de madurez de los mismos (Thomas; Atwell, 1999).

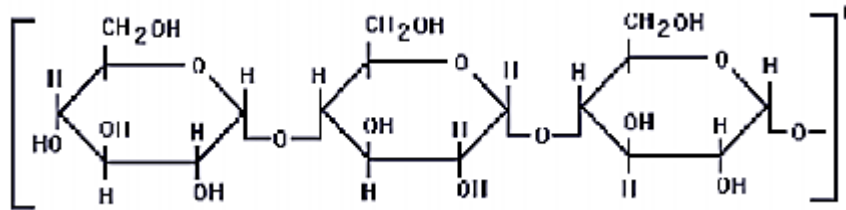


Figura 1. Molécula de Amilosa

Estructuralmente, el almidón consiste de dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4), en el cual algunos enlaces  $\alpha$  (1-6) pueden estar presentes. Esta molécula no es soluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal que es capaz de desarrollar un color azul por la formación de un complejo con el yodo (Knutzon; Grove, 1994). Mientras que la amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces  $\alpha$  (1-4) y en un 4-6% con uniones  $\alpha$  (1-6). Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente a cada 15-25 unidades de glucosa. Los almidones nativos de las diferentes especies de vegetales tienen como característica fundamental que sus propiedades fisicoquímicas y funcionales estarán influenciadas por sus estructuras granular y molecular (Wang; White, 1994a). Las propiedades más importantes a considerar para determinar la utilización del almidón en la elaboración de alimentos y otras aplicaciones industriales

incluyen las fisicoquímicas: gelatinización y retrogradación; y las funcionales: solubilidad, hinchamiento, absorción de agua, sinéresis y comportamiento reológico.

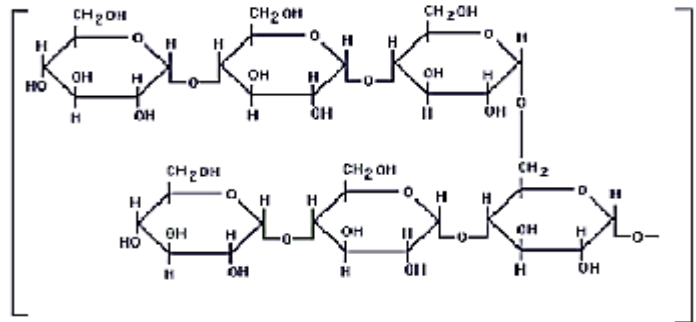


Figura 2. Molécula de Amilopectina

### Materia Seca

La pérdida en peso durante el periodo de calentamiento es considerado igual al contenido de materia seca en los almidones y se calcula con a través de la ecuación 1.

$$\% \text{ materia seca} = \frac{100 \times (P_3 - P_1)}{(P_2 - P_1)}$$

Ecuación 1. Porcentaje materia seca

### Pulpa o Fibra

Esta prueba permite determinar con relativa facilidad la presencia de pequeñas cantidades de fibra en el almidón. El volumen del sedimento medido depende, en cierto modo, de la finura de la fibra. La presencia de cualquier indicio de fibra, pulpa u otra impureza son determinadas por medio de una hidrólisis acida moderada del residuo de la muestra y su valor se determina a través de la ecuación 2.

$$\text{Pulpa (\%)} = \frac{[(\text{Peso de crisol después de secado (g)} - \text{peso de crisol vacío (g)}) \times 100]}{\text{Peso de muestra analizada (g)}}$$

Ecuación 2. Porcentaje pulpa

## **Cenizas y Humedad**

Este método analítico proporciona una estimación del material mineral presente en la muestra de almidón incluyendo metales, sales y trazas de elementos; y el porcentaje de humedad contenido en la muestra; se utiliza la pérdida gravimétrica por calentamiento.

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{\text{Peso de las cenizas (g)} \times 100}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

**Ecuación 3. Porcentajes cenizas y humedad.**

## **Acidez y pH**

El valor de pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una muestra, mientras que la acidez titulable es una medida de la cantidad de ácido presente. El pH es medido con un medidor de pH y la acidez titulable es determinada por titulación con hidróxido de sodio en el cambio final con fenolftaleína y es calculado por la presencia de ácidos presentes, como ácido láctico.

## **Color**

El método descrito es una determinación cualitativa y es útil en el campo: el grado de brillantez o blancura del almidón se compara visualmente con el de otro tomado como patrón que debe ser de primera calidad. La dificultad de conseguir almidón de blancura uniforme y que se conserve sin estropearse durante un tiempo suficientemente largo es un notable inconveniente. Actualmente, se usan técnicas espectrofotométricas donde se obtiene un resultado objetivo y exacto para la determinación cuantitativa de la blancura del almidón mediante la comparación de su grado de reflectividad respecto a la de un patrón de blancura como el sulfato de bario.



### **Densidad aparente y empacada**

La densidad aparente del almidón puede ser determinada utilizando la relación entre el peso del almidón que ocupa un volumen conocido. Se puede determinar en dos formas: con el almidón suelto y con el almidón empacado.

### **Índice de absorción, solubilidad y poder de hinchamiento**

Cuando se calienta una suspensión acuosa de almidón, los gránulos se hinchan por una absorción progresiva e irreversible de agua aumentando su tamaño. La determinación de estos índices se mide aprovechando la capacidad de absorción del agua del granulo de almidón y la exudación de fracciones de almidón a medida que se incrementa la temperatura de las suspensiones de almidón.

$$\text{Índice de absorción de agua (IAA)} = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g) bs}}$$

**Ecuación 4. Índice de absorción de agua**

$$\text{Índice de solubilidad en agua (ISA)} = \frac{\text{Peso solubles (g)} \times V \times 10}{\text{Peso muestra (g) bs}}$$

**Ecuación 5. Índice de solubilidad de agua**

$$\text{Poder de hinchamiento (PH)} = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso muestra (g) bs} - \text{Peso solubles (g)}}$$

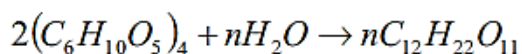
**Ecuación 6. Poder de hinchamiento**

### **Temperatura de Gelatinización**

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría; cuando se calientan en solución a temperaturas altas alcanzan una temperatura específica en la cual se inicia el hinchamiento de los gránulos. Esta temperatura es llamada temperatura de gelatinización.

### 3.3.3 Hidrólisis Enzimática

La sacarificación es la operación que permite la transformación del almidón a azúcares fermentables, por lo general son: sacarosa, glucosa, maltosa y levulosa. Se puede realizar por medios químicos y enzimáticos, o acción microbiana. En la hidrólisis enzimática por acción de las enzimas las más comunes son: *alfa* y *beta* amilasa. Para una eficiente hidrólisis enzimática del almidón por las amilasas conviene que esté gelatinizado, por esta razón se realiza un cocimiento del almidón antes de la adición de dichas enzimas:



**Figura 3. Reacción de hidrólisis**

La  $\alpha$ -amilasa, también conocida como  $\alpha$ -1,4glucanohidrolasa; es una glucanasa endoactiva que catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces  $\alpha$ -(1,4) glicosídicos de la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina excepto en las proximidades de los puntos de ramificación (Van Der Maarel, Marc J.E.C.). La hidrólisis de la amilopectina por esta enzima produce glucosa, maltosa y una serie de dextrinas que contienen enlaces ramificados conformados por 4 o más residuos de moléculas de glucosa que presentan enlaces  $\alpha$ -1,6 provenientes de las uniones glucosídicas de la estructura original.

Amiloglucosidasa (AMG) conocida como glucoamilasa o amiloglucosidasa, es empleada en la producción de jarabes glucosados, ya que tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ - 1,4 de extremos no reductores de polisacáridos para la formación de glucosa. Esta - 9 - enzima también posee la capacidad de hidrolizar enlaces  $\alpha$ -1,6 a más baja velocidad, pudiéndose

completar la hidrólisis de almidón con la combinación de las tres enzimas  $\alpha$ -amilasa, pululanasa y AMG de manera completa.

### 3.3.4 Fermentación láctica

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 aumenta la temperatura o se fermentan azúcares diferentes a la glucosa; en estos casos, la diferencia radica en el metabolismo del piruvato, el cual además de producir ácido láctico produce además formiato y acetil por la enzima piruvato formiato liasa (Hofvendahl y HhanHägerdal, 2000). Dentro del género *Lactobacillus*, existen bacterias homofermentativas obligadas y facultativas, estas últimas tienen glucosa-6 fosfato deshidrogenasa y siguen la vía de la pentosa. La fermentación heteroláctica produce a partir de glucosa, cantidades equimolares de otros productos de fermentación como ácido acético, etanol y dióxido de carbono. Las bacterias que tienen este tipo de metabolismo son: *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. bifidus* y todas las especies del género *Leuconostoce*. De las BAL, *Lactobacillus delbrueckii* es el microorganismo más utilizado en la producción a gran escala de ácido láctico ya que tiene la ventaja de producir únicamente isómeros L (+), consumir eficientemente glucosa y ser un microorganismo termófilo con temperatura óptima de crecimiento 41.5°C, lo que reduce costes de enfriamiento y esterilización, así como riesgos de contaminación microbiológica en el fermentador. Este microorganismo crece bien a un pH entre 5,5 y 6,5, por lo cual el ácido producido debe ser continuamente neutralizado; por esto, *Lactobacillus delbrueckii* ha sido sometido a mutagénesis para aumentar su tolerancia al ácido láctico (Demirchi et al., 1992, citado por Hofvendahl y Hhan-Hägerdal, 2000). En medio lácteos la bacteria recomendada es *Lactobacillus bulgaricus* que también es termófila (García, 1993).

### 3.3.5 Microorganismos para la fermentación ácido láctica

Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico son cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (*Lb*), *Carnobacterium*, *Leuconostoc* (*Leu*), *Pediococcus* (*Pd*), *Streptococcus* (*Str*), *Tetragenococcus*, *Lactococcus* (*Lc*), *Vagococcus*, *Enterococcus* (*Ent*), *Aerococcus* y *Weissella* (Bergey, 1984; Hofvendahl y Hhan-Hägerdal, 2000). La mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5. Esta tolerancia ácida les da ventajas competitivas sobre otras bacterias; la temperatura óptima de crecimiento varía entre géneros y está en un rango de 20° C a 45° C (Hofvendahl y Hhan-Hägerdal, 2000). Las bacterias del ácido láctico (BAL) tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B (Niel y HahnHägerdal, 1999; Chopin, 1993; citado por Hofvendahl y Hhan-Hägerdal, 2000), por lo tanto ellas se encuentran en la naturaleza en ambientes nutricionalmente ricos. La mayoría de BAL producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico; las formas isoméricas de lactato deshidrogenasa presente en las BAL determinan el isómero de ácido láctico producido, ya que la deshidrogenasa láctica es esteroespecífica; las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*; *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenococcus* producen únicamente isómeros L, mientras las especies del género *Leuconostoc* producen únicamente isómeros D (Salminen, 1993). 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 el pH y concentración de sustrato (Hofvendahl y Hhan-Hägerdal, 2000). Las especies del género *Lactobacillus* por

ejemplo, producen además de formas isoméricas L (+) y D (-), una mezcla racémica de ambos isómeros (Salminen, 1993).

