

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de Proyecto para optar por el
Grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos

**Desarrollo de un proceso de fermentación para la producción de ácido
láctico, utilizando un sustrato a base de un desecho de piña (*Ananas
comosus*) y el microorganismo *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*.**

Carla Araya Cloutier

Carné A40353

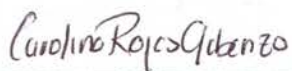
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

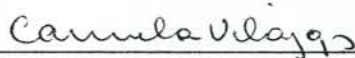
Marzo, 2010

Hoja de aprobación del Trabajo Final de Graduación

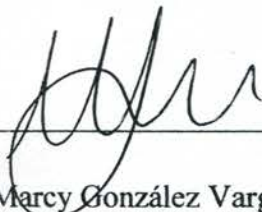
Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos.



Lic. Carolina Rojas Garbanzo
Directora del Proyecto



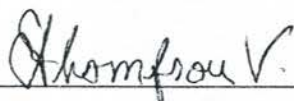
M.Sc. Carmela Velázquez Carrillo
Asesora del Proyecto



Lic. Marcy González Vargas
Asesora del Proyecto



M.Sc. Ruth de la Asunción Romero
Presidente del Tribunal Examinador



M.Sc. Eduardo Thompson Vicente
Profesor Designado

Derechos de propiedad intelectual

Este trabajo final de graduación se considera de carácter público.

*Este trabajo se lo dedico con mucho amor
a mis padres por siempre apoyarme
y creer en mi...*

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mi comité asesor que sin ellas esto no hubiera sido posible. A Carolina Rojas por el esfuerzo extraordinario que hizo para ayudarme, gracias por siempre sacar el tiempo para atenderme. A Carmela Velázquez por su aporte y orientación del proyecto. A Marcy González por su apoyo y consejos durante la investigación. Mil gracias a las tres por ayudarme a terminar este proyecto para continuar con mis sueños.

Agradezco también a Vanny Mora, por su colaboración indispensable armando los sistemas de fermentación y tomando muestras, en el Laboratorio de Microbiología, así como a doña Ligi por sus buenos deseos. A todo el personal del Laboratorio de Química que siempre estuvo dispuesto a ayudarme cuando lo necesité y especialmente a Nancy, Randall y Mariela por su amistad. A Camacho y Alonso por ayudarme en la recolección del desecho de piña y en las labores de planta piloto.

Agradezco al CITA en general por brindarme las facilidades para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco a Carlos Iván porque, aún sin estar presente, me acompañó durante todo este camino; gracias por haber sido mi principal apoyo para salir adelante.

Agradezco de todo corazón a mi familia por apoyarme en cumplir esta meta y a mis padres por nunca dudar de la oportunidad que me dieron de estudiar. Y agradezco a Dios por estar siempre conmigo pero sobretodo por acompañarme en aquellos momentos donde se hacía difícil continuar.

Índice general

Hoja de aprobación del Trabajo Final de Graduación.....	i
Derechos de propiedad intelectual.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Resumen.....	ix
I. Justificación.....	1
II. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
III. Marco teórico.....	5
3.1 Piña.....	5
3.1.1 Aspectos nutricionales.....	5
3.1.2 Desechos de la piña.....	6
3.2 Acido láctico.....	8
3.2.1 Propiedades fisico-químicas.....	8
3.2.2 Aplicaciones del ácido láctico.....	9
3.2.3 Tecnología de producción.....	12
3.2.4 Microorganismos productores de ácido láctico.....	14
3.2.5 Bacterias lácticas.....	14
3.2.6 Requerimientos nutricionales.....	16
3.2.7 Sustratos de fermentación.....	18
3.2.8 Condiciones operativas de las fermentaciones.....	19
IV. Materiales y métodos.....	24
4.1. Ubicación del proyecto.....	24
4.2. Microorganismo.....	24
4.2.1. Procedimiento de activación.....	24
4.3. Enzima.....	24
4.3.1. Determinación de la actividad enzimática.....	25
4.3.2. Hidrólisis enzimática del medio de fermentación.....	25
4.4. Materia prima.....	25
4.4.1. Obtención y tratamiento del desecho de piña.....	26
4.4.2. Formulación del sustrato de fermentación.....	27
4.5. Fermentaciones lácticas.....	27
4.5.1. Equipo de fermentación y variables de control.....	27
4.5.2. Modalidad lote-repetido.....	28
4.5.3. Muestreo.....	29

4.6.	Efecto de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico	29
4.6.1.	Composición del medio de fermentación	29
4.6.2.	Diseño experimental	30
4.6.3.	Análisis estadístico	31
4.7.	Efecto de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico.....	31
4.7.1.	Diseño experimental	31
4.7.2.	Análisis estadístico	32
4.8.	Optimización de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfatos en el medio de fermentación.....	32
4.8.1.	Diseño experimental	34
4.8.2.	Análisis estadístico	35
4.9.	Métodos de Análisis.....	36
4.9.1.	Análisis del jugo de piña.....	36
4.9.2.	Muestras de fermentación.....	37
4.10.	Eficiencia de la fermentación.....	39
V.	Resultados y Discusión.....	41
5.1.	Caracterización físico química del jugo de piña de desecho.....	41
5.2.	Efecto de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico.	43
5.3.	Efecto de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico.	49
5.4.	Optimización de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio de fermentación.....	55
VI.	Conclusiones.....	62
VII.	Recomendaciones	63
VIII.	Bibliografía	64
IX.	Apéndices	75
	Apéndice A: Caracterización físico-química del jugo piña.	75
	Apéndice B: Pruebas de la hidrólisis enzimática del medio con invertasa.....	77
	Apéndice C: Pruebas de la concentración inicial de azúcares en el medio de cultivo.....	83
	Apéndice D: Optimización de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio de cultivo.....	91
	Apéndice E: Análisis estadísticos	98

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición química de un desecho líquido de piña (Sasaki <i>et al.</i> , 1991).....	7
Cuadro 2. Propiedades físico-químicas del ácido láctico (Serna & Rodríguez, 2005; Bogaert & Naidu, 2000)	9
Cuadro 3. Concentración de nutrientes adicionados al medio de fermentación a base de jugo de piña para evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática.....	30
Cuadro 4. Diseño experimental utilizado para las pruebas de evaluación de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación	30
Cuadro 5. Diseño experimental para las pruebas de evaluación de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación, a través del contenido de jugo de piña.	32
Cuadro 6. Diseño central compuesto para la optimización del nivel de extracto de levadura y sales de fosfatos en el medio de fermentación.....	35
Cuadro 7. Diseño experimental para optimizar el nivel de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio de fermentación.....	35
Cuadro 8. Caracterización físico-química del jugo obtenido del desecho de pulpa de piña de la industria procesadora <i>Florida Products</i> , Heredia.....	41
Cuadro 9. Resultados de las pruebas de estudio del efecto de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación con Invertase	47
Cuadro 10. Resultados de las pruebas de estudio de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación.....	51

Índice de figuras

Figura 1. Etapas del procesamiento de la piña (Bin & Moch, 2007).....	6
Figura 2. Formas isométricas del ácido láctico (Rashid 2008).....	8
Figura 3. Síntesis de ácido poliláctico (Rashid, 2008)	11
Figura 4. Síntesis química del ácido láctico (Rashid, 2008).....	12
Figura 5. Proceso de producción de ácido láctico por fermentación (Wee <i>et al.</i> , 2006).....	14
Figura 6. Curva de crecimiento bacteriano	21
Figura 7. Flujo de proceso para la preparación del jugo de piña utilizado como sustrato para la fermentación láctica.	26
Figura 8. Diagrama del sistema de fermentación básico utilizado para producción de ácido láctico por lote repetido.	28
Figura 9. Diagrama del sistema de fermentación utilizado en las pruebas de optimización de nutrientes (extracto de levadura y sales de fosfato).....	34
Figura 10. Cinéticas de fermentaciones promedio (n=3) con <i>Lactobacillus casei</i> sub. <i>rhamnosus</i> de un medio control a base de jugo de piña (a) y uno con tratamiento enzimático con invertasa (b).....	43
Figura 11. Comparación de la producción promedio de ácido láctico en fermentaciones con <i>Lactobacillus casei</i> sub. <i>rhamnosus</i> de un medio control a base de jugo de piña y uno con tratamiento enzimático con invertasa.	46
Figura 12. Promedio (n=3) de las cinéticas de fermentación de un medio a base de jugo de piña tratado con invertasa, al 60 (a), 80 (b) y 100% (c) (v/v).....	49
Figura 13. Producción promedio de ácido láctico en fermentaciones con <i>Lactobacillus casei</i> sub. <i>rhamnosus</i> de un medio a base de jugo de piña al 60,80 y 100% (v/v).	50
Figura 14. Grafica de contorno (a) y superficie de respuesta (b) de la productividad total en relación a la concentración de extracto de levadura y sales de fosfatos	56
Figura 15. Grafica de contorno (a) y superficie de respuesta (b) de la productividad máxima en relación a la concentración de extracto de levadura y fosfatos.....	57
Figura 16. Grafica de contorno (a) y superficie de respuesta (b) del tiempo de fase lag en relación a la concentración de extracto de levadura y fosfatos.....	60

Resumen

Se estudió la aplicación potencial de un desecho de piña como sustrato para producir ácido láctico por medio de la fermentación con *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*. Primeramente se realizó la caracterización físico-química del jugo obtenido del prensado del desecho de pulpa de piña, obtenido de la industria *Florida Products*. Posteriormente, se evaluó el efecto de la hidrólisis con invertasa del medio de cultivo a base de jugo de piña. El tratamiento enzimático permitió aumentar significativamente ($p < 0,05$) el rendimiento de 84 a 98% y la concentración de ácido láctico final de 64 a 75g/L, al obtenerse un consumo total de los azúcares presentes en el medio; mientras que las productividades (total y máxima) disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) con el tratamiento enzimático. Además, se estudió el efecto del nivel de azúcares iniciales en el medio a través del contenido de jugo de piña en el medio. Se evaluaron tres niveles: 60, 80 y 100% (v/v) de jugo de piña en agua. La bacteria logró consumir todos los azúcares presentes sin ninguna inhibición aparente, consiguiendo siempre rendimientos de 100%. La concentración máxima de ácido láctico obtenida fue de 103g/L con el medio de 100% jugo de piña compuesto por 99g/L de azúcares iniciales; sin embargo, la productividad total disminuyó significativamente ($p < 0,05$) al utilizar 100% de jugo de piña. La productividad máxima no se vio afectada en el ámbito de trabajo. El tiempo de fermentación y de fase lag incrementaron significativamente ($p < 0,05$) a medida que el contenido de jugo de piña aumentaba de 60 a 100%. Por último, se realizó un estudio del contenido de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio de cultivo mediante la metodología de superficie de respuesta, con el objetivo de encontrar un óptimo en la producción de ácido láctico y eficiencia general de la fermentación. Se logró obtener un ajuste significativo ($p < 0,05$) para las variables productividad total, productividad máxima y tiempo de fase lag, dentro del ámbito de estudio. Una productividad total de 6,5g/h de ácido láctico y productividad máxima de 4g/L*h se obtuvo con 20g/L de extracto de levadura y 4g/L de sales de fosfatos. Para el tiempo de fase lag se encontró un mínimo de 4h con una concentración de extracto de levadura de 12,7g/L y 0,89g/L de sales de fosfato. El jugo de piña de desecho al 100% representa una buena alternativa para la producción industrial de ácido láctico a través de la fermentación, utilizando los niveles de suplementación con nutrientes adecuados.

I. Justificación

Aproximadamente 3.5 billones de toneladas de desechos de la agricultura son producidos anualmente en el mundo (John *et al.*, 2007). Específicamente, la industria procesadora de alimentos produce una enorme cantidad de desechos con alto contenido de carbohidratos, que poseen altos costos de disposición y que representan un desafío ambiental (Jin *et al.*, 2005).

Debido al desarrollo industrial acelerado de las últimas décadas, existe la necesidad de desarrollar procesos ambientalmente sostenibles (Jin *et al.*, 2005). Esta tendencia hacia la sostenibilidad ambiental y utilización de recursos renovables ha incrementado significativamente el interés en la producción y recuperación de productos biotecnológicos (John *et al.*, 2007). El disparo en el precio del petróleo ha sido uno de los principales responsables del aumento de este interés en la producción de insumos químicos por medio de procesos fermentativos y en el potencial de nuevas tecnologías de fermentación energéticamente más eficientes (Wasewar *et al.*, 2004).

Los desechos agroindustriales son una fuente rica de energía y materia biodegradable, por esto existe un gran potencial biotecnológico de estos residuos como materia prima para la producción de productos de valor agregado: desde enzimas, ácidos orgánicos, etanol, aminoácidos y proteína celular, hasta alimentos, aditivos y químicos industriales. (John *et al.*, 2007). Actualmente el número de estos insumos producidos por fermentación está creciendo y está comenzando a competir con la producción sintética tradicional de productos químicos (Wasewar *et al.*, 2004).

En Costa Rica, la industrialización de productos agrícolas genera un 86% del total de desechos del sector industrial. La utilización de estos residuos como una fuente alternativa de materiales de mayor valor agregado, resultaría ventajosa desde el punto de vista económico y ambiental (Quesada *et al.*, 2005).

La piña (*Ananas comosus*) es uno de los cultivos con mayor potencial de mercado internacional y de alta rentabilidad financiera (Quijandría *et al.*, 1997). Es el segundo producto agrícola en importancia exportable de Costa Rica y el cuarto en la exportación

nacional (Elizondo, 2008). Según la FAO, para el año 2008 el área cosechada de piña en Costa Rica fue estimada en 35 mil hectáreas con una producción de 1 624 000 TM (FAOSTAT, 2010) y el valor de las exportaciones alcanzó los \$574,5 millones (COMEX, 2009). El principal mercado de exportación de piña fresca es Estados Unidos, con más de un 50% del total; otros mercados son Holanda, Bélgica y Alemania (Elizondo, 2007).

Del total de piña fresca producida, entre el 15 y el 26% se considera fruta de rechazo (Saborío & Camacho, 1996), es decir, no cumple con los requisitos de calidad necesarios para su exportación (fruta pequeña, sobre madura, etc.). Esta piña se vende como tal en el mercado local o se somete a procesamiento para obtener otros productos (piña deshidratada, en conserva o jugo) (Bin & Moch, 2007). De hecho Costa Rica es uno de los principales exportadores de jugo de piña a nivel mundial (Kortbech-Olesen, 1996).

En la industria piñera, generalmente la fruta es pelada, descorazonada, troceada y despulpada. Los desechos de la industrialización de la piña constituyen hasta el 65% del fruto, que incluyen la corona (parte superior del fruto), el corazón, las cáscaras y el rastrojo (Quesada *et al.*, 2005). Las cáscaras y el corazón son prensados para extraer jugo. Después del prensado, los desechos sólidos son usados como alimento animal y los desechos líquidos deben ser tratados para su correcta disposición (Rashid, 2008). En el caso de la producción de jugo, el rendimiento promedio nacional en 1992 era entre 35 y 50% del peso original de la fruta (Quijandría *et al.*, 1997). De manera que existen grandes volúmenes de desechos de la fruta en las industrias y que podrían ser aprovechados de otras formas alternativas.

La utilización de los residuos de piña para la producción biotecnológica de ácido láctico es una opción interesante para reducir el costo de producción de este producto químico y, a la vez, permite dar valor agregado a un desecho agroindustrial tan importante en nuestro país. Algunas ventajas que presenta la piña como sustrato para la fermentación es la presencia de una cantidad significativa de azúcares fermentables como glucosa, fructosa y sacarosa (Krueger *et al.*, 1992), así como de otros nutrientes (calcio, magnesio, potasio, fósforo, ácido ascórbico, vitamina A, etc.) (Bin & Moch, 2007); además de su alta producción a nivel nacional que la convierte en un sustrato barato y de fácil obtención.

El ácido láctico es uno de los compuestos químicos con mayor demanda a nivel mundial por tener gran aplicabilidad en la industria alimentaria, química y farmacéutica. La demanda mundial actual de ácido láctico está estimada en 130 y 150 mil TM por año (Wee *et al.*, 2006), y muestra un incremento anual de un 15% (Jin *et al.*, 2005). Para el año 2009 en Costa Rica se importaron más de 555 mil kg de este reactivo químico, con un valor de \$1 215 000 (INEC, 2009). Por lo tanto, la producción a nivel nacional de este aditivo representaría un ahorro de divisas importante para el país.

El interés en la producción biotecnológica de ácido láctico ha incrementado debido a las nuevas tendencias ambientalistas, ya que ofrece una alternativa a la contaminación causada por las industrias químicas al utilizar recursos renovables para su producción y reducir el consumo energético (Wee *et al.*, 2006; John *et al.*, 2007).

Además, el ácido láctico puede ser utilizado como materia prima para la producción de plásticos biodegradables (Hirata *et al.*, 2005). Estos materiales son más atractivos debido a que son amigables con el ambiente porque se pueden producir biotecnológicamente a partir de desechos agroindustriales; además, el aumento en el precio del petróleo ha hecho más costosa la producción de los plásticos tradicionales a base de este insumo (Mehta *et al.*, 2005; Wee *et al.*, 2006; John *et al.*, 2007). La alta especificidad del producto obtenido es la ventaja principal de las fermentaciones lácticas, ya que produce el estereoisómero deseado, L(+) ó D(-) ácido láctico ópticamente puro (John *et al.*, 2007), a diferencia del proceso tradicional que produce una mezcla racémica (Serna & Rodríguez, 2005).

Uno de los obstáculos más importantes para producir ácido láctico a nivel industrial es el costo de la materia prima y del uso de nutrientes adicionales (John *et al.*, 2006), que incrementa el costo total del proceso de producción. La investigación actual está enfocada en hacer el proceso económicamente factible, usando medios baratos y con los menores niveles de suplementación (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000). Debido a esto, se considera importante la formulación y optimización de un medio de cultivo, a base de un desecho de piña, para la producción de ácido láctico a través de un proceso de fermentación eficiente.

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar un proceso de fermentación para la producción de ácido láctico, utilizando un sustrato a base de un desecho agroindustrial de piña (*Ananas comosus*) y el microorganismo *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar químicamente el jugo obtenido del desecho de pulpa de piña, utilizado como sustrato base para la producción de ácido láctico.
2. Determinar el efecto de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación con invertasa, sobre la eficiencia de producción de ácido láctico.
3. Determinar el efecto de la concentración inicial de azúcares en el medio de fermentación, a través del contenido de jugo en el medio de cultivo, sobre la eficiencia de producción de ácido láctico.
4. Optimizar la concentración de extracto de levadura y de sales de fosfatos en el medio de fermentación, que den la mayor eficiencia del proceso de producción de ácido láctico.

III. Marco teórico

3.1 Piña

La piña (*Ananas comusus*) es una fruta originaria de Suramérica, que se ha expandido a muchas otras áreas y se ha convertido en una fruta importante para la región tropical. En Costa Rica el cultivo de piña aumentó en más de un 300% en los últimos 10 años, según la Cámara de Productores y Exportadores de Piña, con más de 45 mil hectáreas sembradas actualmente (Camacho, 2009). La mayoría de la piña cultivada en nuestro país se encuentra en las zonas del Pacífico Sur, Atlántico y Zona Norte.

3.1.1 Aspectos nutricionales

La parte comestible de la mayoría de las frutas contiene entre un 75 y un 95% de agua. Las frutas son bajas en contenido proteico, pero en general contienen bastantes carbohidratos. Estos carbohidratos incluyen azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, además de almidón dependiendo del tipo de fruta y grado de maduración. El pH de las frutas usualmente se encuentra entre 2,5 y 4,5. Otros componentes de las frutas son: ácidos orgánicos, celulosa, sales minerales, pectina, gomas, taninos, pigmentos y constituyentes volátiles (Rashid, 2008).

El 97% de la piña que se produce en Costa Rica es de la variedad *Golden* (Camacho, 2009), la cual es un híbrido desarrollado a partir de la Cayena Lisa, con un alto contenido de azúcar y entre 15 y 17°Brix. Los carbohidratos en piña representan hasta un 85% de los sólidos totales y la fibra se encuentra entre un 2 y 3% (De la Cruz & García, s.f.). De los carbohidratos presentes en el jugo de piña, los componentes principales son la glucosa (12-45 g/L), la fructosa (17-48 g/L) y la sacarosa (25-97 g/L) (Rashid, 2008). También existen otros compuestos como el ácido cítrico, el ácido málico y el potasio (Krueger *et al.*, 1992).

Naturalmente, la composición va depender del origen y grado de maduración de la fruta. Aún así, la piña es un sustrato muy conveniente para el desarrollo de un proceso de fermentación por su alto contenido de carbohidratos, específicamente azúcares, y por su alta disponibilidad en nuestro país.

3.1.2 Desechos de la piña

El rendimiento de la piña lista para procesar respecto a la piña entera es de un 45 a un 55% (Murillo, s.f). A partir de la piña entera se puede obtener una gran variedad de productos: piña enlatada, piña deshidratada, jugo o néctar de piña, pulpa concentrada, jaleas y mermeladas, vinagre, etc. En lo que respecta a Costa Rica, el jugo de piña es uno de los productos más populares. En el 2003 se exportó 15 mil TM de jugo de piña con un valor de \$11 millones (Camacho, 2009).

Los desechos principales generados por el procesamiento de frutas son: cáscaras, tallos, semillas y materia orgánica en suspensión (Bin & Moch, 2007). En la Figura 1, se presenta un proceso básico de procesamiento de piña fresca.

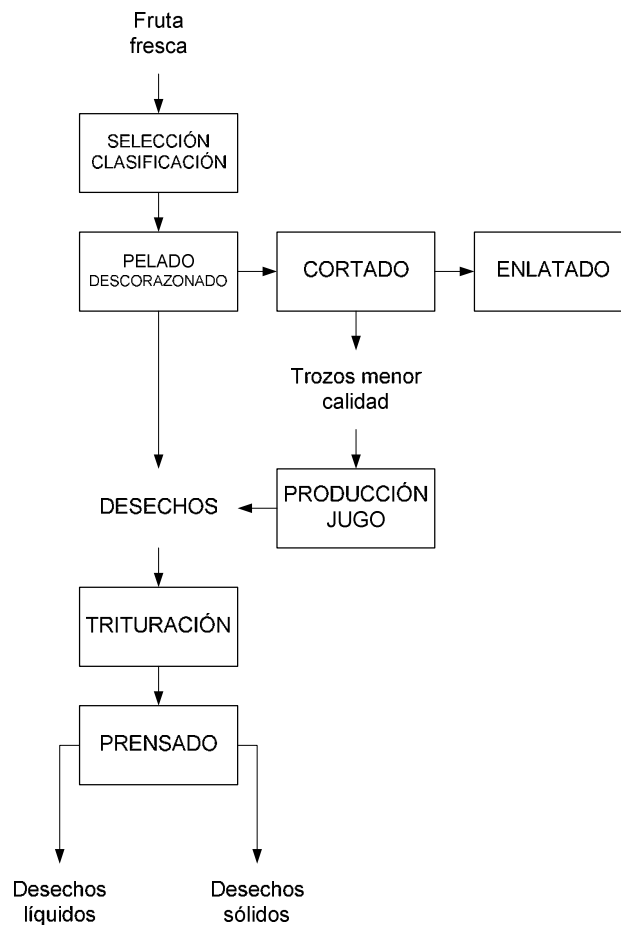


Figura 1. Etapas del procesamiento de la piña (Bin & Moch, 2007)

En el mundo se estima que se generan alrededor de 1,600,000 TM de desechos de piña anuales, sólo generados por la industria de enlatado de piña, de los cuales el 50% son desechos líquidos y 50% son sólidos (Sasaki *et al.*, 1991). En la industria de piña el agua de desecho se caracteriza por tener un alto contenido de materia orgánica en comparación con otras frutas como los cítricos y la manzana (Moon & Woodroof, 1986).

La composición de un desecho líquido del procesamiento de piña se especifica en el Cuadro 1. La composición variará naturalmente según el área, la temporada y el proceso.

Cuadro 1. Composición química de un desecho líquido de piña (Sasaki *et al.*, 1991)

Composición	Desecho líquido de piña	
	Antes de esterilizar	Después de la esterilización
Oxígeno disuelto (g/L)	100.8	103.7
Azúcares reductores (g/L)	39.20	41.20
Azúcares totales (g/L)	100.0	100.9
Dextrano (g/L)	1.50	1.50
Rafinosa (g/L)	2.60	1.50
Sacarosa (g/L)	40.1	40.1
Glucosa (g/L)	23.6	23.6
Galactosa (g/L)	1.70	2.10
Fructosa (g/L)	14.0	15.6
Proteína (g/L)	0.90	-
pH	4.00	4.00

Además, el desecho de piña contiene cantidades pequeñas de nitrógeno y elementos traza como magnesio, manganeso, sodio y potasio, que pueden ser beneficiosos para el crecimiento de bacterias lácticas (Rashid, 2008). Como se observa, los azúcares principales son la sacarosa, glucosa y fructosa, mientras que las dextrinas, rafinosa y galactosa existen pero en menores concentraciones.

Todo aquel material que presenta un alto contenido de azúcares tiene un alto potencial como materia prima para obtener productos de valor agregado, tales como biomasa, metano, alcoholes, enzimas, antibióticos y ácidos orgánicos a través de la fermentación. En el caso de piña, existen estudios que han utilizado estos desechos para producir ácido acético, metano, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico y etanol (Bin & Moch, 2007).

3.2 Acido láctico

3.2.1 Propiedades físico-químicas

El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropiónico) es el ácido hidroxicarboxílico más común en la naturaleza (Narayanan *et al.*, 2004). El ácido láctico tiene un carbono quiral asimétrico lo cual da lugar a su actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el ácido D(-) láctico y el L(+) láctico; este último predomina en la naturaleza y es el único metabolizado por el organismo humano (Serna & Rodríguez, 2005).

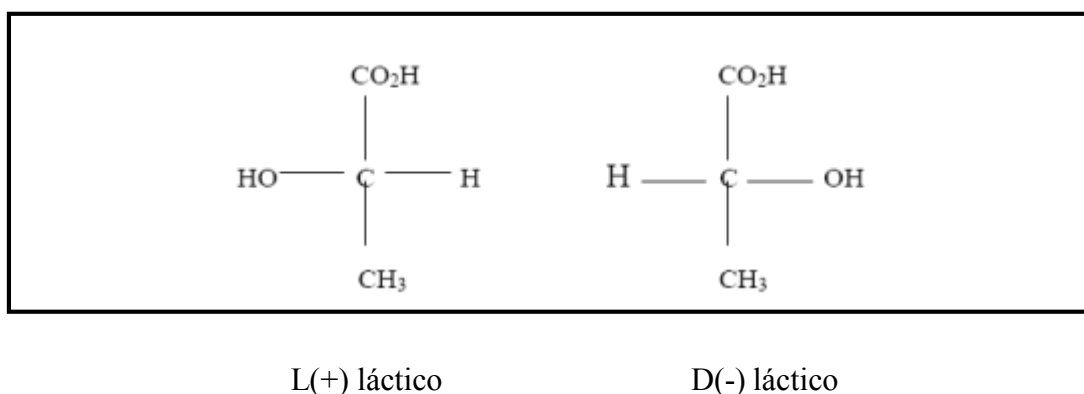


Figura 2. Formas isométricas del ácido láctico (Rashid 2008)

El ácido láctico se encuentra generalmente en estado líquido, es soluble en agua e incoloro. En estado puro, cada uno de los isómeros ópticos forma cristales blancos con punto de fusión alto (52-54°C), mientras que una mezcla racémica que contiene 50% de cada isómero presenta un punto de fusión entre 16 y 33°C (Bogaert & Naidu, 2000). El punto de ebullición está entre 125 y 140°C (Serna & Rodríguez, 2005).

A continuación se presentan algunas de las propiedades físicas del ácido láctico:

Cuadro 2. Propiedades físico-químicas del ácido láctico (Serna & Rodríguez, 2005; Bogaert & Naidu, 2000)

Fórmula	C ₃ H ₆ O ₃
Peso molecular	90,08
Índice de refracción (25°C)	1,4414
Punto fusión	L(+) D(-): 52,8-54°C Mezcla DL: 16,8-33°C
Punto ebullición	125-140°C
Densidad	1,249 g/mL
pK_a (25°C)	3,86

3.2.2 Aplicaciones del ácido láctico

El 85% del ácido láctico que se produce a nivel mundial es utilizado en la industria alimentaria, mientras que el otro 15% se usa en aplicaciones no alimentarias (John *et al.*, 2007). Existen muchas propiedades del ácido láctico que lo convierten en un ingrediente muy versátil para usar en alimentos (Rashid, 2008).

El ácido láctico es considerado un aditivo seguro o *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA de los Estados Unidos, así como por otras autoridades internacionales (Narayanan *et al.*, 2004; Rashid, 2008). En la industria de alimentos ha sido utilizado principalmente como acidulante, acentuador del sabor y preservante en alimentos y bebidas por varias décadas (John *et al.*, 2007); se utiliza en productos de panificación, confitería, bebidas, sopas, productos lácteos, cerveza, jaleas y mermeladas, mayonesa, aderezos, entre otros (Datta *et al.*, 1995).

El ácido láctico es agregado a la margarina, mantequilla, yogurt, etc., para mejorar su sabor; mientras que el lactato de calcio se agrega a la leche y bebidas para deportistas como suplemento mineral (Naveena *et al.*, 2004). En productos de panificación, el lactato de calcio es un buen mejorador de masa, mientras que el lactato de sodio actúa como

emulsionante (John *et al.*, 2007). En la industria de jaleas y mermeladas es utilizado como agente gelificante; también se agrega a los pepinillos, aceitunas y vegetales encurtidos como agente encurtidor (Naveena *et al.*, 2004). En confitería, el ácido láctico es utilizado, no sólo por su sabor, sino también por su efecto en el pH de la mezcla para obtener el punto de fijado correcto. Algunas ventajas de agregar ácido láctico en confites incluyen, una velocidad e inversión baja, mejor manejabilidad y habilidad para producir confites transparentes (Wee *et al.*, 2006).

Como preservante, el ácido láctico y sus sales pueden aumentar la vida útil de alimentos como embutidos, carnes y pescado hasta en un 30 a 50%, al inhibir el crecimiento de microorganismos de deterioro y patógenos (Naveena *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006).

El hecho de que el ácido láctico es un compuesto naturalmente presente en el cuerpo humano, hace que sea muy útil como ingrediente activo en cosméticos. En este tipo de industria, el ácido láctico se utiliza como agente humectante en lociones y cremas por su alta capacidad de retención de agua; en cremas blanqueadoras y como agente rejuvenecedor de la piel. El etil-lactato, por otra parte, se utiliza en productos para combatir el acné por su acción antimicrobiana (Wee *et al.*, 2006; Rashid, 2008).

El mercado más reciente para el ácido láctico es la producción de plásticos biodegradables a base del ácido poliláctico (Demirci *et al.*, 1998) y la producción de solventes “verdes” como el etil lactato (Singh *et al.*, 2006).

El ácido L-poliláctico es un polímero cristalino con una alta fuerza de tensión, baja elasticidad y absorción de agua, utilizado en productos médicos como artefactos ortopédicos (pines, ligamentos), aplicaciones cardiovasculares (injertos), aplicaciones dentales (prótesis) y suturas. Además, la FDA y las entidades regulatorias europeas han aprobado las resinas del PLA para aplicaciones de tipo alimentarias, como por ejemplo, para material de empaque en alimentos (John *et al.*, 2007).

El ácido poliláctico (PLA) es un material que se produce por la apertura del diéster cíclico del ácido láctico y posterior polimerización. La polimerización da como resultado una “familia” de polímeros que contienen diferentes proporciones de isómeros y pesos

moleculares (Mehta *et al.*, 2005). Posteriormente, el PLA se puede degradar en presencia de agua para dar como resultado ácido láctico nuevamente.