## **4. METODOLOGÍA**

El procedimiento experimental del proyecto se llevó a cabo simultáneamente entre los laboratorios de ingeniería química y microbiología de la Universidad de Pamplona. El proyecto se ejecutó en cuatro fases fundamentales; la primera la obtención y caracterización del almidón a partir de los residuos del plátano, la segunda etapa el aislamiento, cultivo y conteo de los microorganismos ácido lácticos del yogurt, como tercera fase la fermentación del almidón en los medios planteados, y como última etapa la caracterización y cuantificación del ácido láctico obtenido.

### **4.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE PLÁTANO**

#### **4.1.1 Obtención del almidón del plátano**

EL método seleccionado para la extracción de almidón por motivos prácticos y relacionados con la adaptabilidad del proyecto fue método de extracción en seco adaptado (Kent, 1996; Islas-Hernández, 2005). El proceso se realizó bajo un mecanismo manual, donde se pesó en promedio 1,4305 Kg de plátano fresco sin procesar, luego se realizó un proceso de lavado y desinfección que consistió en enjuague con agua y desinfección con hipoclorito de sodio (1 %), un pelado de forma manual y una sucesiva inmersión en ácido cítrico (3 %), un troceado con dimensiones aproximadas de trozos de plátano de 7X4 cm, luego se realizó el secado (40 °C, 8 horas), un proceso de molienda manual y un tamizado con los tamices #20 y #16 respectivamente, rápidamente el almidón obtenido se sometió un secado a 55°C grados por 1 hora, 15 minutos. En el anexo 1 se describe la metodología paso a paso.

#### 4.1.2 Molienda y tamizado

La molienda se realizó a través de un molino artesanal sin especificaciones de equipo; y el tamizado con los tamices de #16 y #20 con tamaño de malla 1.18 mm y 850  $\mu\text{m}$ , respectivamente, pertenecientes al laboratorio de suelos de la universidad de Pamplona, las fichas técnicas y las especificaciones de los tamices se pueden ver en el Anexo 2.



Figura 4. Tamizado del almidón

#### 4.1.3 Caracterización del almidón del plátano

La caracterización del almidón se realizó mediante la estimación de parámetros experimentales a nivel de laboratorio basados en normas y protocolos, la metodología experimental se realizó de acuerdo al libro técnico de la FAO (capítulo 8). A continuación se describen los procedimientos experimentales para cada parámetro.

##### 4.1.3.1 Materia Seca

Se secó un crisol vacío durante cinco horas en un horno a 80 °C ( P1 ), luego se agregó en el crisol 20 g de la muestra de almidón ( P2 ) y se sometió a calentamiento en un horno a 80 °C durante 24 horas, se dejó enfriar en un desecador hasta obtener peso constante ( P3 ). Finalmente se calculó el contenido de materia seca a través de la Ecuación 1.

#### **4.1.3.2 Pulpa o Fibra**

Se hirvieron 2 g de almidón durante una hora en 100 mL de ácido clorhídrico 0,4 por ciento, luego se filtró el líquido sobre papel filtro, previamente pesado, posteriormente se lavó con agua caliente y se secó a 105-110 °C hasta peso constante, se calculó el porcentaje de pulpa con la Ecuación 2.

#### **4.1.3.3 Cenizas y Humedad**

Se pesaron dos crisoles vacíos, luego se depositaron en ellos 1 gramo de almidón, uno se llevó a 550 °C para cenizas durante 3 horas, 30 minutos y el otro a 110 °C hasta obtener un peso constante, los porcentajes de humedad y ceniza se determinaron a través de las ecuaciones resaltando que para calcular el porcentaje de humedad, se reemplaza el valor de cenizas en la ecuación, por el valor del peso la muestra seca.

#### **4.1.3.4 Acidez y pH**

Se calibro el medidor de pH con las soluciones tampón pH 4,0 y pH 7,0, luego se mezcló 20 g de almidón en base seca con 100 mL de agua destilada (previamente hervida para eliminar el CO<sub>2</sub>) durante 15 minutos, se filtró a través de un papel filtro al líquido filtrado se le midió el pH, para la acidez se tomó 50 mL del filtrado y se tituló con hidróxido de sodio 0,1 N utilizando fenolftaleína como indicador.

#### **4.1.3.5 Color**

Este análisis es cualitativo y consiste en formar un triángulo sobre una superficie oscura y con buena iluminación con el almidón obtenido, y un triángulo con almidón puro, y comparar su color.



#### **4.1.3.6 Densidad aparente y empacada.**

Se pesó la probeta graduada vacía y se adiciono cuidadosamente con una espátula la muestra de almidón a la probeta de 250 mL por medio de un embudo hasta que el volumen total sea libremente completado, luego se pesó la probeta llena y se hicieron los respectivos cálculos, para la densidad empacada se realizó el mismo procedimientos, pero esta se sometió a vibración durante cinco minutos a una frecuencia y amplitud de manera tal que la probeta vibre rítmicamente con la base de madera y alcance el volumen de muestra empacada.

#### **4.1.3.7 Índice de absorción, solubilidad y poder de hinchamiento**

Se pesaron tubos de centrifuga secos a 60 °C, se depositaron en ellos 1,25 g de almidón y se agregó exactamente 30 mL de agua destilada precalentada a 60 °C, se sometieron a baño de maría a 60 °C durante 30 minutos; se agitó la suspensión a los 10 minutos de haber iniciado el calentamiento y se centrifugo a temperatura ambiente a 4 900 RPM durante 30 minutos y se decantó el sobrenadante inmediatamente después de centrifugar, se midió el volumen y se tomaron 10 mL del sobrenadante y se colocaron en un vaso de precipitados de 50 mL , se secó el sobrenadante en un horno durante toda la 6 h a 70 °C, finalmente se pesó en el tubo de centrífuga con el gel y se el vaso de precipitados con los insolubles, los cálculos se realizaron a través de las ecuaciones 4,5 y 6, respectivamente.

#### **4.1.3.8 Temperatura de Gelatinización**

Se pesaron 10 g de almidón de plátano y se disolvieron en agua destilada hasta completar a 100 mL, de esos 100 mL se tomaron 50 mL y se llevaron a baño de maría a una temperatura de 85 °C. Se agitó constantemente la suspensión del almidón hasta que se formó una pasta y la temperatura permaneció estable por unos segundos, se reportó la temperatura de gelatinización.

## **4.2 AISLAMIENTO, CULTIVO, CONTEO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ÁCIDO LÁCTICOS**

Para el proceso fermentativo se propusieron dos tipos de microorganismos liofilizados comerciales CMLAB® y aislados del yogurt, el aislamiento consistió en la inoculación y activación de los microorganismos, para esto se agregó 1 g de cultivo comercial y 2 mL de yogurt en tubos de ensayos con tapa, respectivamente, los cuales contenían 30 mL de caldo MRS, luego se incubaron a 25°C durante 72 h, periodo después del cual se tomó 1 mL de cada cultivo y se agregaron a nuevos recipientes que contenían 49 mL de caldo MRS y se incubó a la misma temperatura durante 6 h, del caldo se tomó 1 mL y se realizaron diluciones en leche entera para incrementar el cultivo de la biomasa. El conteo se realizó a través de la adición de 0,1 mL de cultivo en medio SPC (Agar Plate Count), de las cuales se hicieron diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$ , el esquema del proceso se puede ver en el anexo 3. El proceso de caracterización se realizó por medio de microscopia para determinar los tipos de microorganismos presentes.

## **4.3 MÉTODO DE CURVA DE CLORURO FÉRRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO**

En la determinación de la cantidad de ácido láctico producido a lo largo del proceso se optó por usar el método colorimétrico de la curva de cloruro férrico, el cual consiste en tomar 10 mL de muestra, a la cual se le adicionan 5 mL de solución de  $\text{FeCl}_3$  y se afora a 50 mL con agua destilada, posteriormente se lee su absorbancia a una longitud de onda de  $\lambda=440$  nm.

#### 4.3.1 Preparación de la curva de ácido láctico y la solución de cloruro férrico.

La solución de cloruro férrico se preparó pesando 1 g de  $\text{FeCl}_3$ , adicionando 2 mL de HCl 0,1 N y completando a 100 mL con agua destilada, se conservó en un lugar con poca luminosidad, ya que este reactivo se descompone rápidamente con la luz.

Para la preparación de la curva de ácido se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de ácido láctico, y luego se leyeron sus absorbancias, como se observa en el tabla 2, antes se preparó un blanco con agua destilada para calibrar el equipo, las absorbancias se tomaron a una longitud de onda de  $\lambda=440$  nm, en el anexo 4 se observa la curva de calibración.

**Tabla 2. Valores ppm vs absorbancia curva ácido láctico**

Concentración (ppm)	20	40	60	80	100	120	140
Absorbancia	0,116	0,302	0,416	0,518	0,62	0,710	0,820

#### 4.4 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA EL ALMIDÓN

Para la determinación de las condiciones óptimas de fermentación se prepararon 6 medios con concentraciones de sustrato del 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125 y 0,15 % en 100 mL de agua destilada. Se tomaron 2 mL de cada biomasa a una concentración de  $400 \times 10^5$  y  $948 \times 10^5$  Ufc/mL, respectivamente para los microorganismos del yogurt y las cepas liofilizadas, y se inocularon en los medios. A estos medios no se les adiciono ningún suplemento adicional, se incubaron a una temperatura de 28 °C, a condiciones de microanaerobiosis para las 12 muestras, 6 muestras con los microorganismos liofilizados y 6 muestras con los microorganismos aislados del yogurt, este proceso se realizó por duplicado. Posteriormente se realizó medición de pH inicial, el cual se encontraba en un rango de  $5,5 \pm 0,06$ , seguidamente se realizaron mediciones de pH y absorbancia a cada muestra cada 6 horas,

hasta alcanzar 30 horas. Terminado el proceso se reportaron los datos experimentales y se procedió a examinar las condiciones óptimas para la producción de ácido láctico.



**Figura 5. Evaluación de las condiciones de fermentación**

#### **4.5 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN (HIDROLIZADO Y NO HIDROLIZADO) A ÁCIDO LÁCTICO**

Luego de determinar la mejor concentración del sustrato, los microorganismos más factibles para el proceso y el tiempo en el que se da la mayor producción de ácido láctico. Se llevó a cabo el proceso a escala de laboratorio en un Erlenmeyer de 1.000 mL, se prepararon dos medios con concentración de almidón de 0,025 %, uno de los medios se sometió a un proceso de hidrólisis enzimática con las enzimas comerciales  $\alpha$ -amilasa marca HARYZYME 5000 ® y la glucoamilasa marca NATURYZEME ® utilizando las relaciones enzimas/sustratos especificadas por el fabricante, al medio hidrolizado se le midieron los grados Brix° iniciales y finales , para verificar la acción enzimática. Posteriormente se realizó la inoculación de 20 mL del cultivo bacteriano del yogurt, a las mismas condiciones descritas en la etapa evaluación de condiciones óptimas de fermentación, las cuales eran, incubación a una temperatura de 28 °C, condiciones de microanaerobiosis, realizando medidas de pH y absorbancia cada 6 horas hasta 30 h.



**Figura 6. Fermentación en medios hidrolizado y no hidrolizado**

#### **4.6 CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO**

El ácido láctico se sometió a un proceso de concentración a través de un filtrado con papel filtro Whatman 1 y un proceso de destilación, en el cual se introdujo 450 mL del filtrado de almidón con el cultivo ácido láctico, la destilación se realizó a una temperatura entre 90- 105 ° C, hasta lograr la extracción del ácido, posteriormente al ácido láctico se le determinaron algunas de sus propiedades como densidad y punto de ebullición, se cuantifico a través de la curva de calibración midiendo su absorbancia.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención del almidón

El almidón obtenido se conservo en un recipiente hermético para evitar contaminación y humedad del ambiente. Los principales resultados son los rendimientos de almidón a partir la materia prima estudiada, los cuales se pueden observar a través de la tabla 3.

**Tabla 3. Rendimientos de Almidón**

Lote	Peso inicial (Kg)	Peso sin cascara (Kg)	Peso Almidón (Kg)	Rendimiento (%)
1	1,86	1,279	0,72	38,79
2	1	0,850	0,45	45
<b>Promedio</b>	1,43	1,0645	0,585	41,89

Fuente: Autor

El porcentaje de rendimiento promedio obtenido fue de 41,89 %, de la tabla 3 se puede apreciar que los rendimientos del plátano son buenos comparados con algunos estudios en la literatura donde se evalúan los rendimientos del plátano como materia prima del almidón en Colombia. Como el estudio realizado por la universidad de Cartagena (H Lambis, F Hernández, Y Morales, L Marín, J Pasqualino), donde evaluó la conversión de almidón por ambos métodos teniendo como resultados que el método en seco permite extraer el 49.62 % del almidón de la pulpa del plátano, mientras que el húmedo permite extraer el 56.76 %. Aunque el método húmedo presenta mayores rendimientos, su proceso implica muchos más residuos y demanda de agua. Por otro lado el método seco es más económico ambientalmente, ya que requiere una menor inversión en área y equipamiento, y no consume agua, generando así menores impactos ambientales.

El proceso de extracción en seco, permite aumentar los rendimientos de almidón disminuyendo la pérdida de la materia prima, se propone un reciclaje a la molienda del material retenido en los tamices, hasta que cumplan con el tamaño de partícula del último tamiz para aumentar la cantidad

de almidón y directamente aumentar los rendimientos del proceso. Otro aspecto importante del proceso es tener un excelente secado, ya que permite mejores propiedades de transporte y textura del almidón y evita la descomposición del almidón por acciones de la humedad y microorganismos.

## 5.2 Caracterización del almidón

En la tabla 4, se muestran los valores para cada uno de los parámetros determinados experimentalmente al almidón de plátano, aquí se evalúan algunas propiedades fisicoquímicas como: cenizas, fibra cruda y húmeda. En el Anexo 5 se puede observar el resultado cualitativo para el parámetro de color del almidón.

**Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas almidón de plátano**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>	<b>Norma</b>
<b>Materia Seca</b>	89,14 %	ICONTEC, 2002
<b>Pulpa</b>	0,33%	Grace, 1977
<b>Densidad Aparente</b>	0,96 g/mL	Smith, (1967)
<b>Densidad Empacada</b>	1,32 g/mL	Smith, (1967)
<b>Índice de absorción</b>	0,6	Anderson et al.,( 1969)
<b>Índice de Solubilidad</b>	12,96	Anderson et al.,( 1969)
<b>Poder de hinchamiento</b>	1,02	Anderson et al.,( 1969)
<b>Cenizas</b>	7,04 %	AOAC,( 2000)
<b>Humedad</b>	13,98%	AOAC,( 2000)
<b>Acidez titulable</b>	$1,36 \times 10^{-3} \text{eq g A.L/g A}$	ISI, (1999)
<b>pH</b>	6	ISI, (1999)
<b>Temperatura de Gelatinización</b>	84 °C	Smith, (1967)

**Fuente: Autor**

En los resultados de caracterización se puede comprobar la obtención de un almidón de buena calidad, el contenido de materia seca fue de 89,14 % en la literatura se reporta para almidones valores entre 87-90 %, el contenido de pulpa en la literatura no debe exceder el 0,3 %, en nuestro caso fue del 0,33 %, los valores de densidad, humedad y cenizas son valores aceptables, ya que la literatura reporta valores de densidad promedio 1,560 g/mL, humedad entre 10 -13 %, y contenido de cenizas de menores al 12 %, los índices de absorción, solubilidad y poder de

hinchamiento son buenos; ya que un almidón de buena calidad tendrá una baja solubilidad, alta absorción de agua y un alto poder de hinchamiento según la teoría, la acidez y el pH están dentro del rango los valores de la literatura siendo para almidones nativos de los valores deben estar entre 6-6,5; finalmente la temperatura de gelatinización debería encontrarse entre los 60-75 °C, pero este fue de 84°C esto puede atribuírsele a la composición específica del plátano.

### 5.3 Aislamiento, cultivo, conteo y caracterización de los microorganismos ácidos lácticos.

Los resultados del aislamiento y cultivo, fueron satisfactorios, ya que los microorganismos crecieron perfectamente y se logró obtener la biomasa requerida para la fermentación del almidón durante todo el proceso, como se puede observar en la figura 7.

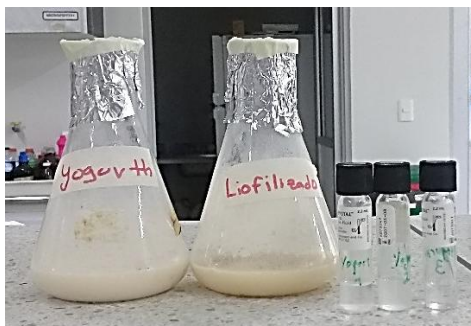


Figura 7. Cultivos ácido lácticos liofilizados y aislados de yogurt.

Los resultados del conteo dieron valores de  $400 \times 10^5$  Ufc/mL para las bacterias aisladas del yogurt; y de 958 Ufc/mL para los microorganismos liofilizados, como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Conteo de colonias (bacterias del yogurt y liofilizadas)

Disolución en caja	$1 \times 10^{-1}$		$1 \times 10^{-2}$		$1 \times 10^{-3}$		$1 \times 10^{-4}$		$1 \times 10^{-5}$	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Conteo yogurt	--	--	--	--	--	--	--	--	400	568
Conteo liofilizado									948	1056

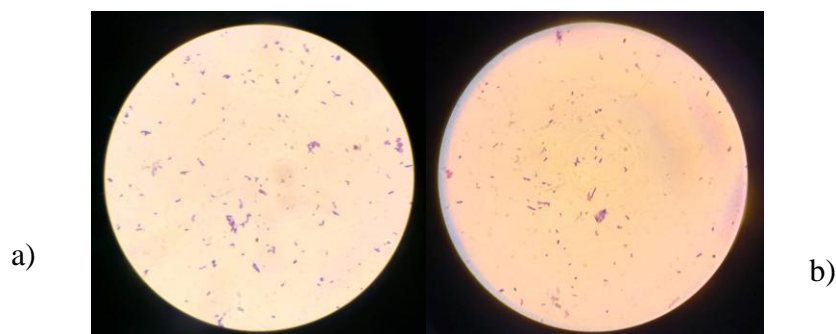
Fuente: Autor

Debido a la alta población de los microorganismos en la demás disoluciones, no se reportaron valores para estas, solo en la disolución  $1 \times 10^{-5}$  se logró hacer un conteo estimado de las colonias,



en la cual por normativa se escoge el valor de la caja con menos densidad de población para reportar.

Dentro de los resultados de la caracterización del microorganismo se realizó microscopia de cada uno de los cultivos para verificar la presencia de bacilos lácticos, los resultados mostraron que efectivamente los microorganismos encontrados pertenecen a *Bacilos Gram Positivos*, los cuales se caracterizan por tener un proceso homofermentativo para el ácido láctico, los resultados la microscopias se pueden observar en la figura 8.



**Figura 8. Microscopia cultivos ácidos lácticos objetivo 100X liofilizados (a) y aislados de yogurt (b).**

#### **5.4 Evaluación de las condiciones óptimas de fermentación para el almidón**

En la evaluación de las mejores condiciones de fermentación se realizó el seguimiento de pH y absorbancia a ciertos intervalos de tiempo, para determinar el tiempo óptimo, la mejor concentración de sustratos y comparar los rendimientos de producción de ácido láctico con cada una de los microorganismos propuestos.

### 5.4.1 Seguimiento de pH

Los resultados para el seguimiento de pH se pueden ver en las figuras 9 y 10, respectivamente para los microorganismos del yogurt y las cepas liofilizadas, las tablas de con los valores de pH iniciales y finales se pueden ver en el anexo 6.

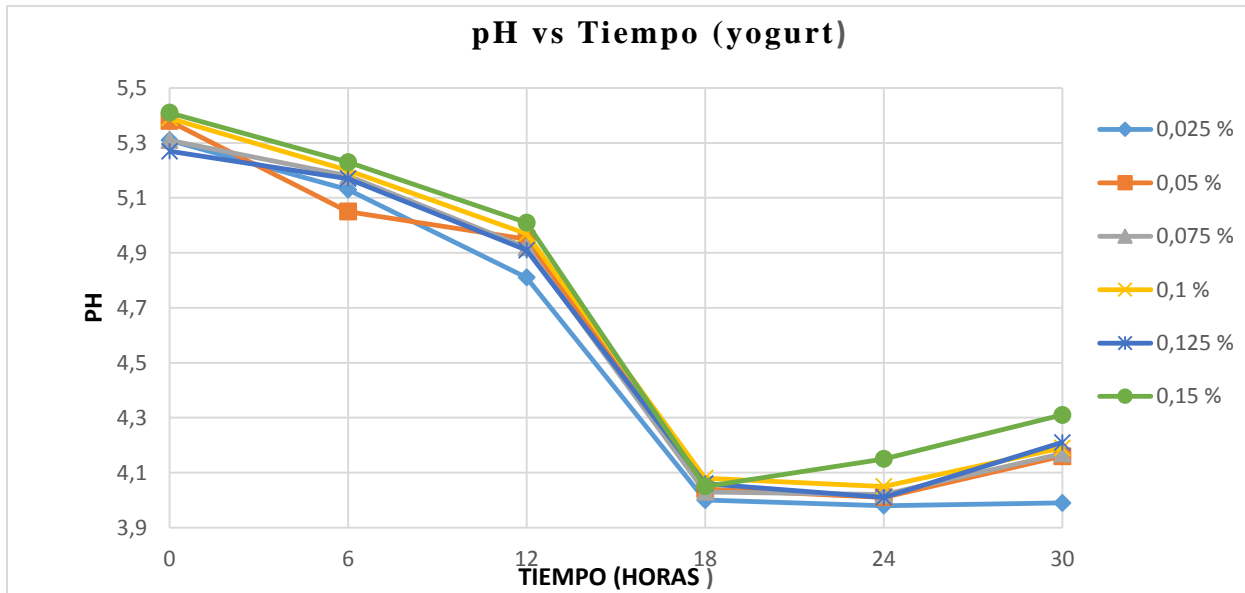


Figura 9. pH vs Tiempo (yogurt).