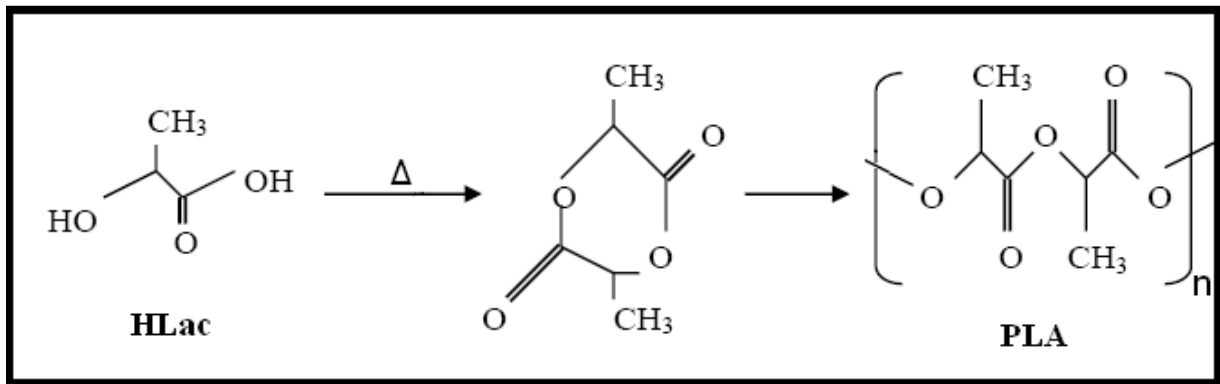


Figura 3. Síntesis de ácido poliláctico (Rashid, 2008)

La demanda de ácido láctico ha aumentado considerablemente, debido a las propiedades del polímero ácido poliláctico (PLA) como una alternativa amigable al ambiente, en remplazo a los plásticos derivados de petroquímicos. Los polímeros del ácido láctico presentan algunas ventajas: son reciclables, son compostables, tienen buena termoplaticidad, transparencia, resistencia a la humedad y alta fuerza de tensión (Siracusa *et al.*, 2008). Estas propiedades físicas del PLA dependen de su peso molecular, la configuración isomérica del ácido láctico y la proporción de cada isómero en el polímero.

Otra área potencial para el ácido láctico y sus derivados es la producción de solventes “verdes”, particularmente ésteres de lactato de bajo peso molecular, alcoholes como el etil, propil y butil lactato (John *et al.*, 2007). En esta categoría, las sales de ácido láctico son utilizadas principalmente en agentes de limpieza para remover depósitos metálicos en tuberías (Wee *et al.*, 2006). La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos aprobó los solventes de ésteres de lactato como ingredientes inertes, con toxicidad despreciable y un excelente perfil ambiental (EPA, 1994).

3.2.3 Tecnología de producción

El ácido láctico es un ácido orgánico que puede ser producido vía síntesis química o por fermentación. La síntesis química se basa en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico en presencia de una base para dar lactonitrilo (Narayanan *et al.*, 2004). El lactonitrilo es recuperado por medio de destilación y luego es hidrolizado con ácidos fuertes para producir una mezcla racémica de D(+) y L(-) ácido láctico (Serna & Rodríguez, 2005). El ácido láctico es esterificado con metanol para producir metil-lactato, para que pueda ser extraído y purificado por destilación, y finalmente es hidrolizado con agua bajo condiciones ácidas para producir nuevamente ácido láctico y metanol, éste último reciclado (Narayanan *et al.*, 2004). El proceso se representa de la siguiente forma:

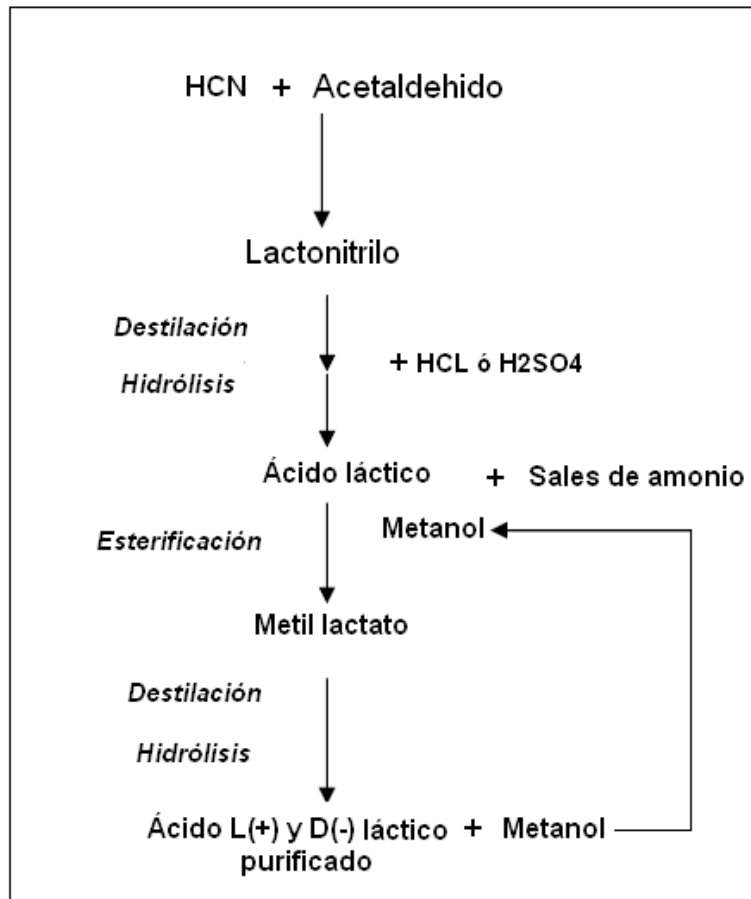


Figura 4. Síntesis química del ácido láctico (Rashid, 2008)

Otras posibles rutas para la síntesis química de ácido láctico incluyen degradación de azúcares catalizada por álcalis; oxidación de propilenglicol; reacción de acetaldehído, monóxido de carbono y agua a temperaturas y presiones altas; hidrólisis del ácido cloropropiónico; oxidación de propileno con ácido nítrico; entre otros (John *et al.*, 2007).

La síntesis química presenta la desventaja de que, además de utilizar solventes tóxicos para el ambiente, el ácido láctico producido es una mezcla racémica de los dos isómeros ópticos, por lo cual, el 90% del ácido láctico producido en el mundo es elaborado por vía biotecnológica (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000).

La producción biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos, y tiene la ventaja de producir ácido láctico estereoespecífico. La efectividad del proceso de producción biotecnológica de ácido láctico 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 sub-productos (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000).

En el proceso comercial de producción de ácido láctico por fermentación, al sustrato se le adiciona otros nutrientes esenciales para el microorganismo, el medio se inocula y se agita; la fermentación dura entre 2 a 4 días y se termina cuando todo el azúcar es consumido, con el fin de facilitar la purificación (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000). Para la obtención del ácido láctico, el caldo de fermentación que contiene lactato de sodio o calcio, se filtra para remover el material celular, se trata con carbón, se evapora y acidifica con ácido sulfúrico para obtener ácido láctico y sulfato de calcio. Este ácido láctico se purifica por medio de una hidrólisis ácida, esterificación con metanol, destilación y una última hidrólisis con agua (Narayanan *et al.*, 2004).

Sin embargo, actualmente existen otras vías de purificación, además de la extracción con solventes, menos tóxicas y más eficientes. La electrodiálisis bipolar acoplada a la fermentación se utiliza para la extracción *in situ* del ácido láctico, resultando en un menor efecto de inhibición por producto, mayores concentraciones de ácido láctico y mejores rendimientos (Habova *et al.*, 2004); además de reducir la generación de desechos de soluciones salinas (Madzingaidzo *et al.*, 2002). La utilización de tecnologías de membranas

como la nanofiltración, ósmosis inversa y resinas de intercambio iónico acopladas al biorreactor también permite la extracción del ácido láctico y la obtención de productos de nivel comercial (González *et al.*, 2006; Polom & Szaniawska, 2006; Wee *et al.*, 2006).

En la siguiente figura se resume el proceso de producción de ácido láctico vía fermentación.



Figura 5. Proceso de producción de ácido láctico por fermentación (Wee *et al.*, 2006)

3.2.4 Microorganismos productores de ácido láctico

Los microorganismos que pueden producir ácido láctico se dividen en dos grupos: bacterias y hongos. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones actualmente se llevan a cabo con bacterias ácido lácticas (BAL) porque las fermentaciones con hongos generalmente requieren aireación, presentan bajas productividades y rendimientos, y formación de productos secundarios, como ácido fumárico y etanol (Wee *et al.*, 2006).

3.2.5 Bacterias lácticas

El grupo de bacterias lácticas (BAL) se caracteriza porque son bacterias *gram* positivas, no esporuladas, catalasa negativas, de hábitat no aerobio pero aerotolerantes, fastidiosas (capacidad de biosíntesis limitada), ácido tolerantes y al no poseer un mecanismo de una cadena de transporte de electrones son estrictamente fermentativas con ácido láctico como producto principal de la fermentación de azúcares (Axelsson, 2004).

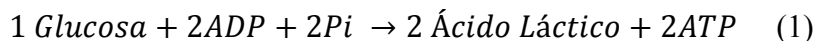
Las BAL son generalmente asociadas a ambientes ricos en nutrientes, como varios alimentos (leche, carne, bebidas y vegetales) pero algunas son también parte de la flora normal de la boca y tracto gastrointestinal de los mamíferos (Axelsson, 2004).

Las bacterias utilizadas para la producción de ácido láctico preferiblemente deben ser termófilas, crecer en condiciones de bajo pH, con poca adición de nutrientes nitrogenados, fermentar rápida y completamente sustratos baratos, producir poca biomasa y subproductos (Akerberg *et al.*, 1998). La mayoría de las especies de los diferentes géneros de BAL tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5, lo cual les da ventaja competitiva frente a otras bacterias. La temperatura óptima de crecimiento varía entre géneros y está en el ámbito de 20 a 45°C (Axelsson, 2004).

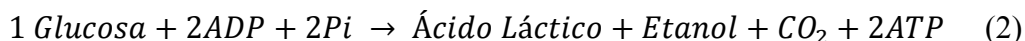
Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico pertenecen a los géneros de *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella* (Axelsson, 2004). Las más utilizadas industrialmente son las del género *Lactobacillus* por su alto grado de conversión, rendimiento y velocidad de metabolismo (Mercier *et al.*, 1992). Además, este es el género más ácido-tolerante de todas las BAL (Axelsson, 2004).

La mayoría de las BAL producen sólo un tipo de ácido láctico. La forma isomérica de la enzima lactato deshidrogenasa determina el isómero del ácido láctico producido, ya que esta enzima es estereoespecífica. Específicamente, *Lactobacillus casei* posee la enzima L-lactato deshidrogenasa por lo que el producto de su metabolismo será el ácido L-láctico (Axelsson, 2004).

Existen dos vías principales de fermentación de azúcares entre las BAL. La glicólisis (vía Embden-Meyerhof-Parnas) que da como resultado casi exclusivamente ácido láctico como producto final, en condiciones estándar; este metabolismo se conoce como fermentación homoláctica (Axelsson, 2004):



La vía de las pentosas fosfato da como resultado una cantidad significativa de otros productos como etanol, acetato y CO₂, en adición al ácido láctico; este metabolismo se conoce como fermentación heteroláctica (Axelsson, 2004):



El género *Lactobacillus* se clasifica en tres diferentes grupos: homofermentadores estrictos, heterofermentadores estrictos y heterofermentadores facultativos. El principio fisiológico utilizado generalmente para hacer la división es la presencia o ausencia de las enzimas clave del metabolismo homo- y heterofermentativo, fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfoquetolasas, respectivamente (Axelsson, 2004). La bacteria *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* pertenece al grupo de bacterias homofermentativas (Mayra-Makinen *et al.*, 1995), de manera que presenta una eficiencia teórica de un gramo ácido láctico por cada gramo de glucosa sin la producción de los sub-productos del metabolismo heterofermentativo (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000). Esto la convierte en una bacteria conveniente para un proceso de producción de ácido (L)-láctico.

3.2.6 Requerimientos nutricionales

Las bacterias lácticas requieren de nutrientes especiales o factores de crecimiento para su adecuado desarrollo, además de una fuente de energía (comúnmente carbohidratos). Algunos de estos nutrientes necesarios para su cultivo son aminoácidos, vitaminas, minerales específicos y nucleótidos (bases purina y pirimidina) (Fitzpatrick *et al.*, 2001; Axelsson, 2004).

La fuente de carbono es la materia prima necesaria para el crecimiento celular y la obtención de energía. En las fermentaciones con microorganismos productores de ácido láctico se pueden utilizar azúcares en una forma pura como glucosa, sacarosa o lactosa, o materiales complejos que contienen azúcares como melazas, suero, bagazo, sirope de maíz, almidón, etc. (John *et al.*, 2007).

El nitrógeno es un macronutriente indispensable para el buen crecimiento celular. El nitrógeno es incorporado a la célula en la forma de proteínas, péptidos y aminoácidos y representa entre un 10 y 14% del peso seco de la célula (Shuler & Kargi, 1992).

Se ha demostrado que la productividad de ácido láctico por *Lactobacillus sp.* es directamente proporcional a la suplementación con nitrógeno (Nancib *et al.*, 2005). El extracto de levadura es comúnmente adicionado al medio de fermentación como fuente de nitrógeno para estimular la producción de ácido láctico y el crecimiento celular (Salminen *et al.*, 2004; Thongwai, 1999). Nancib *et al.* (2005) probó diferentes fuentes de nitrógeno, tanto orgánicas como inorgánicas, para la producción de ácido láctico a partir de jugo de dátil y el extracto de levadura resultó ser el mejor suplemento para una producción eficiente de ácido láctico al obtenerse los rendimientos más altos.

La eficiencia del extracto de levadura como suplemento se debe además a su contenido de factores de crecimiento. El extracto de levadura contiene vitaminas del complejo B como ácido fólico, piridoxina, niacina, ácido pantoténico y riboflavina, las cuales son esenciales para el crecimiento de *Lactobacillus casei* (Nancib *et al.*, 2005). De acuerdo a Ho *et al.* (1997), la concentración de extracto de levadura en el medio tiene un gran impacto en el crecimiento y producción de biomasa de *L.casei*.

Sin embargo, este nutriente es uno de los más costosos; en el estudio económico hecho por Tejayadi y Cheryan (1995), el extracto de levadura fue el rubro más importante, representando cerca del 38% del costo total de producción del ácido láctico.

Otro requerimiento nutricional indispensable para el género *Lactobacillus* son nutrientes inorgánicos como los fosfatos, el potasio y el magnesio (Thongwai, 1999). Específicamente, el fósforo constituye alrededor de un 3% del peso seco de la célula bacteriana (Shuler & Kargi, 1992) y está presente en forma de azúcares de fosfatos, ácidos nucleicos y nucleótidos (Posten & Cooney, 1993). El fósforo también es un elemento clave en la regulación del metabolismo de la célula (Shuler & Kargi, 1992).

La fermentación ácido láctica es acelerada con la suplementación de una solución de fosfatos (Hirata *et al.*, 2005); incluso para algunos autores, como Wee *et al.* (2006), los fosfatos se consideran las sales más importantes en las fermentaciones ácido lácticas, de manera que la suplementación con este nutriente es una práctica generalizada al trabajar con este tipo de microorganismos. Las sales más comúnmente utilizadas para este propósito

son KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , que además sirven como fuente de potasio, un nutriente importante requerido en el metabolismo de los carbohidratos (Shuler & Kargi, 1992).

Particularmente cuando se utiliza una concentración baja de extracto de levadura en el medio, la suplementación con fosfatos, que son unos nutrientes relativamente baratos en comparación con el extracto de levadura, puede promover el crecimiento y producción de ácido láctico (Amrane, 2000).

En cuanto a las vitaminas esenciales, el género *Lactobacillus* requiere específicamente de pantotenato de calcio (B_5), niacina (PP) y riboflavina (B_2) (Mayra-Makinen & Bigret, 2004).

La suplementación con nutrientes incrementa el costo de producción, mientras que los nutrientes residuales elevan el costo de purificación, por ejemplo en la producción de ácido láctico para polimerizar (Fitzpatrick *et al.*, 2001). Específicamente para la producción de ácido láctico grado polímero, las fermentaciones con suero desmineralizado han sido mejores porque existen menos impurezas minerales que deben ser separadas (Fitzpatrick *et al.*, 2003). De manera que es necesario encontrar los niveles óptimos de nutrientes necesarios para hacer el proceso económicamente factible.

3.2.7 Sustratos de fermentación

La viabilidad de la producción de ácido láctico y sus derivados depende de muchos factores, de los cuales, el costo de la materia prima es muy importante (John *et al.*, 2007).

En la producción biotecnológica de ácido láctico es posible utilizar sustratos a base de azúcares puros como glucosa, lactosa o sacarosa (Akerberg & Zacchi, 2000). El uso de materias primas refinadas reduce significativamente el costo de purificación del producto deseado y permite obtener un mejor control de la fermentación (Shuler & Kargi, 1992); sin embargo, esto sigue siendo económicamente desfavorable porque los carbohidratos refinados son muy costosos y eventualmente representaría un alto costo para la producción del compuesto químico (Wee *et al.*, 2006).

Es por esto que la investigación se ha enfocado en buscar sustratos más baratos, que logren hacer el proceso más factible ya que para los productores de polímeros así como de otras aplicaciones, es necesario grandes cantidades de ácido láctico y a un costo relativamente bajo (Wee *et al.*, 2006).

Para que un sustrato sirva como materia prima para la producción de ácido láctico debe tener ciertas características como: ser barato, rico en nutrientes, bajo en componentes contaminantes, presentar alta velocidad de producción y rendimiento, poca o ninguna formación de productos secundarios, habilidad de ser fermentado con poco o ningún pre-tratamiento, disponibilidad a lo largo del año, entre otras (Wee *et al.*, 2006). Algunos sustratos complejos que han sido utilizados para la producción de ácido láctico son desechos agroindustriales, tales como bagazo, almidón de maíz y de yuca, hidrolizados de hemicelulosa, melazas de caña o remolacha, lactosuero, vinazas, celulosa etc.

3.2.8 Condiciones operativas de las fermentaciones

La efectividad del proceso biotecnológico de producción de ácido láctico puede ser medida como la concentración de ácido láctico producido, como el rendimiento basado en el sustrato consumido, y como la velocidad de producción (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000). El éxito de las fermentaciones lácticas depende de varios parámetros: desde la cepa utilizada, la fuente de carbono y nitrógeno, temperatura, pH, tamaño de inóculo, concentración de oxígeno, hasta el modo de fermentación utilizado, pre-tratamientos del sustrato y presencia de sustancias contaminantes (Rashid, 2008).

La escogencia de la cepa es uno de los puntos más importantes a considerar. El microorganismo utilizado debe tener buenos rendimientos y productividades, además de ser capaz de utilizar sustratos baratos. El género *Lactobacillus* es el más utilizado a nivel industrial (Rashid, 2008). *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus* es una bacteria homofermentativa aerotolerante (Coudeyras *et al.*, 2008). Además, esta cepa tiene un excelente efecto inhibitorio contra mohos y levaduras (Mayra-Makinen *et al.*, 1995).

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes en las fermentaciones. El rango de crecimiento de muchas bacterias lácticas va desde los 15 y

45°C, dependiendo si son mesófilas o termófilas. *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus* se clasifica como bacteria mesófila y presenta una temperatura óptima cerca de los 37±2°C (Thongwai, 1999).

El pH del medio también es importante a la hora de buscar buenos rendimientos y productividades. Generalmente el pH del medio se controla mediante la adición de una base a valores entre 5,0 y 7,0 (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000) porque está comprobado que mantener el pH constante durante la fermentación permite alcanzar concentraciones de ácido láctico mayores, así como mayores rendimientos y productividades, en comparación con la fermentación sin control del pH, ya que en esta última el pH desciende a valores por debajo del óptimo del microorganismo (Rashid, 2008). El pH óptimo para *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus* está entre 5,5 y 6,0 (Thongwai, 1999), sin embargo, las bacterias lácticas tienen una buena tolerancia a pH de 5 o menores (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000),

En cuanto a los nutrientes, estos son indispensables para que la célula funcione correctamente. En la mayoría de los casos la fuente de carbono está representada por un azúcar o algún tipo de carbohidrato; la glucosa es la más común. En procesos aerobios, el oxígeno es vital para la célula; este puede ser alimentado al proceso mediante una aireación continua. La fuente más común de nitrógeno es amonio como tal o en forma de sal. En algunos casos la velocidad de crecimiento del organismo aumenta si es suplementado con aminoácidos. La necesidad de hidrógeno puede ser suplida del agua y sustratos orgánicos. Otros componentes necesarios para el crecimiento incluyen fósforo, azufre, potasio, magnesio y elementos traza, que son adicionados al medio como sales inorgánicas (Rashid, 2008).

El modo de fermentación es determinante en la producción de ácido láctico. Las fermentaciones pueden ser operadas por lote (*batch*), lote alimentado (*fed-batch*) o continuo. En fermentaciones por lote todos los componentes, excepto por los sustratos gaseosos como el oxígeno, sustancias para control de pH y agentes antiespumantes, son colocados en el reactor al inicio de la fermentación. Durante el proceso no hay flujos de entrada ni salida, es un sistema cerrado. En fermentaciones de tipo *fed-batch* nada es

removido o sacado del biorreactor durante el proceso pero sí se adicionan nutrientes con el objetivo de controlar la velocidad de crecimiento a través de la concentración de sustrato. En fermentaciones en continuo el sistema es abierto, existen flujos de entrada y salida, pero el volumen de reacción se mantiene constante (Saarela *et al.*, 2003). En una fermentación continua, el ambiente externo a la bacteria se mantiene controlado e invariable de manera que se controla mejor la velocidad de crecimiento (Ding *et al.*, 2006). Esto permite, en la mayoría de los casos, obtener concentraciones más altas, comparado con el modo discontinuo (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000).

Cuando los microorganismos se reproducen existen ciertas fases de crecimiento que pueden ser observadas. Una curva de crecimiento típica se muestra en la Figura 6. La apariencia y duración de cada etapa depende del tipo de microorganismo, de las condiciones ambientales y del modo de fermentación (Saarela *et al.*, 2003).



Figura 6. Curva de crecimiento bacteriano

Las fermentaciones por lote son las que industrialmente se han utilizado más (Ding *et al.*, 2006) debido a que permiten tener un mejor control sobre todos los factores que afectan el proceso (Chan, 2001). Además, los rendimientos han sido mejores en la mayoría de los estudios, debido a que en el proceso por lote todo el sustrato es consumido, mientras que en fermentaciones continuas queda una concentración residual (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000). Sin embargo, la desventaja más importante de un proceso por lote en comparación

con uno continuo, es que la productividad es menor debido a la inhibición por sustrato y producto (Ding *et al.*, 2006).

Existe otra modalidad de fermentación llamado lote repetido. Este método consiste en la repetición sucesiva de varios procesos *batch*, mediante la sustitución del caldo fermentado por sustrato nuevo estéril y reutilización de las bacterias (Nakasaki *et al.*, 2008), de modo que se trata de un proceso semi-continuo (Rashid, 2008). El modo de lote repetido o *batch* repetido permite aumentar los rendimientos en comparación con el proceso *batch*, mientras que reduce el tiempo de fase lag del microorganismo (John *et al.*, 2007; Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000).

El pre-tratamiento llevado a cabo también es un factor importante en las fermentaciones. Muchos de los sustratos tienen un alto contenido de almidón o celulosa y deben ser hidrolizados para tener azúcares fermentables antes de la fermentación (Wee *et al.*, 2006). Por otro lado, la concentración de azúcares reductores o fermentables en el medio puede afectar la fermentación, ya que las células bacterianas reducen la producción de ácido láctico en concentraciones altas de azúcares (John *et al.*, 2007). Se ha encontrado que una concentración mayor de 100g/L de azúcares iniciales en el medio provoca una disminución en el número de células viables así como en la concentración de ácido láctico producido y un aumento en el porcentaje de azúcares residuales, para fermentaciones con *L. delbrueckii* (Kotzamanidis *et al.*, 2002). Para *L. casei*, los resultados han mostrado que el rendimiento es inversamente proporcional a la concentración de glucosa inicial en el medio, dentro del ámbito de 80-160g/L de glucosa (Hujanen *et al.*, 2001).

La sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés) es una solución para el problema de poca disponibilidad de azúcares fermentables en sustratos amilosos y para evitar la inhibición por sustrato del microorganismo. En este tipo de fermentación, las enzimas hidrolíticas son adicionadas junto con el inóculo. Las enzimas liberan azúcares más simples del sustrato y el microorganismos los va utilizando simultáneamente (John *et al.*, 2007). Está probado que la sacarificación y fermentación simultánea es el mejor tratamiento en condiciones de alta concentración de sustrato en volúmenes pequeños de reactores y bajos costos de fermentación (John *et al.*, 2007).

En un estudio hecho por Jin *et al.* (2005) con especies de *Rhizopus arrhizus* y *R. oryzae* se logró producir ácido láctico en un solo paso mediante la sacarificación y fermentación simultáneas usando desechos de papa, piña, maíz y trigo, como medios de cultivo. En este estudio, se obtuvo la mayor velocidad de producción de ácido láctico y formación de biomasa con el desecho piña, por la alta concentración de azúcares que tiene (Jin *et al.*, 2005). Específicamente en fermentaciones de banano con *L. casei*, la utilización de la sacarosa ha sido incompleta en comparación con el consumo de glucosa y fructosa (Chan-Blanco *et al.*, 2003). También, en el estudio hecho por Thongwai (1999), se demostró que la hidrólisis enzimática con invertasa, de un sustrato a base de melazas, mejoró el crecimiento celular y la producción de ácido láctico por parte de *L. casei* sub. *rhamnosus*.

IV. Materiales y métodos

4.1. Ubicación del proyecto

El estudio se llevó a cabo en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro de Montes de Oca. Específicamente, la extracción del jugo de piña a partir del desecho se llevó a cabo en la planta piloto del CITA; las fermentaciones se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y los análisis químicos en el Laboratorio de Química del CITA.

4.2. Microorganismo

El microorganismo utilizado en este estudio fue *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* ATCC 11443, bacteria láctica homofermentativa.

4.2.1. Procedimiento de activación

La bacteria liofilizada se activó a 37°C por 18h en 5mL de caldo *De Man Rogosa Sharpe* (MRS), medio selectivo para el crecimiento de *Lactobacillus*. Este medio se transfirió a viales con caldo Infusión Cerebro Corazón y glicerol al 15% para ser congelado y conservado a -40°C.

El cultivo madre se preparó al descongelar y enriquecer el microorganismo congelado en 100mL de caldo MRS e incubándose 24h a 37°C; este cultivo se almacenó a 4°C. El inóculo se preparó transfiriendo 1,00mL del cultivo madre a 100mL de caldo MRS e incubando durante 18h a 37°C. El sustrato a base de jugo de piña se inoculó con 0,5% (v/v) del cultivo de *L. casei* sub. *rhamnosus*.

4.3. Enzima

La enzima utilizada para la hidrólisis del medio de fermentación fue *Invertase* (E.C. 3.2.1.26), obtenida de *Novo Enzymes*, Irlanda.

4.3.1. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad de la enzima invertasa se basó en el método realizado por Siswoyo *et al.*, (2007) y se llevó a cabo de la siguiente manera: 0,5mL de una solución enzimática al 0,01%(m/v) se agregaron a 5mL de una disolución de sacarosa al 5,4% (en buffer de acetato 0,1 M, pH 4,5) y se incubaron a 35°C por 10 minutos, tomando muestras cada minuto. Al finalizar el periodo de incubación se inactivó la enzima colocándola en un baño a 85°C por 10 min.

La glucosa residual, producto de la hidrólisis de la sacarosa, se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito por Trinder (1959), el cual se basa en la cuantificación de glucosa mediante la reacción enzimática con glucosa oxidasa. Para esto se agregó 1mL del reactivo Trinder (Laboratorios Ticolab, San José) en la muestra, se incubó a 37°C por 5 minutos y el color desarrollado se midió mediante un espectrofotómetro marca Jasco V-630 a 500nm.

La actividad enzimática obtenida fue 36800 UE/g de enzima; en donde una unidad enzimática (UE) se definió como los miligramos de glucosa producidos por minuto, bajo las condiciones experimentales usadas.

4.3.2. Hidrólisis enzimática del medio de fermentación

En las fermentaciones con tratamiento enzimático, se tomaron 2,5mL de una solución de invertasa al 1%(m/v) y se agregaron a los 2L de sustrato a 35°C, simultáneamente con la inoculación del microorganismo, con el objetivo de que la enzima hidrolizara la sacarosa presente. Previo a su adición, la solución enzimática fue microfiltrada (0,45µm) para evitar la posible contaminación del medio estéril.

4.4. Materia prima

La materia prima utilizada para realizar las fermentaciones fue desecho de pulpa de piña, obtenido de la planta *Florida Products*, en Barreal de Heredia.

4.4.1. Obtención y tratamiento del desecho de piña

El desecho de pulpa de piña se recolectó en bolsas plásticas y se transportó en baldes de la planta procesadora a la planta piloto en el CITA, donde se procesó de la siguiente manera:

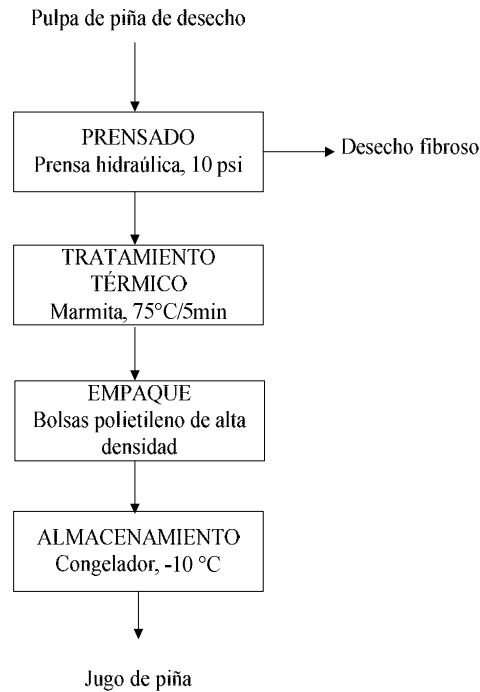


Figura 7. Flujo de proceso para la preparación del jugo de piña utilizado como sustrato para la fermentación láctica.

- Prensado: la pulpa de piña de desecho se prensó mediante una prensa hidráulica marca OTC, de la planta piloto de CITA, utilizando una manta de doble gaza como medio filtrante para separar el material fibroso y obtener el jugo de piña.
- Tratamiento térmico: el jugo de piña obtenido se estabilizó mediante un tratamiento térmico en una marmita Groen, con el objetivo de eliminar microorganismos e inactivar enzimas. Las condiciones del tratamiento utilizadas fueron 75°C por 5 min.
- Empaque: el jugo de piña pasteurizado se empacó en caliente en bolsas de polietileno de alta densidad de 2 L.
- Almacenamiento: las bolsas con el jugo de piña fueron almacenadas en un congelador a -10°C para su posterior utilización y análisis.

4.4.2. Formulación del sustrato de fermentación

Para preparar el medio de fermentación, se descongeló el jugo de piña por inmersión en agua caliente. Al medio de fermentación, además del jugo de piña, se le agregó los siguientes nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria: extracto de levadura (Oxoid, Inglaterra), sulfato de magnesio hepta-hidratado, sulfato de manganeso mono-hidratado, acetato de sodio, bifosfato de potasio y monofosfato de potasio (todos de J.T Baker, México). La concentración de jugo y de algunos de estos nutrientes se modificó según los diferentes tratamientos evaluados en el estudio, de manera que la composición exacta del medio de fermentación se especificará para cada objetivo de la investigación.

El sustrato se colocó en un recipiente autoclavable (*carboy*) acondicionado con mangueras, filtros y conectores y se esterilizó en una autoclave a 121°C, 20psi por 15min. Las sales de fosfatos se esterilizaron en un *erlenmeyer* por aparte y se adicionaron al sustrato ya estéril para evitar la precipitación de las mismas por reacciones con el resto de sales (Ho *et al.*, 1997; Velázquez *et al.*, 2001).