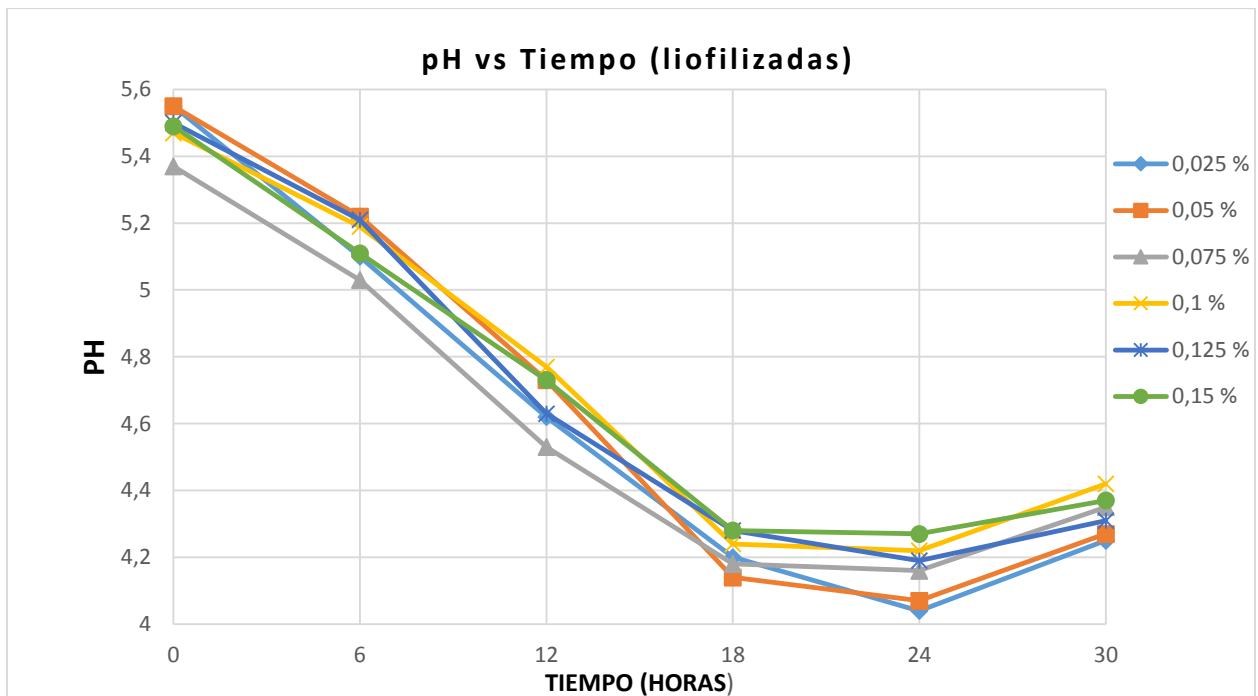


Figura 10. pH vs tiempo (liofilizados).

### 5.4.2 Producción de A.L a través del tiempo

A través de la curva de ácido láctico, y el valor de las absorbancias se pudo cuantificar en mg/ L, la cantidad de ácido láctico producido durante el proceso de fermentación, los resultados obtenidos se exponen en las figuras 11 y 12, para cada sistema de los microorganismos estudiados.

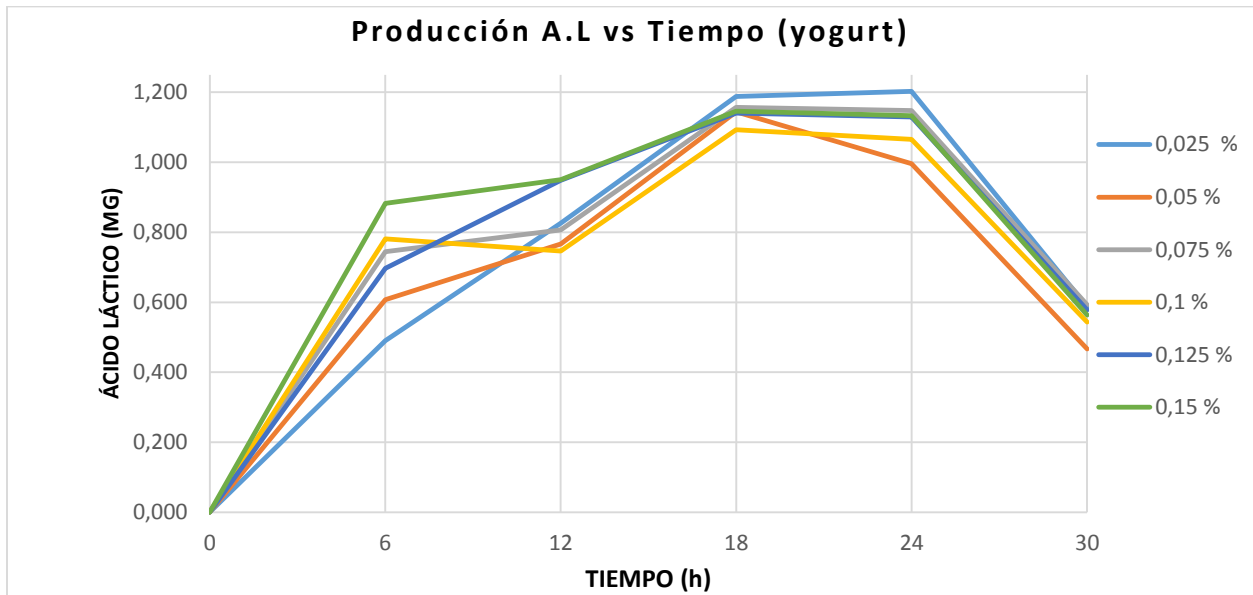


Figura 11. Producción A.L vs tiempo (yogurt).

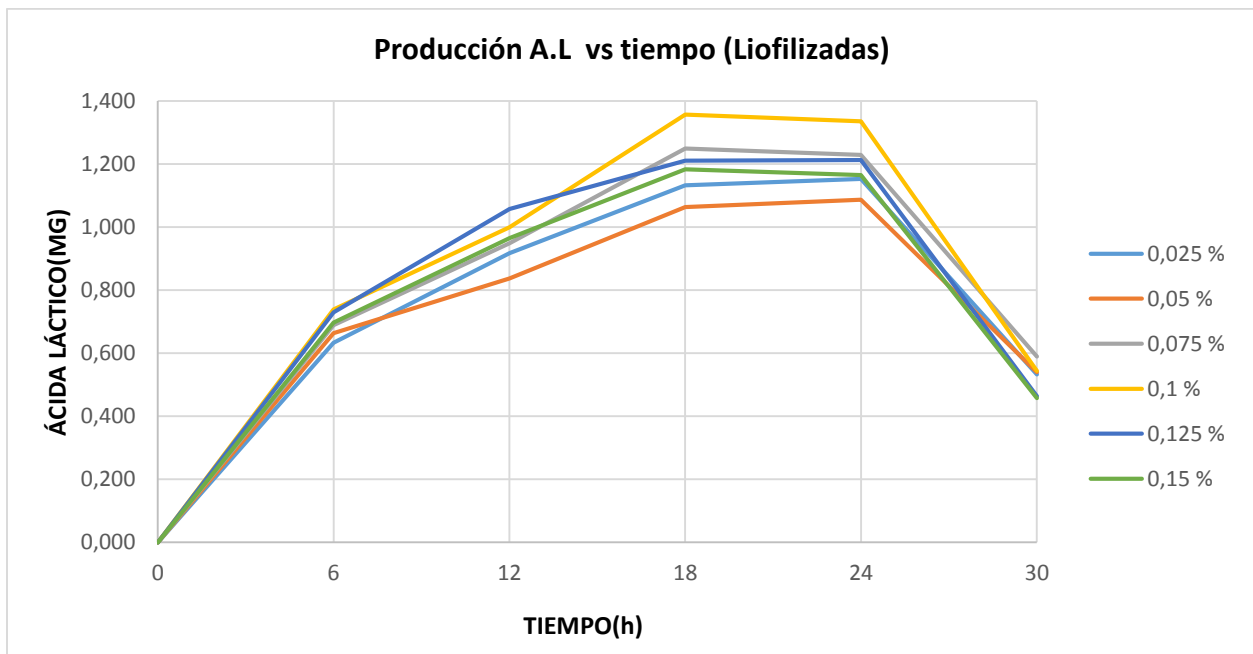
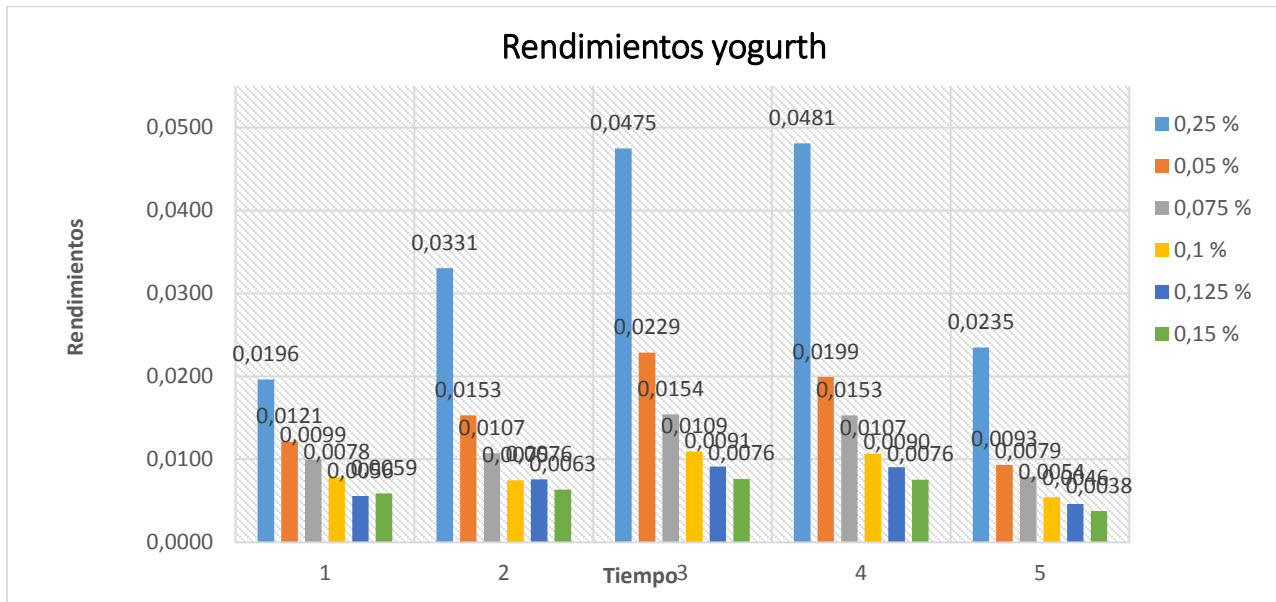