4.5. Fermentaciones lácticas

4.5.1. Equipo de fermentación y variables de control

Las fermentaciones se llevaron a cabo en bioreactores Bioflo 110, marca New Brunswick, de 2L de capacidad, con controladores de operación (unidad de monitoreo, control de pH, temperatura y agitación). El biorreactor se ensambló con sistemas de entrada de sustrato, entrada de base, salida de producto (caldo fermentado), toma de muestra, entre otros componentes importantes que se describen en la Figura 8.

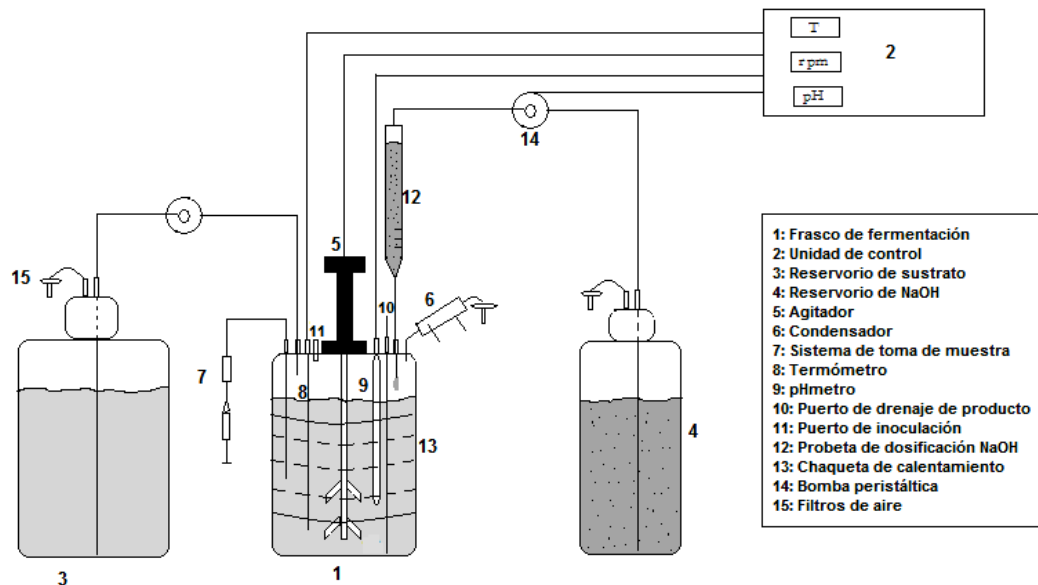


Figura 8. Diagrama del sistema de fermentación básico utilizado para producción de ácido láctico por lote repetido.

El pH del medio de fermentación se controló en 5,0 durante la fermentación mediante una disolución de hidróxido de sodio 5,0 N. La temperatura se reguló en 35°C, mediante una chaqueta calentadora conectada a la unidad de control del biorreactor y con agitación constante a 250rpm. El volumen de sustrato utilizado en todas las fermentaciones fue de 2,0L.

4.5.2. Modalidad lote-repetido

Las fermentaciones se llevaron a cabo mediante un proceso por lote repetido. Cuando la fermentación láctica alcanzaba la fase estacionaria se evacuaba el caldo fermentado por medio de una bomba peristáltica, manteniendo la esterilidad dentro del frasco de fermentación, y se volvía a llenar con 2L de sustrato nuevo estéril para comenzar con una nueva fermentación reutilizando las bacterias presentes. Este proceso permite aprovechar la adaptación de las bacterias ya presentes dentro del biorreactor al sustrato, de manera que la fase de adaptación o lag se reduce (John *et al.*, 2007).

Todos los tratamientos se realizaron por lote-repetido para obtener las cinéticas de las fermentaciones bajo las mismas condiciones experimentales y lograr un mejor aprovechamiento del tiempo de fermentación.

Al finalizar cada fermentación, el caldo fermentado se estabilizó mediante un tratamiento térmico de 75°C por 5 minutos para su posterior purificación.

4.5.3. Muestreo

Durante diferentes momentos de la fermentación se tomaron muestras con el fin de analizar la concentración de ácido láctico producido y la concentración de azúcares residuales (glucosa, sacarosa y fructosa) en el medio. Además, las muestras obtenidas se monitoreaban frecuentemente mediante tinciones *Gram* y evaluaciones al microscopio para asegurar que el sistema no presentara problemas de contaminación con otro tipo de microorganismo.

El tratamiento dado a cada muestra tomada durante la fermentación fue el siguiente: se tomó aproximadamente 10mL del medio de fermentación, se colocó en tubos *ependorf* y se centrifugó con una micro-centrífuga Minispin Plus, marca Eppendorf, a 6000rpm por 5min; el líquido supernatante se microfiltró (0,45 μ m) para separar el material celular. Por último, la muestra libre de bacterias se colocó en tubos de ensayo y estos se guardaron en congelación para llevar a cabo los análisis ya mencionados.

4.6. Efecto de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico

Para determinar si la hidrólisis enzimática simultánea con la fermentación del medio, mejoraba la eficiencia del proceso, se llevaron a cabo estudios de fermentación utilizando el sustrato a base de jugo de piña con y sin la adición de enzima invertasa.

4.6.1. Composición del medio de fermentación

La concentración de jugo de piña en el sustrato se definió según la concentración de azúcares que tenía. Según Ho *et al.*, 1997, la concentración óptima de glucosa en el medio

de fermentación para *Lactobacillus* está entre 80-100 g/L y Hujanen *et al.* (2001), alcanzó los rendimientos más altos con *L.casei* con 80g/L de glucosa inicial. De manera que se realizó una dilución al 80% de jugo de piña, lo que permitió obtener un medio con una concentración de azúcares totales iniciales cerca de 80 g/L.

Además del jugo de piña, se agregó también los diferentes nutrientes que se especifican en el Cuadro 3. La concentración de nutrientes utilizada fue definida como la más adecuada para el crecimiento de *L.casei* por Ho *et al.* (1997) y Velázquez *et al.* (2001).

Cuadro 3. Concentración de nutrientes adicionados al medio de fermentación a base de jugo de piña para evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática.

Nutriente	Concentración (g/L)
Extracto de Levadura	5,00
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,60
MnSO ₄ - H ₂ O	0,03
NaOAc	1,00
Fosfatos (KH ₂ PO ₄ y K ₂ HPO ₄)	0,50

4.6.2. Diseño experimental

Para la evaluación de la hidrólisis enzimática del sustrato de fermentación, se utilizó un diseño irrestricto aleatorio con dos niveles (sin/con hidrólisis enzimática). Cada tratamiento se hizo por triplicado según se especifica en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Diseño experimental utilizado para las pruebas de evaluación de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación

Tratamiento	Repeticiones	Variable
1	3	Sin hidrólisis enzimática
2	3	Hidrólisis enzimática con invertasa

4.6.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, mediante el paquete de JUMP 4, se realizó una prueba t para determinar la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tratamientos evaluados utilizando la productividad (total y máxima), el rendimiento, porcentaje de azúcares consumidos, concentración final de ácido láctico, tiempo de fermentación y tiempo de fase lag, como variables respuesta.

4.7. Efecto de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico

Para determinar el efecto de la concentración de azúcares iniciales totales en el proceso de fermentación, se llevaron a cabo estudios de las cinéticas de fermentación con diferentes niveles de azúcares totales iniciales, variando el grado de dilución del jugo de piña de 60-100% (v/v). No se utilizó un grado de dilución mayor porque se quiere alcanzar concentraciones altas de ácido láctico que compensen el proceso más difícil de purificación, producto de utilizar un desecho. La concentración de nutrientes adicionados al medio fue la misma especificada en el Cuadro 3.

Además, se llevó a cabo la hidrólisis con invertasa simultánea a la inoculación del medio, en todas las fermentaciones siguientes, tal como se describe en la sección 4.3.2.

4.7.1. Diseño experimental

El diseño experimental se presenta en el Cuadro 5. Se realizó un diseño irrestricto aleatorio con tres niveles de porcentaje de jugo de piña en el medio de fermentación. Cada tratamiento se hizo por triplicado.

Cuadro 5. Diseño experimental para las pruebas de evaluación de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación, a través del contenido de jugo de piña.

Tratamiento	Repeticiones	Porcentaje de jugo de piña en el medio (% v/v)
1	3	60
2	3	80
3	3	100

4.7.2. Análisis estadístico

Para saber si existía diferencia significativa entre los diferentes niveles evaluados, se realizó un análisis de varianza utilizando la productividad (máxima y total), el rendimiento, concentración final de ácido láctico, porcentaje de azúcares consumidos, tiempo de fermentación y tiempo de fase lag, como variables respuesta. En los casos donde se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó una prueba Tukey para comparar las medias.

4.8. Optimización de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfatos en el medio de fermentación

Para las pruebas de optimización de la concentración de extracto de levadura y fosfatos (en la forma de KH_2PO_4 y K_2HPO_4) en el medio de fermentación, se utilizó un medio a base de 80% (v/v) jugo de piña con hidrólisis enzimática simultánea a la inoculación. La concentración de nutrientes adicionados al medio de fermentación es la misma especificada en el Cuadro 3, a excepción de la concentración de las sales de fosfato y extracto de levadura que se modificó en cada tratamiento según el diseño experimental establecido.

Goksungur & Guvenc (1997) estudiaron el efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la fermentación de melazas con *Lactobacillus delbrueckii* y obtuvieron una concentración máxima de ácido láctico y rendimiento con un medio suplementado con 10g/L de extracto de levadura. De acuerdo al estudio de Amrane & Prigent (1998), con *Lactobacillus helveticus*, una concentración de extracto de levadura mayor a 20 g/L puede

ser tóxica para el microorganismo. Además, una suplementación mayor con extracto de levadura no es factible para un proceso industrial dado su alto costo. En relación con los fosfatos, estos se utilizan en concentraciones menores y según la composición del medio de cultivo MRS, una concentración de 2g/L de sales de fosfatos es óptima para el crecimiento de *Lactobacillus*.

Por otro lado, realizar un estudio sin ningún nivel de suplementación de extracto de levadura y sales de fosfato era interesante para conocer si el sustrato complejo que se está usando (jugo de piña) puede proveer los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de la bacteria. Por esta razón, se decidió anclar los extremos del diseño central compuesto en 0g/L de ambos nutrientes para obtener esta información.

Por lo tanto, se definió el ámbito entre 0 y 20g/L de extracto de levadura y entre 0 y 4g/L de sales de fosfato para construir el diseño central compuesto con el fin de buscar los valores óptimos de estos nutrientes.

Para esta parte del estudio, la formulación del sustrato fue diferente del procedimiento descrito en la sección 4.4.2 ya que los nutrientes no se adicionaron al sustrato de piña antes de la esterilización, sino que todos fueron esterilizados por aparte y adicionados individualmente al biorreactor. Las sales de sulfato y acetato se prepararon juntas y se inyectaron siempre en la misma concentración; mientras que la solución de sales de fosfatos se preparó individualmente e inyectó a través de un septo para ir variando su nivel de acuerdo al diseño experimental. Por otro lado, se preparó una solución de extracto de levadura al 50% que se dosificó al medio de cultivo mediante una bureta. Se preparó además, *carboys* con jugo de piña puro y agua estéril para formular el medio de cultivo. El diagrama del sistema de fermentación utilizado, se describe en la Figura 9:

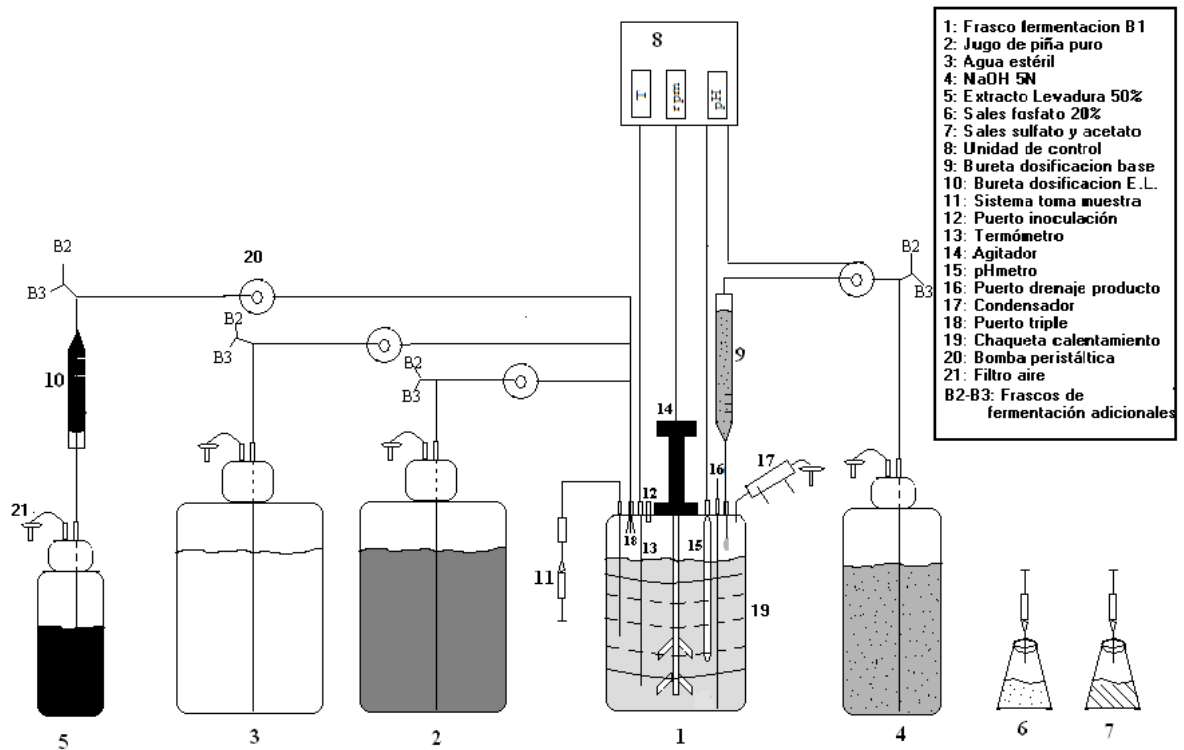


Figura 9. Diagrama del sistema de fermentación utilizado en las pruebas de optimización de nutrientes (extracto de levadura y sales de fosfato).

4.8.1. Diseño experimental

Para determinar la concentración óptima de extracto de levadura y sales de fosfatos que dieran la mejor producción de ácido láctico, se estableció un diseño central compuesto utilizando el programa JUMP 4. En este estudio se escogieron dos factores con cinco niveles y cinco repeticiones en el punto central; de manera que se llevaron a cabo 13 experimentos. El diseño experimental se especifica en el Cuadro 6 y los tratamientos se detallan en el Cuadro 7.

Cuadro 6. Diseño central compuesto para la optimización del nivel de extracto de levadura y sales de fosfatos en el medio de fermentación.

Factor	Niveles				
	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha^*$
Extracto de levadura (g/L)	0	3	10	17	20
Sales de fosfato (g/L)	0	0,65	2,00	3,35	4,00

*Donde $\alpha=1,4142$

Cuadro 7. Diseño experimental para optimizar el nivel de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio de fermentación.

Tratamiento	Repeticiones	Extracto de levadura (g/L)	Sales de fosfato (g/L)
1	1	0	2,00
2	1	3	0,65
3	1	3	3,35
4	1	10	0,00
5	5	10	2,00
6	1	10	4,00
7	1	17	0,65
8	1	17	3,35
9	1	20	2,00

4.8.2. Análisis estadístico

Mediante el programa estadístico JUMP 4 se utilizó la metodología de superficie de respuesta para obtener los modelos ajustados y encontrar los niveles óptimos de los dos nutrientes evaluados para obtener la máxima respuesta (productividad total y máxima, rendimiento, concentración de ácido láctico, tiempo de fermentación y tiempo de fase lag).

4.9. Métodos de Análisis

4.9.1. Análisis del jugo de piña

Con el fin de caracterizar el jugo de piña utilizado en las fermentaciones lácticas, especialmente por tratarse de un desecho agroindustrial, tres muestras de tres diferentes lotes se sometieron a los siguientes análisis físicos y químicos. Estos análisis estuvieron a cargo del Laboratorio de Química del CITA.

4.9.1.1. Humedad

El método utilizado, P-SA-MQ-002 (CITA, 2009a), consiste en la medición de la pérdida de masa de la muestra debida a la evaporación de agua. Este procedimiento se basa en el método numero 920.151 descrito por la AOAC (2005).

4.9.1.2. Acidez titulable

Este método consiste en la valoración de los ácidos presentes en un extracto acuoso de la muestra, según el método analítico P-SA-MQ-011 (CITA, 2009b) que se basa en el método de la AOAC 942.15 (AOAC, 2005).

4.9.1.3. pH

El pH de la muestra se determina utilizando un pH-metro, de acuerdo al método P-SA-MQ-012 (CITA, 2009c). Este procedimiento se basa en el método 981.12 de la AOAC (AOAC, 2005).

4.9.1.4. Sólidos solubles (°Brix)

Los sólidos solubles se determinan mediante el refractómetro de ABBE, de acuerdo al procedimiento descrito por Torres & Lois (s.f), que se basa en el método de la AOAC número 932.12 (AOAC, 1990).

4.9.1.5. Cenizas totales

El método P-SA-MQ-004 (CITA, 2009d) consiste en la medición de la masa del residuo inorgánico que queda después de incinerar la muestra, a una temperatura entre 500-600°C. Este método está basado en el método 940.26 de la AOAC (AOAC, 2005).

4.9.1.6. Proteínas

La determinación de la proteína se realizó mediante el método de Nitrógeno Total por Método Kjeldahl, P-SA-MQ-003 (CITA, 2009e). Este procedimiento se basa en el método descrito por la AOAC número 920.152 (AOAC, 2005).

4.9.1.7. Grasa

La determinación de grasa en la muestra se realizó de acuerdo al método Grasa Cruda por Extracto Etéreo, P-SA-MQ-005 (CITA, 2009f). Este procedimiento se basa en el método descrito por Carpenter *et al.* (1993).

4.9.1.8. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos totales se determina por diferencia, restando a 100 el contenido de humedad, proteína, grasa y cenizas, todos expresados en porcentaje.

4.9.1.9. Almidón por método enzimático

El contenido de almidón se determina mediante la hidrólisis de la muestra y posterior determinación de la concentración de glucosa por medio de una reacción con la enzima glucosa oxidasa, de acuerdo al procedimiento AQCITA-M018 (CITA, 2005), basado en Southgate (1976).

4.9.1.10. Azúcares

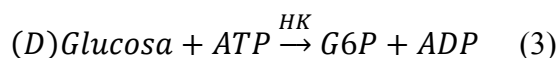
El método consiste en la extracción de los azúcares de la muestra y cuantificación mediante una columna de HPLC Aminex HPX-87C, según el método de análisis P-SA-MQ-006 (CITA 2009g), basado en Sullivan & Carpenter (1993).

4.9.2. Muestras de fermentación

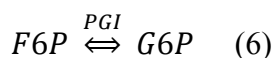
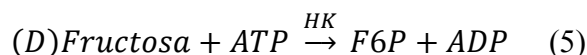
4.9.2.1. Azúcares

La concentración de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) se determinó en las muestras de fermentación mediante el kit enzimático K-SFRUGL de *Megazyme* (Megazyme, 2005), usando un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-1700. Este kit se basa en la determinación de glucosa mediante una reacción con la enzima hexokinasa (HK). Esta

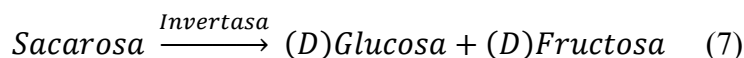
enzima cataliza la fosforilación de la D-glucosa por ATP para formar glucosa-6-fosfato (G-6P). En presencia de la enzima G-6P deshidrogenasa (G6P-DH), la molécula de G-6P es oxidada por $NADP^+$, con la subsiguiente formación de NADPH. La cantidad de NADPH formada es estequiométricamente proporcional a la cantidad de D-glucosa presente en la muestra. El incremento de absorbancia a 340nm es proporcional a la cantidad de NADPH.



El contenido de D-fructosa se mide subsecuentemente a la determinación del contenido de D-glucosa, después de una isomerización con una fosfoglucosa isomerasa (PGI).



Para determinar la cantidad de sacarosa en la muestra, se lleva a cabo una hidrólisis de la sacarosa con una β -fructofuranosidasa (invertasa), y se mide la D-glucosa antes y después de la hidrólisis.



4.9.2.2. Ácido láctico

La concentración de ácido láctico presente en las muestras de fermentación se analizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el primer y segundo objetivo, se utilizó una columna BioRad Aminex HPX-87H con un tamaño de partícula de 9 μm y un detector de arreglo de diodos. Las condiciones utilizadas fueron: H_2SO_4 0,005 mol/L como fase móvil, flujo isocrático de 0,9mL/min, temperatura 35°C, longitud de onda de 210nm, presión 90kgf/cm². Para el último objetivo del estudio, se utilizó una columna Phenomenex Rezex ROA con un tamaño de partícula de 8 μm , bajo las siguientes condiciones: H_2SO_4 0,005 mol/L como fase móvil, flujo isocrático de 0,6mL/min, temperatura 35°C, longitud de onda de 210nm, presión 32kgf/cm².

4.10. Eficiencia de la fermentación

Con los resultados obtenidos de la concentración de azúcares y ácido láctico, se construyeron las cinéticas de fermentación y se calculó la concentración de ácido láctico final, concentración de azúcares iniciales, el rendimiento y productividad (total y máxima), de cada tratamiento, como indicadores de eficiencia del proceso de fermentación.

4.10.1. Concentración de ácido láctico final

La concentración de ácido láctico final se obtuvo mediante el cálculo de los gramos de ácido láctico totales producidos al final de la fermentación, entre el volumen de trabajo (2L).

$$\text{Ácido láctico final (g/L)} = \frac{\text{Masa ácido láctico (bioreactor+muestras)}}{2\text{L de medio de cultivo}} \quad (8)$$

4.10.2. Contenido de azúcares iniciales disponibles

El contenido inicial de azúcares en el medio de fermentación se calculó sumando los gramos de glucosa, fructosa y sacarosa en la primera muestra de cada fermentación y restando los gramos de azúcares que se retiraron con las muestras. Los gramos de sacarosa se transformaron a gramos equivalentes de glucosa/fructosa para poderlos sumar.

$$\text{Azúcares iniciales (g)} = (\text{glucos} + \text{fructos} + \text{sacaros})_{m1} - \Sigma(\text{glucos} + \text{fructos} + \text{sacaros})_{m2 \rightarrow mi} \quad (9)$$

4.10.3. Porcentaje de consumo de azúcares

Para calcular el consumo de azúcares se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Consumo de azúcares (\%)} = \frac{\text{Azúcares iniciales (g)} - \text{Azúcares residuales bioreactor (g)}}{\text{Azúcares iniciales (g)}} \times 100 \quad (10)$$

4.10.4. Rendimiento

Para obtener el rendimiento de producción de ácido láctico en las fermentaciones, se cuantificó el ácido láctico producido al final de cada fermentación y los azúcares presentes inicialmente en el medio de fermentación (glucosa, fructosa y sacarosa), y se aplicó la ecuación (11).

$$\text{Rendimiento (\%m/m)} = \frac{\text{Masa ácido láctico final producido}}{\text{Masa azúcares iniciales disponibles}} \times 100 \quad (11)$$

4.10.5. Productividad

La productividad total se calculó dividiendo los gramos totales de ácido láctico producidos entre el tiempo de fermentación menos el tiempo de la fase lag aplicando la ecuación (12):

$$\text{Productividad total (g/h)} = \frac{\text{Masa ácido láctico final producido (g)}}{(\text{Tiempo de fermentación} - \text{tiempo lag})(\text{h})} \quad (12)$$

La productividad máxima se obtuvo tomando al menos cuatro puntos, en la fase logarítmica del microorganismo de la cinética de concentración de ácido láctico (g/L) contra el tiempo de fermentación (t), que dieran la pendiente máxima (13):

$$\text{Productividad máxima (g/L*h)} = \text{Pendiente máxima de la cinética} \quad (13)$$

V. Resultados y Discusión

5.1. Caracterización físico química del jugo de piña de desecho.

En el Cuadro 8 se presenta un resumen de la caracterización físico-química realizada al jugo de piña del desecho de pulpa de piña obtenido de la planta procesadora *Florida Products*.

Cuadro 8. Caracterización físico-química del jugo obtenido del desecho de pulpa de piña de la industria procesadora *Florida Products*, Heredia¹

Análisis	Jugo de piña
Humedad (%)	90,0 ± 0,7
Grasa (%)	No detectado
Proteína N x 6,25 (%)	0,4 ± 0,1
Cenizas (%)	0,23 ± 0,04
Carbohidratos totales (%)	9,0 ± 0,7
Valor energético kJ/100g	157 ± 12
Almidón (%)	No detectado
Sacarosa (%)	2,3 ± 0,7
Glucosa (%)	2,9 ± 0,1
Fructosa (%)	2,9 ± 0,1
Lactosa (%)	No detectado
°Brix	10,4 ± 0,1
Acidez (% ac.cítrico)	0,39 ± 0,09
pH	3,8 ± 0,2

¹ Los resultados se expresan como el promedio de los 3 lotes analizados por triplicado y su respectivo intervalo de confianza ($\alpha=0,05$).

Al tratarse de un desecho líquido de piña, el componente principal naturalmente es el agua representando un 90% del total. El segundo componente más importante son los carbohidratos, que representan un 9% del jugo de piña obtenido del desecho de pulpa. La proteína está presente pero en una cantidad muy baja y el contenido de grasa es despreciable.

Del total de carbohidratos podemos observar que la suma de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa componen un 90%, lo que es muy conveniente ya que estos azúcares son fuente de carbono para las bacterias lácticas. Es importante señalar que la glucosa y fructosa se

presentan en cantidades similares con un 2,9% y la sacarosa en un porcentaje menor de 2,3%. Comparado con el desecho líquido de piña de Sasaki *et al.* (1991), que presenta 2,4 y 1,4% de glucosa y fructosa respectivamente, este jugo de piña contiene una concentración más alta de estos azúcares simples. En cuanto al sustrato a base de banano que utilizó Chan-Blanco *et al.* (2003), este presenta un mayor contenido de azúcares fermentables (20%) pero por su alto contenido de sólidos y alta viscosidad es necesario su dilución para la utilización en la fermentación ácido láctica. De manera que el contenido final de azúcares totales en el medio diluido es menor (5%) que en el jugo de piña. Esto confirma el potencial de este desecho de piña como sustrato adecuado para producir ácido láctico.

El bajo contenido de otros carbohidratos, como polisacáridos, hace este desecho conveniente en el sentido que no es necesario tratamientos enzimáticos previos para obtener la glucosa libre, en comparación con otros desechos como los residuos de la pulpa de manzana que presenta un alto contenido de polisacáridos necesarios de hidrolizar (Gullón *et al.*, 2007). Otros desechos amilosos o celulósicos, como el bagazo de yuca, incluso requieren de procesos enzimáticos y tratamientos térmicos previos a la fermentación (John *et al.*, 2006), resultando en mayores costos (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000).

Por otro lado, el contenido de cenizas en este desecho (0,23%) es menor que el encontrado en otros desechos de la industria alimentaria. El suero lácteo por ejemplo, es un desecho del procesamiento de la leche que se utiliza para producir ácido láctico pero presenta un nivel de cenizas alto (0,8%*m/m*) lo que representa una fuente significativa de impurezas para producir plásticos biodegradables (Fitzpatrick *et al.*, 2003). Sin embargo, también hay que considerar que estos minerales presentes en la piña no necesariamente son indeseables ya que pueden ser fuente de nutrientes para las bacterias a la hora de un proceso de fermentación (Krueger *et al.*, 1992).

Además de su contenido de azúcares, este desecho de jugo de piña presenta la gran ventaja de que requiere de muy poca preparación antes de la fermentación, en comparación con otros desechos agroindustriales como las melazas, el bagazo o residuos de trigo (Wee *et al.*, 2006), debido a la presencia de pocos sólidos en suspensión, ausencia de semillas y baja viscosidad, lo que lo hace muy manejable.

5.2. Efecto de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico.

El efecto de la hidrólisis enzimática del sustrato simultánea a la fermentación fue estudiada utilizando jugo de piña de desecho (80%v/v) como medio base y *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*, en un proceso de fermentación por lote repetido. En la Figura 10 se muestran las curvas promedio (de tres repeticiones) de producción de ácido láctico y consumo de azúcares a través del tiempo, en fermentaciones sin hidrólisis enzimática (Figura 10a) y con tratamiento con invertasa (Figura 10b).

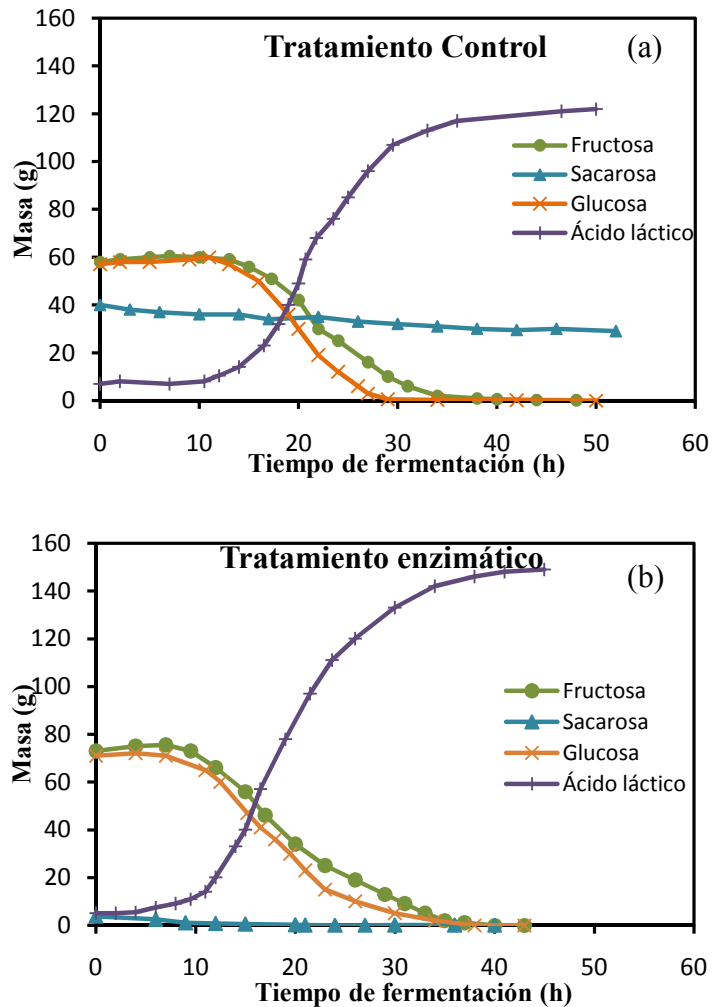


Figura 10. Cinéticas de fermentaciones promedio (n=3) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus* de un medio control a base de jugo de piña (a) y uno con tratamiento enzimático con invertasa (b).

Primeramente, se pueden observar las fases de crecimiento típicas de un proceso por lote. El ácido láctico es un metabolito primario, es decir, se deriva del metabolismo primario de la célula que es esencial para el crecimiento y está asociado a la obtención de energía. La velocidad de formación del producto es proporcional a la velocidad de crecimiento de la célula (Shuler & Kargi, 1992). Por lo tanto el ácido láctico se produce casi simultáneamente a la bacteria (Idris & Suzana, 2006) y por eso se logran distinguir las diferentes fases de crecimiento de la célula en la curva de producción de ácido láctico.

En la fase lag, la célula está adaptándose al sustrato nuevo, produciendo enzimas necesarias para las nuevas condiciones ambientales y reprimiendo otras (Shuler & Kargi, 1992), por lo tanto no se aprecia un consumo de azúcares ni producción de ácido significativo. Una vez adaptada, la célula empieza a consumir el sustrato para reproducirse de manera exponencial y por ende a producir el ácido láctico. En las curvas se puede observar como el inicio del consumo de azúcares (es este caso, glucosa y fructosa) en el medio control (a las 12h aproximadamente) y en el medio hidrolizado (a las 7h), es prácticamente simultáneo al aumento de ácido láctico en el medio.