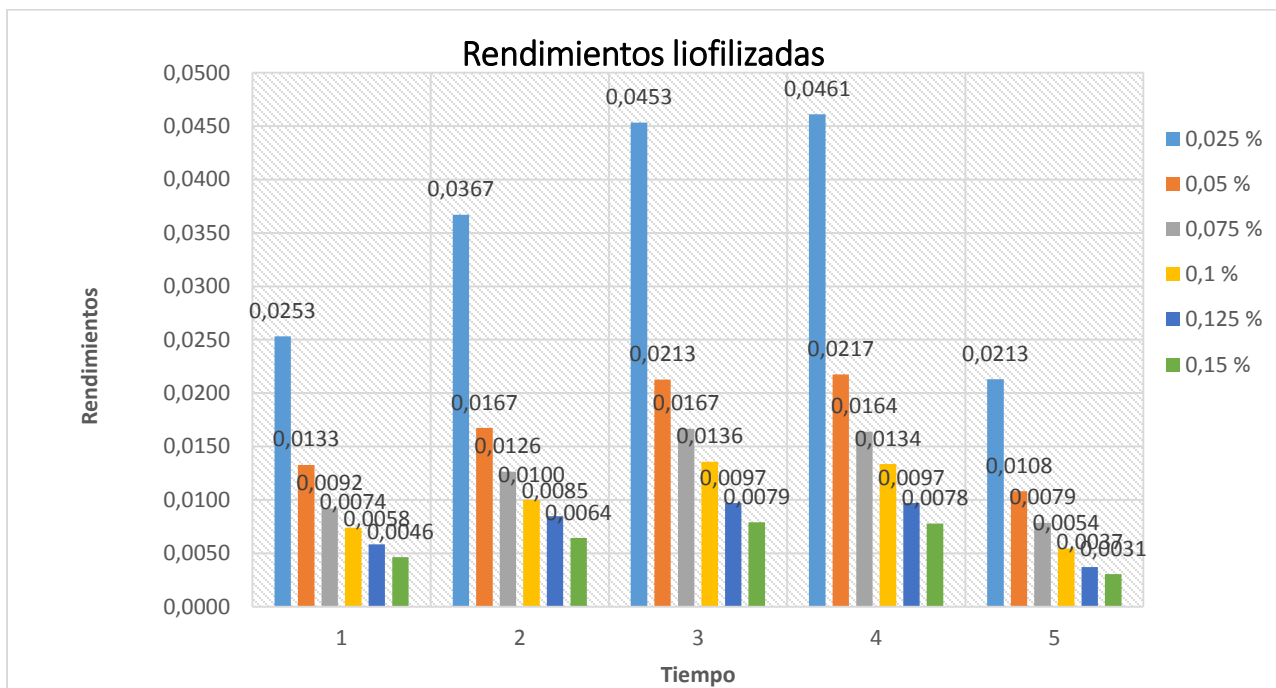
Figura 12. Producción A.L vs tiempo (Liofilizadas).

### 5.4.3 Rendimientos de ácido láctico

Para determinar el mejor tiempo de producción de ácido láctico se realizó un estimado de los rendimientos en cada uno de los tiempos, como se pueden observar en la figura 13 y 14, en cada uno de los sistemas estudiados.



**Figura 13. Rendimientos (yogurt)**



**Figura 14. Rendimientos (Liofilizadas)**

A través del seguimiento del pH de los sistemas fermentados con yogurt y las cepas liofilizadas, se observó un mismo comportamiento, ambos alcanzan sus pH más ácidos entre las 18 y 24 horas de fermentación, reportándose el valor más ácido a las 24 horas de fermentación. Para los dos sistemas las medidas de pH más bajas se encuentran en los medios de baja concentración de sustrato, siendo la de 0,025 % la que nos muestra una mayor obtención de ácido láctico, según las medidas de pH consecutivas se encuentran las concentraciones de 0,05 y 0,075 %. Adicionalmente se observa que pasadas las 24 horas de fermentación el pH en los dos sistemas y para todas las concentraciones comienza a aumentar lentamente, este comportamiento puede atribuírsele a la neutralización del ácido láctico producido por el almidón que aún no ha sido consumido por las bacterias, esto se intuye debido a que los medios con mayor concentración de almidón aumentan su pH más rápido, como se puede observar en las figuras 9 y 10, respectivamente.

En las figuras 11 y 12, se observa la velocidad de producción de ácido láctico a través del tiempo, en el caso del medio fermentado con las bacterias del yogurt la concentración con mayor producción de ácido láctico es la de 0,025 %, en un tiempo de 24 horas, seguida de estas las mejores producciones de ácido láctico para este sistema están dadas para las concentraciones de 0,15 y 0,125 %, es decir para las más altas concentraciones; por otro lado el sistema fermentado con las cepas liofilizadas presentó la mejor producción de ácido láctico para la concentración del 0,1 %, seguidas por las concentraciones de 0,075 y 0,125 %, también a las 24 horas de fermentación, por lo cual podría decirse que este es el mejor tiempo de producción de ácido láctico en ambos sistemas. De igual forma que en las gráficas del pH, después de las 24 horas el

comportamiento en la producción del ácido láctico disminuye paulatinamente para todas las concentraciones.

Finalmente se evaluaron los rendimientos para cada uno de los tiempos de fermentación en los dos sistemas, como se aprecian en la figura 13 y 14, aquí encontramos que para ambos sistemas de fermentación los mejores rendimientos se obtuvieron para los medios de baja concentración de sustrato, es decir, para las concentraciones de 0,025, 0,05 y 0,075 % de almidón. Esto puede justificarse que para medios no muy saturados de almidón los microorganismos respondieron con un mejor crecimiento y metabolismo del sustrato, ya que en medios de alta concentración de sustratos el crecimiento bacteriano puede llegar a inhibirse afectando así los rendimientos del proceso fermentativo (van Winsen et al. 2001). El tiempo que representó el mayor rendimiento fue el de las 24 horas, las medidas de pH, producción de ácido láctico y el mayor rendimiento lo obtuvo el sistema de yogurt con la concentración de 0,025 %, cabe resaltar que los sistemas en términos de rendimientos se comportaron de manera similar, concluyéndose que es factible trabajar con cualquiera de los dos, pero que como se busca un proceso económicamente más viable, se escogen los microorganismos aislados del yogurt.

### **5.5 Fermentación del almidón (hidrolizado y no hidrolizado)**

Después de establecer la concentración, los microorganismos y tiempo de fermentación óptimo, los cuales se determinaron a través de etapa de evaluación de las condiciones de fermentación cuyos resultados se expresan en la sección 5.4. Se evalúan los rendimientos para medios de almidón hidrolizado y no hidrolizado, los resultados del seguimiento se pueden observar en la figura 15, y en la figura 16 los rendimientos en ambos medios.

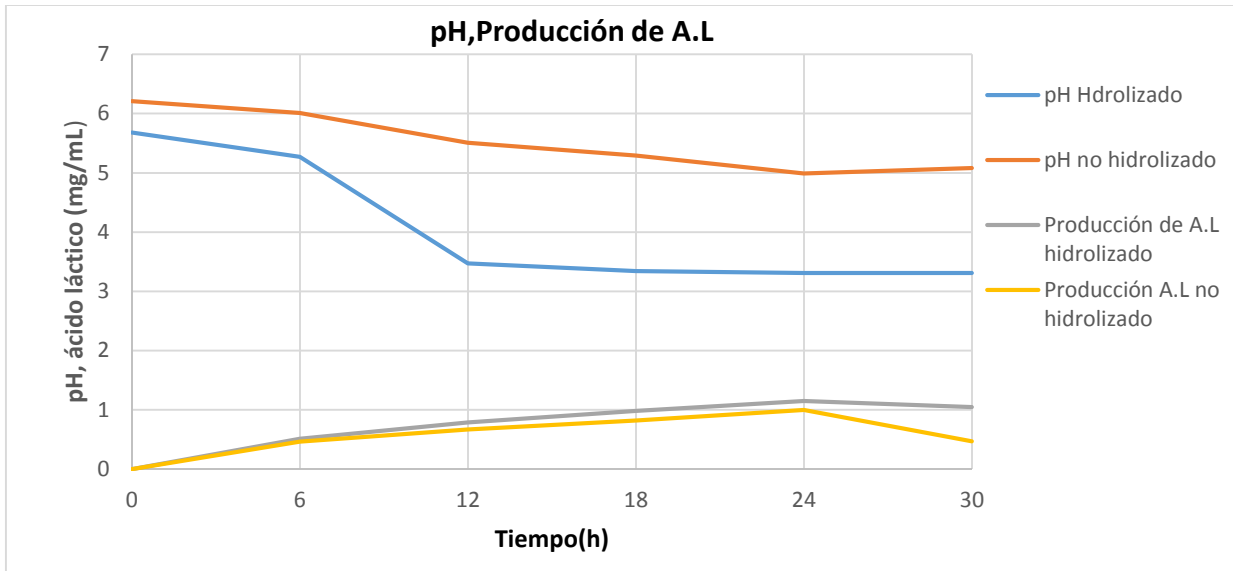


Figura 15. Producción A.L; pH vs tiempo (yogurt).

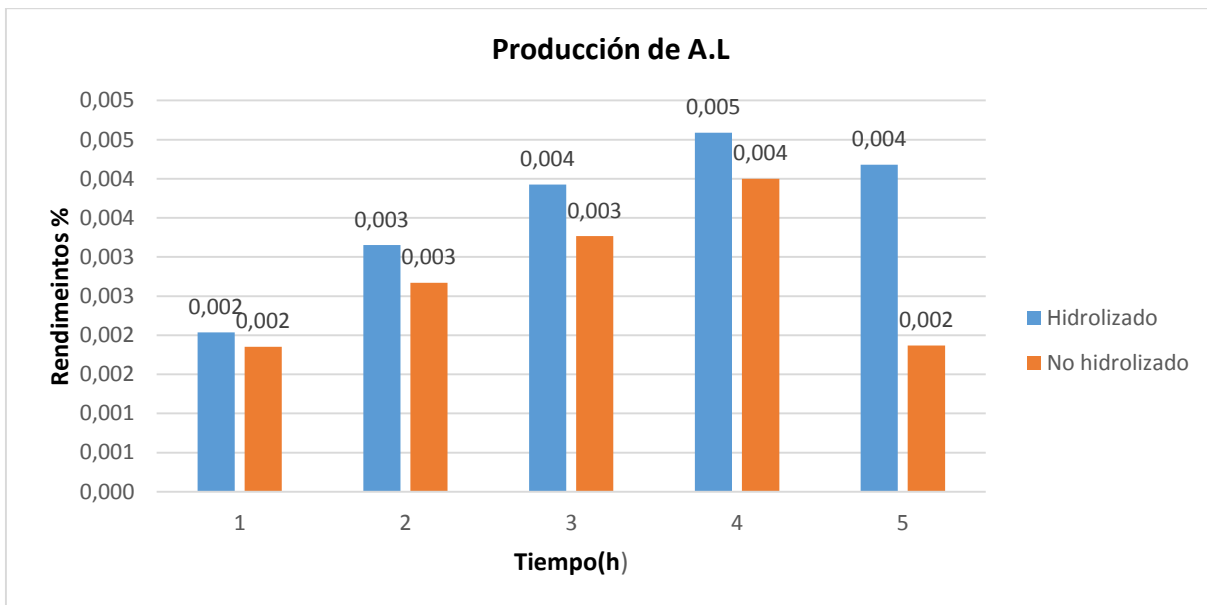


Figura 16. Comparación de rendimientos en medio hidrolizado y no hidrolizado.