En el caso de la sacarosa, el microorganismo prefiere consumir primero los azúcares simples y cuando estos se acaben, entra en un periodo de adaptación nuevo para cambiar las vías metabólicas para consumir azúcares más complejos como este disacárido. El consumo secuencial de diferentes fuentes de energía en un mismo ciclo de crecimiento se conoce como crecimiento *diáuxico*, y generalmente se observa cuando se fermenta una mezcla de azúcares (Shuler & Kargi, 1992), como en este caso.

La Figura 10a muestra las cinéticas promedio de las fermentaciones control con jugo de piña obtenido del desecho de pulpa, sin ningún tratamiento enzimático. Una concentración máxima de 64g/L (127g) de ácido láctico se logró alcanzar con 77g/L (153g) de azúcares iniciales disponibles en el medio (glucosa, fructosa y sacarosa), después de 35 horas de fermentación, con un periodo de fase lag de 11h aproximadamente.

Se puede observar como el consumo de sacarosa fue prácticamente nulo; la bacteria no entró en una segunda fase de adaptación para consumir este azúcar resultando en una concentración aproximada de 15g/L de sacarosa residuales en el medio de cultivo. El

microorganismo no logró consumir toda la sacarosa presente (sólo un 23%) probablemente porque no se dio el tiempo suficiente, aún 50h después de haber iniciado la fermentación. La sacarosa es el azúcar más difícil de consumir para la bacteria, ya que requiere sintetizar enzimas adicionales para su metabolización (Shuler & Kargi, 1992), por lo que es el último azúcar que utilizará de los tres principales presentes en este desecho. De hecho la disminución mínima en la concentración de sacarosa en el medio pudo deberse a la hidrólisis de sacarosa por la temperatura o por la acidez del medio, más que por la fermentación por parte de la bacteria. Este resultado fue el mismo obtenido por Nancib *et al.* (2005), en la fermentación de jugo de dátil donde *L.casei* sub. *rhamnosus* consumió la glucosa y fructosa paralelamente mientras que la sacarosa no fue metabolizada; y por Chan-Blanco *et al.* (2003), que obtuvo sólo un 27% de consumo de sacarosa en la fermentación de un medio enriquecido a base de puré de banano con *L. casei*.

Por otro lado, la Figura 10b muestra el comportamiento del microorganismo con el mismo medio a base de jugo de piña pero con hidrólisis enzimática de la sacarosa. Se puede observar como la concentración inicial de glucosa y fructosa es mayor por la inversión de la sacarosa. En este caso se logró alcanzar una concentración máxima de 75g/L (150g) de ácido láctico a partir de 77g/L (153g) de azúcares iniciales en un tiempo de fermentación de 40h con un periodo de fase de adaptación menor de 7h.

El tratamiento enzimático permitió el consumo completo de los azúcares presentes en el medio con una reducción de la fase lag; al eliminar la sacarosa la bacteria se adaptó más rápido al medio con únicamente azúcares simples. Dado que la concentración de azúcares fermentables es mayor por la hidrólisis de la sacarosa, el tiempo de fermentación aumentó aproximadamente 5h.

También es importante señalar que la bacteria logra producir las enzimas necesarias para consumir la glucosa y fructosa casi simultáneamente, lo que concuerda con los resultados observados por Chan-Blanco *et al.* (2003) y Bin & Moch (2007). La glucosa siempre es consumida primero porque *L.casei* sub. *rhamnosus* es un homofermentador que utiliza la vía de Embde-Meyerhof-Parnas, que parte de la glucosa para generar ácido láctico. Sin embargo, otros azúcares como la fructosa puede entrar a esta vía metabólica mediante una

fosforilación al nivel de fructosa-6-fosfato, mediante la enzima hexokinasa (Axelsson, 2004).

En la Figura 11 se puede observar más claramente el efecto de la hidrólisis enzimática sobre la producción de ácido láctico. La bacteria se adaptó más rápido al medio hidrolizado y logró producir un 15% más de ácido láctico, en comparación con la fermentación del medio control.

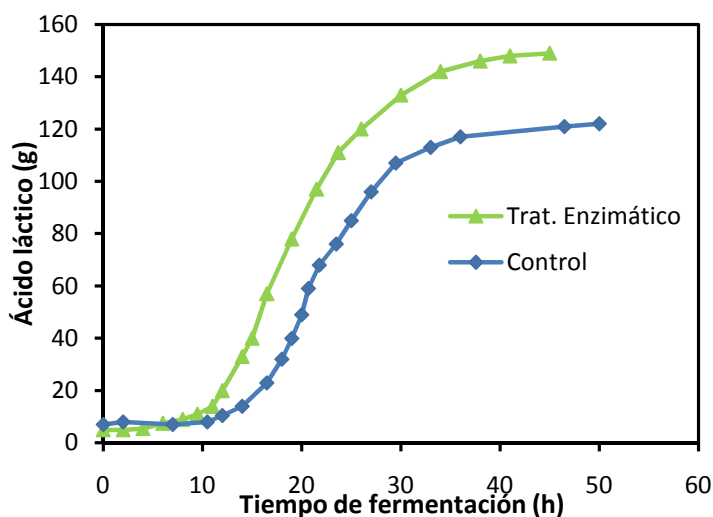


Figura 11. Comparación de la producción promedio de ácido láctico en fermentaciones con *Lactobacillus casei* sub. *ramnosus* de un medio control a base de jugo de piña y uno con tratamiento enzimático con invertasa.

En el Cuadro 9 se presentan los diferentes parámetros de eficiencia calculados a partir de las cinéticas de fermentación control y con tratamiento enzimático del jugo de piña, con *Lactobacillus casei* sub. *ramnosus*.

Cuadro 9. Resultados de las pruebas de estudio del efecto de la hidrólisis enzimática del medio de fermentación con Invertasa¹

Parámetro	Tratamiento		Probabilidad ²
	Control	Hidrólisis con Invertasa	
Rendimiento (% m/m)	84 ± 2	98 ± 1	0,0005*
Acido Láctico Producido (g/L)	64 ± 3	75 ± 3	0,0063*
Azúcares consumidos (% m/m)	79 ± 2	99,9 ± 0,5	0,0001*
Productividad total (g/h)	5,4 ± 0,4	4,3 ± 0,1	0,0070*
Productividad máxima (g/L*h)	5,5 ± 0,3	3,9 ± 0,1	0,0005*
Tiempo de fermentación (h)	34,7 ± 0,7	40 ± 2	0,0027*
Tiempo de fase lag (h)	11,2 ± 0,9	7,3 ± 0,7	0,0023*

¹Los resultados se expresan como promedio de tres repeticiones con su respectivo intervalo de confianza ($\alpha=0,05$).

²(*) Indica que existe diferencia significativa ($p<0,05$) entre los tratamientos.

La hidrólisis enzimática tuvo un efecto significativo sobre todos los parámetros calculados. Mientras que el rendimiento obtenido con el medio control fue de 84%, con un consumo de azúcares de un 79% y una concentración final de ácido láctico de 64g/L, la hidrólisis del medio con invertasa permitió alcanzar un rendimiento de 98% al consumirse todos los azúcares (99,9%) presentes en el medio y lograr una concentración de 75g/L de ácido láctico. Esto confirma la conveniencia del tratamiento enzimático para el proceso de fermentación y además, la eficiencia del microorganismo utilizado al convertir todos los azúcares consumidos exclusivamente en ácido láctico (0,98g acido/g azúcar). Estos resultados concuerdan con Thongwai (1999), que en la fermentación de un medio a base de melazas con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*, logró aumentar el rendimiento de producción de ácido láctico de 60 a 91% mediante la inversión del medio con invertasa.

En cuanto a las productividades, el tratamiento con invertasa afectó negativamente estos parámetros. La productividad máxima fue mayor para el medio control (5,5g/L*h) que para el medio hidrolizado (3,9 g/L*h). Generalmente una concentración mayor de azúcares simples en el medio puede afectar el microorganismo, según el fenómeno conocido como

inhibición por sustrato (Goncalves *et al.*, 1991), lo que provoca una reducción en la velocidad máxima de producción de ácido. De acuerdo a Siebold *et al.* (1995), *L.casei* sub. *rhamnosus* experimenta inhibición por sustrato a partir de 26g/L de glucosa en el medio.

La productividad total de la bacteria también disminuyó significativamente por el efecto del aumento del tiempo de fermentación derivado de una mayor concentración inicial de azúcares fermentables. A pesar de este resultado, una concentración mayor de ácido láctico en el medio es preferible, sobre todo en procesos industriales, ya que el producto requiere un proceso de concentración menor, abaratando el costo de purificación posterior (Hujanen *et al.*, 2001).

El tiempo total de fermentación (tiempo en el que la producción de ácido láctico se detiene) fue significativamente mayor para el medio con tratamiento con invertasa (40h) mientras que la fase lag fue significativamente menor (7h), en comparación con el medio control (35 y 11h, respectivamente). Esto refleja que *L.casei* se adapta más rápido a un medio más simple con sólo glucosa y fructosa como sustrato, pero la fermentación de dicho medio se prolonga más porque el porcentaje de consumo de azúcares es mayor. También hay que considerar que el tiempo real de fermentación del medio control es mucho mayor de 50h; sin embargo, este dato no se conoce porque no se dio el tiempo suficiente para que la bacteria consumiera la sacarosa presente. Por lo que, considerando este aspecto, el tiempo de fermentación con el tratamiento enzimático de 40h sería menor que el tiempo del medio control.

Por lo tanto, para que *L.casei* sub. *rhamnosus* logre utilizar eficientemente el sustrato a base de jugo de piña, en un tiempo prudente, es preferible la hidrólisis enzimática de la sacarosa al comenzar el proceso de fermentación. Por supuesto sería importante también considerar el costo que conlleva hacer este tratamiento enzimático en el costo total del proceso. Sin embargo, aumentar la concentración final de ácido láctico obtenida, así como reducir el nivel nutrientes residuales en el medio es muy ventajoso, sobre todo, para un proceso de purificación posterior en el cual estos nutrientes se convierten en impurezas que deben ser separadas (Narayanan *et al.*, 2004). Por lo tanto, el uso de enzimas permite aumentar los rendimientos y por ende reducir los costos a la hora de obtener el ácido láctico puro.

5.3. Efecto de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación sobre la producción de ácido láctico.

Uno de los parámetros más importantes que afecta las fermentaciones es la concentración inicial de sustrato (Bin & Moch, 2007). En este estudio se utilizó un desecho de pulpa de piña como sustrato alternativo para la producción de ácido láctico. Se llevaron a cabo pruebas con diferentes concentraciones de sustrato inicial en el medio. A continuación se presentan las cinéticas de fermentación promedio (tres repeticiones) de un medio compuesto por 60% (Figura 12a), 80% (Figura 12b) y 100% (v/v) (Figura 12c) de jugo de piña. El contenido de azúcares totales iniciales en el medio fue: $60 \pm 3 \text{ g/L}$ para el medio con 60% (v/v) de jugo de piña; $79 \pm 5 \text{ g/L}$ para el medio compuesto por 80% de jugo de piña y de $99 \pm 2 \text{ g/L}$ con 100% jugo de piña.

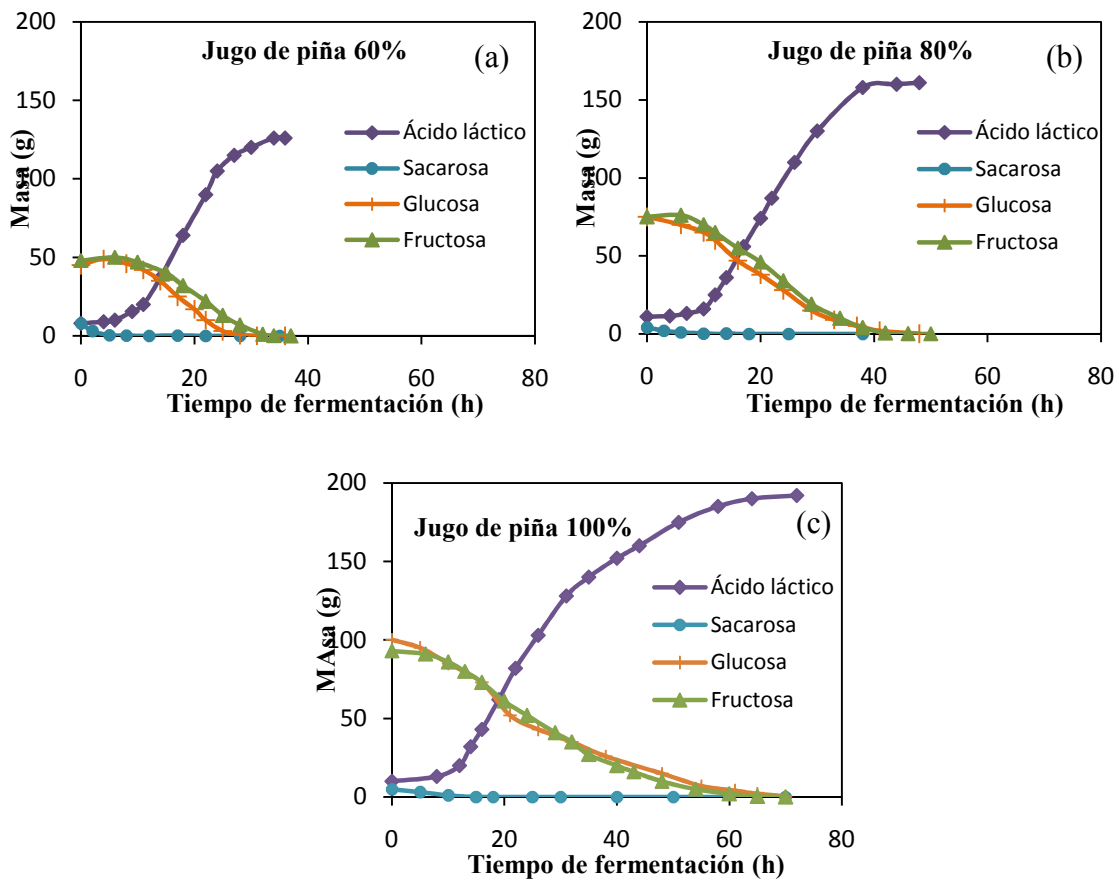


Figura 12. Promedio (n=3) de las cinéticas de fermentación de un medio a base de jugo de piña tratado con invertasa, al 60 (a), 80 (b) y 100% (c) (v/v).

Dado que en la etapa anterior del estudio se decidió que la hidrólisis enzimática del medio era la mejor opción, en estas pruebas se llevó a cabo la hidrólisis de la sacarosa también. A simple vista podemos afirmar que la bacteria no sufrió una inhibición importante y logró consumir todos los azúcares presentes en el medio, fuera este de 60, 80 ó 100% de jugo de piña.

En la siguiente figura (Figura 13) se puede apreciar mejor las cinéticas de producción de ácido láctico con los diferentes medios. La masa de ácido láctico final en el biorreactor fue proporcional al contenido de jugo de piña en el ámbito de trabajo, de manera que el microorganismo siempre fue capaz de soportar la concentración inicial de azúcares. Se puede observar también, como la velocidad de producción de ácido láctico es igual para los tres medios en las primeras horas de fermentación; sin embargo, después de las 35 horas aproximadamente la velocidad de producción de ácido láctico en el medio al 100% disminuye (la pendiente decae) en comparación con la velocidad del medio con 80% de jugo de piña. Esto puede ser resultado del inicio de la fase de desaceleración de crecimiento de la bacteria por la acumulación de productos tóxicos o limitación de nutrientes (Shuler & Kargi, 1992), lo que provoca una reducción en la velocidad de formación de ácido láctico.