En la evaluación de la hidrólisis enzimática, se puede observar en la gráfica 15 los valores de pH para ambos medios, aquí lo más sobresaliente es que para el sistema hidrolizado se alcanzaron valores de pH en el rango de 4- 3,5, ver anexo 5, algo que no se había presentado anteriormente, esto nos indica que efectivamente la hidrólisis enzimática, la cual aumento los grados Brix° del medio de 0 a 1, aumenta el contenido de glucosa y facilita la producción del

ácido láctico; en la velocidad de producción se observa que igualmente el mejor tiempo en la obtención de ácido láctico esta dado para las 24 horas de fermentación, respecto a los rendimientos que se observan en la figura 16, los mayores rendimientos los presenta el medio hidrolizado, el medio no hidrolizado tiene menores rendimientos para todas las concentraciones, pero con valores cercanos a los obtenidos con la hidrólisis, de aquí podemos determinar que es nuestro proceso se podría trabajar directamente con medios de almidón sin hidrolizar, ya que las bacterias ácido lácticas demostraron poder consumir el sustrato directamente y esto haría el proceso más viable económicamente, debido que las enzimas comerciales para la hidrólisis y los requerimientos energéticos aumentarían costos del proceso.

## 5.6 Caracterización y cuantificación del ácido láctico

El ácido láctico obtenido se sometió a algunas pruebas de caracterización, en las cuales se determinaron algunas de sus propiedades y se calculó su concentración por medio del método colorimétrico a partir de la lectura de su absorbancia, los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 6, el montaje de destilación se puede observar en el anexo 7.

**Tabla 6. Propiedades del ácido láctico**

<b>Análisis</b>	<b>Valor</b>	<b>Método</b>
<b>Medición de pH</b>	5,69	Método Potenciómetro*
<b>Temperatura de ebullición</b>	118 °C	Análisis Experimental
<b>Densidad</b>	1,203 g/mL	Picnómetro
<b>Concentración</b>	1,147 mg/L	Curva de calibración

**Fuente: Autor**

Con los resultados obtenidos se pudo comprobar que el producto se trataba del ácido láctico, ya que las medidas pH, temperatura de ebullición, densidad y su cuantificación en la curva de ácido láctico dieron valores acertados, los valores en la literatura para la temperatura de



ebullición y densidad son de 125- 140 ° C y 1.249 g/mL, las variaciones entre estos valores se le pueden atribuir a que el ácido láctico obtenido no estaba en un alto grado de pureza, por lo cual presenta un desviación con sus propiedades estándar, adicionalmente las condiciones externas como temperatura y presión afectan directamente la determinación de estas propiedades. Si está bien decir que el producto obtenido es ácido láctico, también es considerable sugerir una caracterización más robusta para tener mayor certeza de los resultados.

### 5.7 Proceso para la obtención de ácido láctico con microorganismos aislados de yogurt

Como resultado general se diseñó un proceso para la obtención de ácido láctico, el cual consiste en lavado con hipoclorito (  $\text{NaClO}$  ) al 1 % y desinfección con ácido cítrico (  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  ) al 3 %, una etapa de pelado y troceado, un período de secado del plátano a una temperatura de 40 °C por 8 horas, una molienda, un proceso de tamizado y secado (55 °C, 1 h 15 m) del almidón, la fermentación con microorganismos ácido lácticos aislados del yogurt en un medio de concentración de almidón 0,025 % p/v por un tiempo de 24 horas de fermentación y finalmente un proceso de filtrado y destilación para obtener como producto final el ácido láctico, el diagrama del proceso se puede observar en la figura 17 .

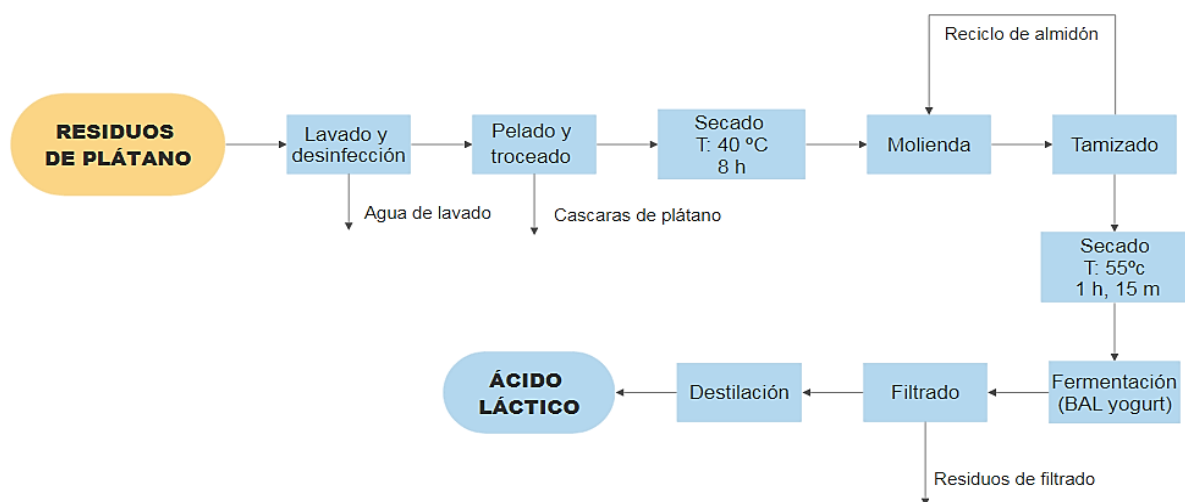


Figura 17. Diagrama de flujo proceso de obtención de ácido láctico con un BAL aislado de yogurt.

En el diagrama se aprecian tres corrientes de residuos la primera corriente agua de lavado, esta corriente líquida puede ser aprovechada a través de sistemas de filtrado y purificación, ya que las concentraciones de hipoclorito y ácido cítrico utilizadas en el proceso de lavado y desinfección son bajas, la segunda es una corriente sólida de residuos correspondiente a la cascara del plátano para su aprovechamiento se plantea la formulación de algún tipo de abono para los mismos cultivos de plátano, partiendo que estos son residuos netamente orgánicos. Finalmente como última corriente, los residuos correspondientes a la torta de filtrado, los microorganismos presentes en la torta deben ser inactivados por tratamiento térmico, método de calor húmedo Autoclave (Autoclaving, Alternate Method and Sterelizacion); sin embargo en nuestro caso se postula la implementación de estos residuos como probióticos, en base al estudio realizado por (L. Villamil, M. Martínez ,Universidad Jorge Tadeo Lozano,2009), donde se estudió la implementación de bacterias Gram-positivas como suplemento alimenticio para el cultivo de camarón(*P. monodon*, *L. vannamei*), dando como resultado general ser benéfica en el cultivo de camarón.

## 6. CONCLUSIONES

- Los residuos de plátano y el método de extracción propuestos, se considera adecuados, ya que se lograron rendimientos promedios de 41,89 %, los cuales nos indican una buena eficiencia en el proceso de obtención del almidón, además dicho proceso permite recircular los residuos y mejorar los rendimientos.
- La caracterización del almidón comparada con los valores en la literatura, indican valores coherentes para el almidón analizado, en esta investigación. Basado en lo anterior se puede considerar que los residuos del plátano (caduco) postcosecha es una buena fuente de almidón.
- Las bacterias ácido lácticas estudiadas, demostraron un adecuado crecimiento y adaptabilidad en los medios de almidón propuestos, siendo capaces de procesar el sustrato hasta obtener ácido láctico. Adicional se determinó que las bacterias ácido lácticas aisladas de yogurt proporcionan buenos rendimientos en comparación a las cepas liofilizadas, y que se opta a trabajar con ellas en el proceso, para así disminuir gastos.
- Se determinó que las mejores condiciones de fermentación están dadas en una concentración del sustrato del 0,025 % de almidón, el tiempo óptimo de fermentación es de 24 horas con las bacterias ácido láctico aislado del yogurt.

- La hidrólisis enzimática aumentó un 1 grado Brix° el medio de almidón, lo cual se reflejó en el aumento de la producción del ácido láctico, sin embargo, se puede omitir, ya que económicamente no es viable, además los rendimientos sin la hidrólisis son similares.
- El ácido láctico obtenido en el proceso, se considera con las condiciones necesarias para ser usado como materia prima en la producción de ácido poliláctico, evidenciándose en la caracterización de los microorganismos *Bacilos Gram positivos*, los cuales se caracterizan por tener un proceso fermentativo donde solo se produce ácido láctico; adicionalmente la cuantificación a través del método colorimétrico evidencia la presencia del ácido láctico y la caracterización del producto obtenido.

## **7. RECOMENDACIONES**

Realizar una caracterización más exhaustiva de almidón obtenido, para así estudiar el grado de incidencia de las propiedades en el proceso de fermentativo.

Realizar una cinética de la biomasa, producción de ácido láctico y consumo de sustrato que permita mejorar el proceso, determinando así temperaturas óptimas y agregar un sistema de agitación.

Realizar una caracterización más robusta del ácido láctico obtenido, usando técnicas más sofisticadas como cromatografía líquida de alta resolución HPLC, que son ideales para compuestos orgánicos.

## 8. REFERENCIAS

- Akerberg, C.; Zacchi, G. 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technology* 75, 119-126.
- Akerberg, C.; Hofvendahl, K.; Zacchi, G. 1998. Modelling the influence of pH, temperature, 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.
- Allgeier, R.; Peterson, W.; Fred, E. 1929. Production of Acetic and Lactic Acids from Mill sadust. *Industrial. and Engineering Chemistry* 21(11), 1039-1042.
- Amrane, A. 2000. Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *Journal. of Chemical Technology and Biotechnology* 75(3), 223-228
- Amrane, A. 2001. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: Unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production.  
207-212.
- Araya, C., Rojas, C., & Velázquez, C. (2010). Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (*ananas comosus*), para su uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico. *Rev. Iberoam. Polím.*, 11(7), pp. 407-416.
- Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes, *Biotechnol*, pp. 877 – 902.

- Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J. Biotechnol.*, pp. 156, 286–301.
- Acevedo, M., Alba, N., Sandoval, A., Ismael, S., & Salcedo, J. (2015). Desarrollo y productividad de ñame (*Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*) en diferentes condiciones hídricas *Acta Agronómica* p. 64: Sitio web:<<http://tuxchi.redalyc.org/articulo.oa?id=169932884004>> ISSN 0120-2812
- Achmad, F., Yamane, K., Quan, S., & Kokugan, T. (2009). Synthesis of polylactic acid by direct polycondensation under vacuum without catalysts, solvents and initiators. *Chemical Engineering Journal* 151, pp. 342–350.
- Alvis, A., Vélez, C., Villada, H & Mendoza, M. (2008). Análisis físico-químico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de las pastas *información tecnológica* Vol. 19(1), pp. 19-28.
- Anderson, R. (1969). Gelatinization of corn grifts by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today*, v. 14, pp. 4-12. 68
- Araya, C., Rojas, C., & Velázquez, C. (2010). Síntesis de ácido láctico, a través de la hidrólisis enzimática simultánea a la fermentación de un medio a base de un desecho de piña (*ananas comosus*), para su uso como materia prima en la elaboración de ácido poliláctico. *Rev. Iberoam. Polím.*, 11(7), pp. 407-416.
- Arrieta, M. (2014). —Films de APL y APL-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

- Autoclaving, Alternate Methods of Sterilization and Heat Labile Compounds. Mayo 2001.  
URL: <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/9965/autoclave.html>.
- Auras, R., Lim, L.T., Selke, S., & Tsuji H. (2010). —Poly(lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and application, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. pp. 69-82.
- Bello, D. 2007. Plásticos biodegradables, una alternativa verde. Departamento de Bioquímica. Subdirección de Biotecnología. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- Bello, P.L.A., Y.P. De Leon, E.A. Acevedo y L.O. Paredes; Isolation and partial characterization of amaranth and banana starches, *Starch/Stärke*: 50(10), 409-413 (1998).
- Bonilla, P., Ballesteros, M., & Baudrit, J. (2012). —síntesis y caracterización de poli (ácido l-láctico) por policondensación directa, obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (musa acuminata aaa variedad cavendish cultivar gran naine) en cana de polímeros, 13(2), pp. 52-59.
- Brown, A., Vázquez, H., Jacques, C, Alba, L., & García, J.(2012) Obtención de biomateriales derivados de ácido láctico empleando métodos no convencionales de síntesis. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar [en línea], 46 (Septiembre-Diciembre): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223124988002>> ISSN 0138-6204.
- Castro, J., & Vera, M. (2012). Diseño de reactores de prepolimerización y polimerización para la producción de ácido poli láctico en una planta industrial. Tesis de grado. Universidad de Cartagena.
- Chang, D; Jung, H; Rhee, J & Pan.(1999). Producción Homofermentativa de lactatos D o L con *E. coli* RR1. *Microbiología medioambiental*, 65(4), pp, 1384-1389.



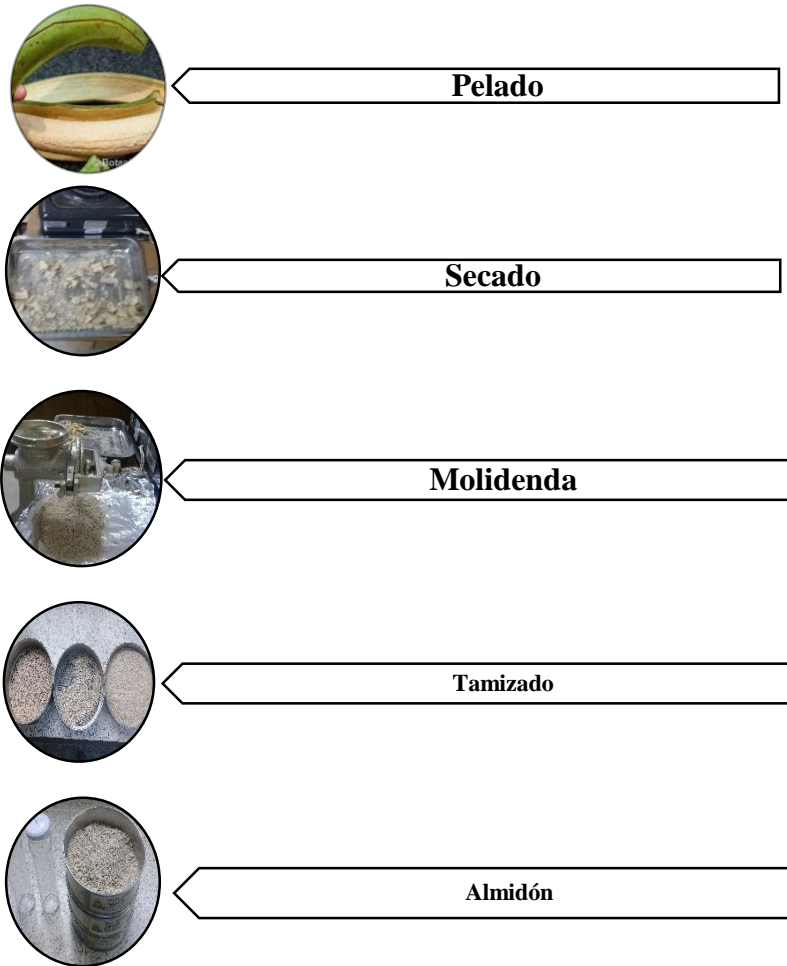
- CORPOICA. (2003) Concepción de un modelo de agroindustria rural para la elaboración de harina y almidón a partir de raíces y tubérculos promisorios, con énfasis en los casos de achira (*Canna edulis*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y ñame (*Dioscorea sp.*). Tibaitatá, Colombia.
- Cortes, J., Fernandez, A., Mosquera, S., & Velasco, R. (2014). —Evaluación de propiedades mecánicas, ópticas y de barrera en películas activas de almidón de yuca, *Rev. Bio. Agro.*, 12 (1), pp, 88-97.
- Cuong, M., Gyung, J., Yong, H., Kyoung, S., & Jang, J. (2013). Lactic acid production from fresh sweet potato through simultaneous saccharification and fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 81, pp. 40– 46.
- DANE; Departamento administrativo nacional de estadística, ministerio de agricultura y desarrollo rural (2004), <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/censoyucaindustrial.pdf>.
- DANE; (2004). Departamento administrativo nacional de estadística, ministerio de agricultura y desarrollo rural, censo de plantas procesadoras de plátano para uso industrial <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/censoyucaindustrial.pdf>
- Del Ángel D. (2007). Estudio y síntesis en la producción de Ácido Poliláctico (APL). [Tesis de Maestría en tecnología avanzada]. México D.F, México: Instituto Politécnico Nacional.

- Escudero, O., Higuera, G. (2010). Caracterización de la cadena productiva del ñame en la zona norte de Bolívar y los montes de María. Tesis programa de administración industrial, Universidad de Cartagena.
- Estupiñán, H., Parada, D., Laverde, D., Peña, B., Darío, Y., & Vázquez, C. (2007). Obtención de ácido poli l-láctico mediante policondensación con catalizador de Zinc metálico *Scientia Et Technica* [en línea] XIII (septiembre-Sin mes): <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903649>> ISSN 0122-1701
- Feoli, M., Escobar, C., & Marin, R. (1995). Obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus*. *Revista Colombiana de ciencias farmacéuticas*. N° 23 p. 18 -24.
- Fuentes, D., Diaz, M., & Perilla, J. (2006). Método para la obtención de lacturo de alta pureza a partir de la depolimerización de poli(ácido láctico). *rev.colomb.quim.* [Online]. Vol.35, N.2, pp. 115-123. Issn 0120-2804.
- García, C., Arrazola, G., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus Casei*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Vol 11 No. 1, pp. 136 - 143.
- 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.
- Adamberg, K.; Kask, S.; Laht, T.; Paalme, T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Internacional Journal of food Microbiology*. 85, 171-183.

- Bruno, J. M; Ragout, A.L; Cordoba, P. R; Sineriz, F. 1999. Continuous production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus casei* in twostage systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 316-324.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. editors. *Bailey & Scott's. Diagnostic Microbiology.* 11th. ed. St. Louis, Missouri. Mosby. 2002.
- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. editores, *Zinsser Microbiología.* 20ª ed. BsAs. Panamericana;1994.
- Mazzeo M, Miguel; Álzate G, Ángela; Marín M, Mario. Obtención de almidón a partir de residuos postcosecha del plátano Dominio Hartón (MUSSA AAB SIMMONDS).*Rev. Vector*, Volumen 3.Enero-Diciembre 2008, págs. 57-69.
- D-Lactic acid production from dry biomass of *Hydrodictyon reticulatum* by simultaneous saccharification and co-fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*
- Martín, C. y A.M. Smith; Starch biosynthesis, *Rev. The plant cell*, ISSN: 1059-1524 , 7 (7), 1995.
- Villamil, Luisa, Angélica, María: *Probióticos Como Herramienta Biotecnológica En El Cultivo De Camarón.* Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2009.
- Van Winsen, R., Urlings, B.A.P., Lipman, L.J.A., Snijders, J.M.A., Keuzenkamp, D., Verheijden, J.H.M. & van Knapen, F. 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Appl. Environm. Microbiol.* 67:3071

# **ANEXOS**

## ANEXO 1. Metodología obtención del almidón



## ANEXO 2. Ficha Técnica de los tamices.


**PINZUAR LTDA**  
ALTA TECNOLOGIA CON CALIDAD HUMANA AL SERVICIO DEL MUNDO


**TAMICES CERTIFICADOS NTC 32 - ASTM E 11/05**

**Tabla 1**

**DIMENSIONES NOMINALES, VARIACIONES PERMISIBLES PARA TEJIDO DE ALAMBRE DE TAMICES DE ENSAYO ESTÁNDAR**

Designación del Tamiz Estándar	Alternativo	Díámetro nominal del alambre mm
125 mm	5 in.	8
106 mm	4.24 in.	6.3
100 mm	4 in.	6.3
90 mm	3 1/2 in.	6.3
75 mm	3 in.	6.3
63 mm	2 1/2 in.	5.6
53 mm	2.12 in.	5
50 mm	2 in.	5
45 mm	1 3/4 in.	4.5
37.5 mm	1 1/2 in.	4.5
31.5 mm	1 1/4 in.	4
26.5 mm	1.06 in.	3.55
25 mm	1.00 in.	3.55
22.4 mm	7/8 in.	3.55
19 mm	3/4 in.	3.15
16 mm	5/8 in.	3.15
13.2 mm	1/2 in.	2.8
12.5 mm	1/2 in.	2.5
11.2 mm	7/16 in.	2.5
9.5 mm	3/8 in.	2.5
8 mm	5/16 in.	2.24
6.7 mm	0.265 in.	1.8
6.3 mm	1/4 in.	1.8
5.6 mm	No. 4	1.6
4.75 mm	No. 4	1.6
4 mm	No. 5	1.4
3.35 mm	No. 6	1.25
2.8 mm	No. 7	1.12
2.36 mm	No. 8	1
2 mm	No. 10	0.9
1.7 mm	No. 12	0.8
1.4 mm	No. 14	0.71
1.18 mm	No. 16	0.63
1 mm	No. 18	0.56
850 µm	No. 20	0.5
710 µm	No. 25	0.45
600 µm	No. 30	0.4
500 µm	No. 35	0.315
425 µm	No. 40	0.28
355 µm	No. 45	0.224
300 µm	No. 50	0.2
250 µm	No. 60	0.16
212 µm	No. 70	0.14
180 µm	No. 80	0.125
150 µm	No. 100	0.1
125 µm	No. 120	0.09
106 µm	No. 140	0.071
90 µm	No. 170	0.063
75 µm	No. 200	0.05
63 µm	No. 230	0.045
53 µm	No. 270	0.036
45 µm	No. 325	0.032
38 µm	No. 400	0.03
32 µm	No. 450	0.028
25 µm	No. 500	0.025
20 µm	No. 635	0.02

**Tabla 2**

**DIMENSIONES DEL MARCO DE TAMIZ ESTÁNDAR**

Díámetro Nominal	Díámetro promedio pulgadas (mm)		Cuerpo de Tamiz, A
	Interior de la parte superior B	Exterior en el fondo C	
3	3.000 + 0.000 / - 0.000 (76.200 / - 0.000)	3.000 + 0.000 / - 0.000 (76.200 / - 0.000)	1.14 (29.26)
8	4.000 + 0.000 / - 0.000 (101.600 / - 0.000)	4.000 + 0.000 / - 0.000 (101.600 / - 0.000)	1.54 (39.12)
8	8.000 + 0.000 / - 0.000 (203.200 / - 0.000)	8.000 + 0.000 / - 0.000 (203.200 / - 0.000)	2.05 (51.81)
10	10.000 + 0.000 / - 0.000 (254.000 / - 0.000)	10.000 + 0.000 / - 0.000 (254.000 / - 0.000)	2.16 (54.91)
12	12.000 + 0.000 / - 0.000 (304.800 / - 0.000)	12.000 + 0.000 / - 0.000 (304.800 / - 0.000)	2.34 (59.43)

**Tabla No. 2**

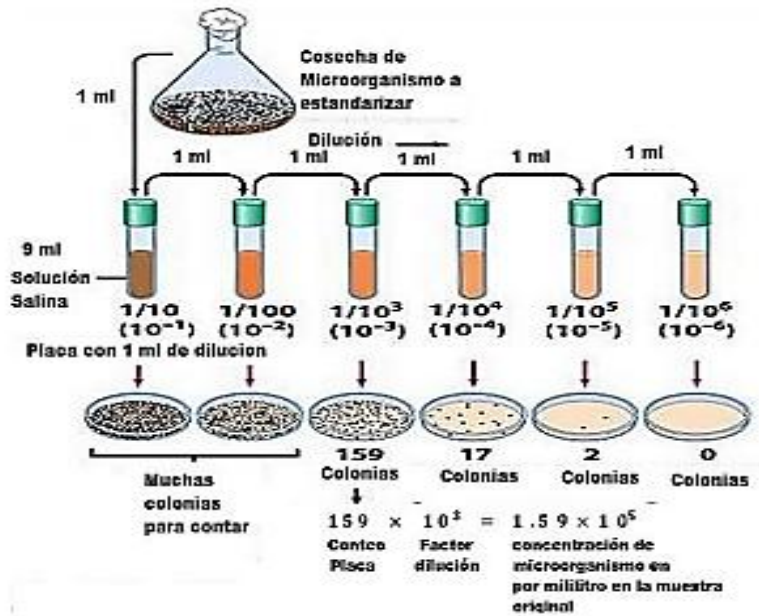
A. No se excluyen otras alturas de marco.  
 B. Medida 5 mm (0.2 pulgadas) por debajo de la superficie de la tela.  
 C. Distancia desde la parte superior del marco hasta la superficie de la tela del tamiz.  
 D. FH= Altura Plena; HH= Altura media; IH= Altura Intermedia

**Tabla 1**

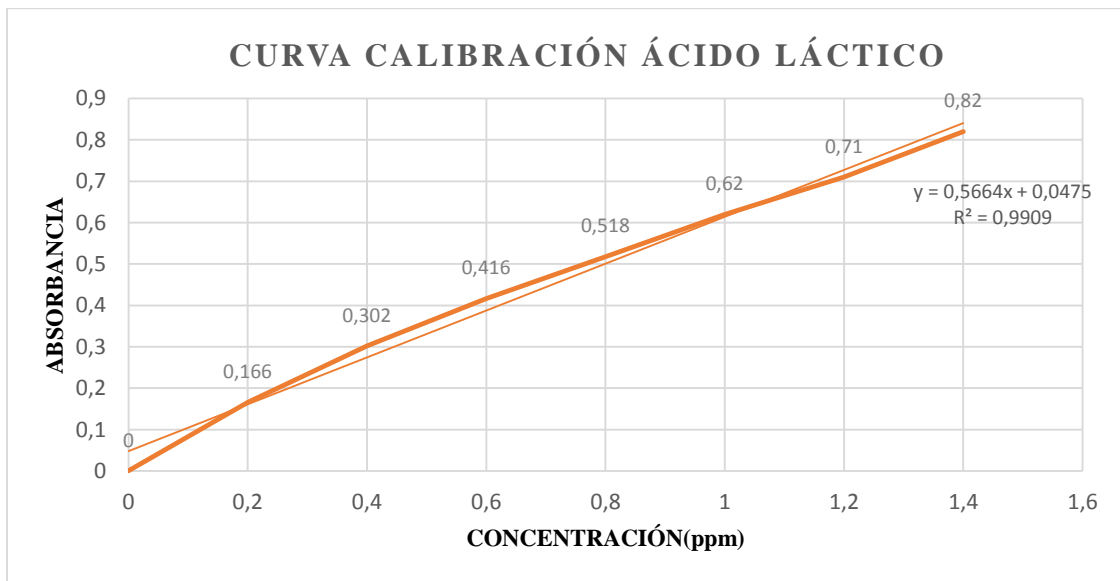
**DIMENSIONES NOMINALES, VARIACIONES PERMISIBLES PARA TEJIDO DE ALAMBRE DE TAMICES DE ENSAYO ESTÁNDAR**

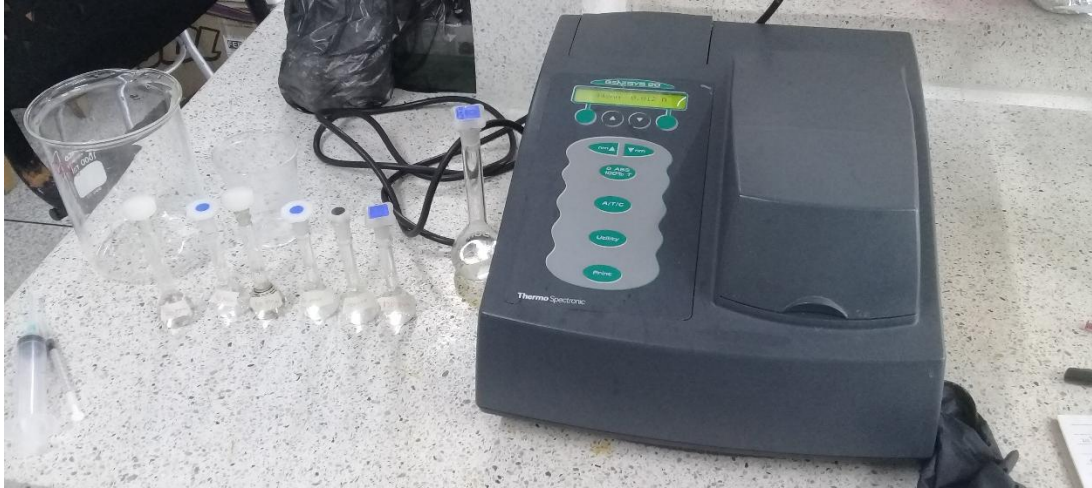
Designación del Tamiz Estándar	Alternativo	Díámetro nominal del alambre mm
125 mm	5 in.	8
106 mm	4.24 in.	6.3
100 mm	4 in.	6.3
90 mm	3 1/2 in.	6.3
75 mm	3 in.	6.3
63 mm	2 1/2 in.	5.6
53 mm	2.12 in.	5
50 mm	2 in.	5
45 mm	1 3/4 in.	4.5
37.5 mm	1 1/2 in.	4.5
31.5 mm	1 1/4 in.	4
26.5 mm	1.06 in.	3.55
25 mm	1.00 in.	3.55
22.4 mm	7/8 in.	3.55
19 mm	3/4 in.	3.15
16 mm	5/8 in.	3.15
13.2 mm	1/2 in.	2.8
12.5 mm	1/2 in.	2.5
11.2 mm	7/16 in.	2.5
9.5 mm	3/8 in.	2.24
8 mm	5/16 in.	2
6.7 mm	0.265 in.	1.8
6.3 mm	1/4 in.	1.8
5.6 mm	No. 4	1.6
4.75 mm	No. 4	1.6
4 mm	No. 5	1.4
3.35 mm	No. 6	1.25
2.8 mm	No. 7	1.12
2.36 mm	No. 8	1
2 mm	No. 10	0.9
1.7 mm	No. 12	0.8
1.4 mm	No. 14	0.71
1.18 mm	No. 16	0.63
1 mm	No. 18	0.56
850 µm	No. 20	0.5
710 µm	No. 25	0.45
600 µm	No. 30	0.4
500 µm	No. 35	0.315
425 µm	No. 40	0.28
355 µm	No. 45	0.224
300 µm	No. 50	0.2
250 µm	No. 60	0.16
212 µm	No. 70	0.14
180 µm	No. 80	0.125
150 µm	No. 100	0.1
125 µm	No. 120	0.09
106 µm	No. 140	0.071
90 µm	No. 170	0.063
75 µm	No. 200	0.05
63 µm	No. 230	0.045
53 µm	No. 270	0.036
45 µm	No. 325	0.032
38 µm	No. 400	0.03
32 µm	No. 450	0.028
25 µm	No. 500	0.025
20 µm	No. 635	0.02

**ANEXO 3. Estandarización de microorganismos (Akerberg; 1998)**



**ANEXO 4. Preparación curva de calibración**





**ANEXO 5. Color de almidón**





## ANEXO 6. Valores de medidas de pH y absorbancias.



SEGUIMIENTO DE pH	Muestras del yogurt					
	Tiempo(horas)	0	6	12	18	24
0,025 %	5,31	5,13	4,81	4	3,98	3,99
0,05 %	5,38	5,05	4,95	4,04	4,01	4,16
0,075 %	5,31	5,18	4,92	4,03	4,02	4,17
0,10 %	5,39	5,2	4,97	4,08	4,05	4,19
0,125%	5,27	5,17	4,91	4,06	4,01	4,21
0,125%	5,41	5,23	5,01	4,05	4,15	4,31
Absorbancias	0	6	12	18	24	30
0,025 %	0	0,338	0,522	0,72	0,728	0,391
0,05 %	0	0,402	0,489	0,696	0,615	0,325
0,075 %	0	0,477	0,511	0,703	0,698	0,394
0,10 %	0	0,497	0,478	0,668	0,653	0,367
0,125%	0	0,451	0,589	0,694	0,688	0,386
0,125%	0	0,553	0,59	0,697	0,69	0,378



<b>SEGUIMIENTO DE pH</b>	<b>Muestras Liofilizadas</b>					
<b>Tiempo(horas)</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>30</b>
0,025 %	5,55	5,1	4,62	4,2	4,04	4,25
0,05 %	5,55	5,22	4,73	4,14	4,07	4,27
0,075 %	5,37	5,03	4,53	4,18	4,16	4,35
0,10 %	5,47	5,19	4,77	4,24	4,22	4,42
0,125%	5,5	5,21	4,63	4,28	4,19	4,31
0,125%	5,49	5,11	4,73	4,28	4,27	4,37
<b>Absorbancias</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>24</b>	<b>30</b>
0,025 %	0	0,416	0,572	0,69	0,701	0,361
0,05 %	0	0,433	0,528	0,652	0,665	0,365
0,075 %	0	0,447	0,589	0,754	0,743	0,392
0,10 %	0	0,474	0,617	0,813	0,801	0,367
0,125%	0	0,469	0,649	0,733	0,734	0,323
0,125%	0	0,451	0,598	0,718	0,708	0,32

**ANEXO 7.** Montaje de destilación para el ácido láctico.