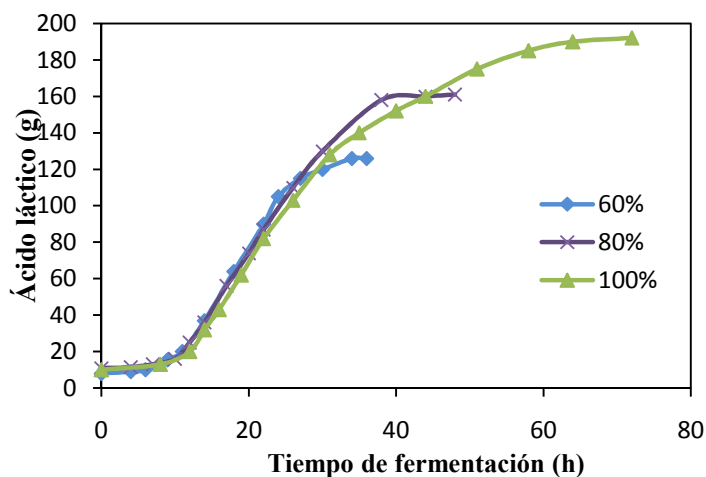


Figura 13. Comparación de la producción promedio de ácido láctico en fermentaciones con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus* de un medio a base de jugo de piña al 60,80 y 100% (v/v).

En el Cuadro 10 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de fermentación de los diferentes medios a base de jugo de piña, con *L.casei* sub *rhamnosus*.

Cuadro 10. Resultados de las pruebas de estudio de la concentración de azúcares iniciales en el medio de fermentación^{1,2}.

Parámetro	Jugo de piña (% v/v)		
	60	80	100
Rendimiento (%m/m)	103 ± 4 ^a	108 ± 7 ^a	110 ± 6 ^a
Productividad total (g ácido láctico/h)	5,3 ± 0,2 ^a	4,74 ± 0,06 ^a	3,7 ± 0,2 ^b
Productividad máxima (g ácido láctico /L*h)	3,5 ± 0,2 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,4 ^a
Acido Láctico Producido (g/L)	63 ± 4 ^a	82 ± 7 ^b	103 ± 2 ^c
Azúcares consumidos (%m/m)	100,0 ± 0,1 ^a	99,8 ± 0,2 ^a	99,8 ± 0,2 ^a
Tiempo de fermentación (h)	31 ± 3 ^a	42 ± 4 ^b	63 ± 3 ^c
Tiempo de fase lag (h)	6,2 ± 0,3 ^a	7,3 ± 0,6 ^{a,b}	8 ± 1 ^b

¹Los resultados se expresan como promedio de tres repeticiones con sus respectivos intervalos de confianza ($\alpha=0,05$).

²Letras diferentes horizontalmente indican que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

El rendimiento de producción de ácido láctico fue de un 100% para todos los tratamientos (60, 80 y 100% de jugo de piña). Sin embargo, es importante aquí señalar que el rendimiento se calculó como la relación entre los gramos de ácido láctico producidos y los gramos de azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, en los dos litros de medio. No obstante, en el medio existen otros componentes que pueden ser usados por la bacteria como sustrato para producir ácido láctico (Mayra-Makinen & Bigret, 2004).

Según Krueger *et al.* (1992), el jugo de piña puede contener entre 4,4–11,5g/L de ácido cítrico y 0,7-4,0g/L de ácido málico. Está demostrado en diferentes estudios que estos dos ácidos orgánicos pueden actuar como precursores de piruvato y ser metabolizados por las bacterias lácticas para la obtención de energía (Branen & Keenan, 1971; Axelsson, 2004). Además, el jugo de piña contiene otros azúcares en menores concentraciones, como la galactosa (Krueger *et al.*, 1992), que son fuente de carbono. Por lo tanto, la bacteria pudo

utilizar estos nutrientes como fuente de energía y crecimiento celular, resultando en estos rendimientos de ácido láctico un poco mayores al 100%.

La productividad total en las pruebas usando jugo de piña al 60% fue de 5,3g/h y al 80% de 4,7g/h de ácido láctico, siendo no significativamente diferentes entre ellos. Mientras que en las pruebas con 100% de jugo de piña como medio de fermentación se obtuvo una productividad total significativamente menor de 3,7g/h de ácido láctico. La disminución de la productividad total puede responder al aumento del nivel de azúcares iniciales en el medio: al existir más azúcares en el medio, la bacteria requiere mayor tiempo para metabolizarlos y el tiempo de fermentación total aumenta, provocando el efecto observado. Nuevamente, la disminución de la productividad se podría compensar con el aumento en la concentración de ácido láctico obtenido, ya que para un proceso industrial es muy importante tener altas concentraciones de producto para que el proceso de purificación así como el producto final resulten más baratos. Sin embargo también hay que considerar la posibilidad de que utilizar 100% de jugo de piña puede elevar el costo de purificación por el aumento en la concentración de sustancias contaminantes que pudiera tener. Es necesario realizar los estudios correspondientes de purificación para analizar con mayor precisión los costos que conlleva utilizar jugo de piña al 100%.

En cuanto a la productividad máxima no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos (3,5g/L*h en promedio). En la figura anterior (Figura 13) se puede apreciar que la velocidad de producción de ácido láctico (pendiente) es muy similar entre los diferentes medios de fermentación, la diferencia está en la concentración final alcanzada. De manera que dentro del rango de 60 a 100g/L de azúcares iniciales en el medio a base de piña, la velocidad máxima de producción de ácido láctico no se ve afectada. Ho *et al.* (1997) reportó una concentración óptima de glucosa inicial en un medio sintético para *L.casei* sub. *ramnosus* de 80g/L, al obtenerse una productividad máxima de 2,8g/L*h de ácido láctico. En el presente estudio se logró obtener una mejor productividad máxima utilizando una concentración de azúcares iniciales (glucosa y fructosa) incluso menor (60g/L). La composición del medio de cultivo (sintético en el primer caso y complejo a base de piña en el segundo) puede ser la razón de los resultados observados ya que *L.casei* experimenta un mayor efecto inhibitorio por sustrato en medios sintéticos en

comparación con medios complejos (Ho *et al.*, 1997), como la piña, donde pueden existir otros componentes que ayudan a que el microorganismo tolere el aumento en la concentración de azúcares de 60 a 100g/L y no reduzca su productividad máxima.

La concentración de ácido láctico final aumentó, al aumentar el nivel de jugo de piña en el medio de 60 a 100% (v/v). Con el medio de 100% de jugo de piña se logró alcanzar en promedio 103g/L de ácido láctico; en las pruebas con 80% de jugo, la concentración final fue de 82g/L de ácido; mientras que en la fermentación del medio con 60% de jugo de piña, una concentración máxima de 63g/L de ácido láctico fue alcanzada. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Hujanen *et al.* (2001), que probó diferentes concentraciones de glucosa inicial en la fermentación con *Lactobacillus casei* y encontró que la concentración de ácido láctico final incrementa con el aumento del nivel de sustrato, hasta los 160g/L de glucosa. Kotzamanidis *et al.* (2002), obtuvo una concentración máxima de 90g/L de ácido láctico con una concentración inicial de azúcar de 100g/L fermentando melazas de remolacha con *Lactobacillus delbrueckii*. Por lo tanto, se puede afirmar que el medio a base de jugo de piña es adecuado para el buen desempeño de *L.casei*, al lograr obtener aproximadamente un gramo de ácido láctico por cada gramo de azúcar presente, en el ámbito de estudio.

En cuanto al tiempo de fermentación la bacteria terminó de fermentar el medio con 60% de jugo de piña a las 31h; el de 80% a las 42h, mientras que el medio de 100% de jugo de piña terminó a las 63h de fermentación. Sin embargo, este aumento en el tiempo de fermentación no fue proporcional, el aumento entre el medio al 80% y 100% jugo de piña (21h) es casi dos veces el aumento entre el tiempo del medio a 60% y 80% de jugo de piña (11h). Este aumento no proporcional en el tiempo puede deberse al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo antes de terminar la fase de producción de ácido para el medio con mayor contenido de azúcares iniciales (100g/L). El crecimiento neto de la bacteria se vuelve nulo porque los nutrientes se hacen limitantes o se acumulan productos tóxicos (Shuler & Kargi, 1992) y a pesar de que la concentración de ácido láctico sigue aumentando, lo hace de manera muy lenta, prolongándose el tiempo de fermentación de manera significativa. La producción de ácido láctico durante la fase estacionaria de crecimiento, o el patrón de fermentación tipo 2, fue observado por Ho *et al.* (1997) en un

medio sintético con 80g/L de glucosa y *L.casei*. Sería importante hacer un análisis del costo-beneficio que involucra mantener la fermentación en la etapa de producción lenta de ácido láctico, para conocer si el aumento del tiempo compensa el aumento de la concentración de ácido láctico producido.

Por otro lado, el tiempo de fase lag fue significativamente diferente entre los medios compuestos por 60 y 100% de jugo de piña, con tiempo de fase de adaptación de 6,2 y 8h, respectivamente. De manera el microorganismo podría estar siendo inhibido por el contenido de azúcares en el medio al prolongarse su tiempo de adaptación. Sin embargo, después de esta etapa la bacteria no sufre inhibición puesto que la productividad máxima no se afectó al aumentar el nivel de jugo de 60 a 100%. Por otro lado, el medio con 80% de jugo de piña presentó un tiempo de fase lag (7,3h) similar a los medios de 60 y 100%. Estos tiempos de fase de adaptación concuerdan con los encontrados por Chan (2001) con un medio a base de pulpa de banano y Velázquez (1998), con un medio sintético con glucosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que el microorganismo no se ve inhibido de manera importante al aumentar la concentración de azúcares iniciales de 60 a 100g/L: se logró obtener rendimientos de 100% con un consumo total de los azúcares presentes y una concentración máxima de 103g/L de ácido láctico con un medio compuesto por 100% jugo de piña de desecho. Sin embargo, la productividad total se vio afectada al utilizar el medio con 100% de jugo de piña, resultando ser significativamente menor que la productividad en las fermentaciones con 60 y 80% de jugo piña. Esto porque el tiempo de fermentación se prolonga considerablemente con el medio a base de 100% jugo de piña. Además el tiempo de fase lag se prolonga significativamente al pasar de 60% ú 80% a 100% de jugo de piña. Por lo tanto, el medio con 80% de jugo de piña presenta una mejor eficiencia general, ya que ni la productividad total, ni el tiempo de fase lag se ven afectados al pasar de 60 a 80%; el aumento en el tiempo de fermentación no es tan grande como el aumento al cambiar de 80 a 100% de jugo de piña y el rendimiento de ácido láctico es del 100%. Aún así, el jugo de piña al 100% es adecuado para el crecimiento de *Lactobacillus* y permite alcanzar una concentración alta de ácido láctico, lo cual es muy importante para lograr un proceso económico de obtención de este aditivo.

5.4. Optimización de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio de fermentación

El efecto del extracto de levadura y sales de fosfatos (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) en la fermentación de un medio a base de jugo de piña (80%v/v) para producir ácido láctico fue estudiado mediante la metodología de superficie de respuesta. Un diseño central compuesto fue utilizado para encontrar la producción máxima de ácido láctico, rendimiento y productividades, así como el tiempo mínimo de fermentación y de fase lag, a valores óptimos de las variables estudiadas.

La productividad total del proceso se refiere a la velocidad promedio de producción del ácido láctico, y por lo tanto, se quiere que este valor sea lo más alto posible. Para esta variable respuesta, se logró obtener un modelo de primer orden con interacciones significativo ($p=0,022$), es decir, la concentración de extracto de levadura y de sales de fosfato tienen un efecto sobre la productividad total del proceso de fermentación.

A continuación se presenta la ecuación de la superficie de respuesta obtenida según los coeficientes estimados para el modelo ajustado de la variable productividad total de ácido láctico (y).

$$\bar{y} = 0,2210 * E.L + 0,5263 * \text{PO}_4 - 0,0214 * E.L. \text{PO}_4 + 1,7201 \quad (14)$$

Donde E.L. es la concentración de extracto de levadura y PO_4 la concentración de sales de fosfato (KH_2PO_4 y K_2HPO_4), en el medio de cultivo.

Utilizando esta ecuación para predecir el valor de productividad total, se obtuvo una productividad total máxima de 6,53g/h de ácido láctico con una concentración de extracto de levadura de 20g/L y 4g/L de sales de fosfatos. Sin embargo, reduciendo en un 50% la suplementación de estos dos nutrientes, la productividad alcanzada disminuye en sólo un 30% mostrando un valor de aproximadamente 4,5g/h de ácido láctico. Sería importante realizar pruebas bajo las condiciones óptimas encontradas para confirmar y comparar el valor predicho por el modelo y el valor real obtenido.

En la siguiente figura (Figura 14) se presenta la superficie de respuesta estimada para el comportamiento de la productividad total, así como la gráfica de contornos.

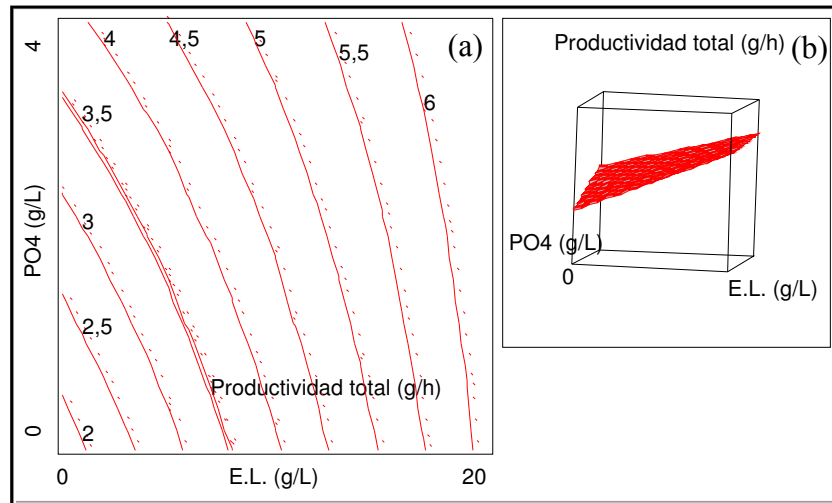


Figura 14. Gráfica de contorno (a) y superficie de respuesta (b) de la productividad total en relación a la concentración de extracto de levadura (E.L.) y sales de fosfatos (PO₄)

$$(R^2=0,6397)$$

En la gráfica de contornos se puede observar que los valores de respuesta van aumentando a medida que la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato aumentan.

Amrane (2000) estudio el efecto de los fosfatos sobre la productividad total del proceso de fermentación a diferentes concentraciones de extracto de levadura. En este estudio se encontró que para una concentración de extracto de levadura baja, la adición de los fosfatos permitió aumentar en un 40% la productividad total de ácido láctico. Mientras que para una concentración mayor de extracto de levadura, la suplementación con fosfatos no generó un efecto importante. Este resultado concuerda con el comportamiento observado en la gráfica de contornos, para una concentración baja de extracto de levadura, la adición de fosfatos permite aumentar la productividad total de manera importante. Mientras que, para una concentración alta de extracto de levadura, el aumento en la concentración de sales de fosfatos no mejora considerablemente la productividad ya alcanzada. Esto ocurre porque el extracto de levadura es un medio complejo y contiene cerca de un 0,8% de fósforo inorgánico (Amrane, 2000), de manera que una suplementación alta con extracto de levadura podría ya satisfacer los requerimientos de fósforo de la bacteria.

En cuanto a la variable respuesta de productividad máxima de ácido láctico, el análisis de varianza del modelo de primer orden sin interacciones fue significativo ($p=0,0219$), por lo que estos dos nutrientes sí presentaron un efecto sobre la velocidad máxima de producción de ácido láctico. La ecuación estimada que explica el comportamiento de la productividad máxima (y) en relación a la concentración en el medio de extracto de levadura y sales de fosfato es la siguiente:

$$\bar{y} = 0,0898 * E.L + 0,1412 * PO_4 + 1,7327 \quad (15)$$

Donde E.L. es la concentración de extracto de levadura y PO_4 la concentración de sales de fosfato (KH_2PO_4 y K_2HPO_4), en el medio de cultivo.

Utilizando la ecuación, se logra obtener una productividad máxima de $4,1g/L \cdot h$ de ácido láctico, con $20g/L$ de extracto de levadura y $4g/L$ de sales de fosfatos.

En la Figura 15 se muestra la representación gráfica de la superficie de respuesta para visualizar de una mejor forma el efecto de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato sobre la productividad máxima de ácido láctico.

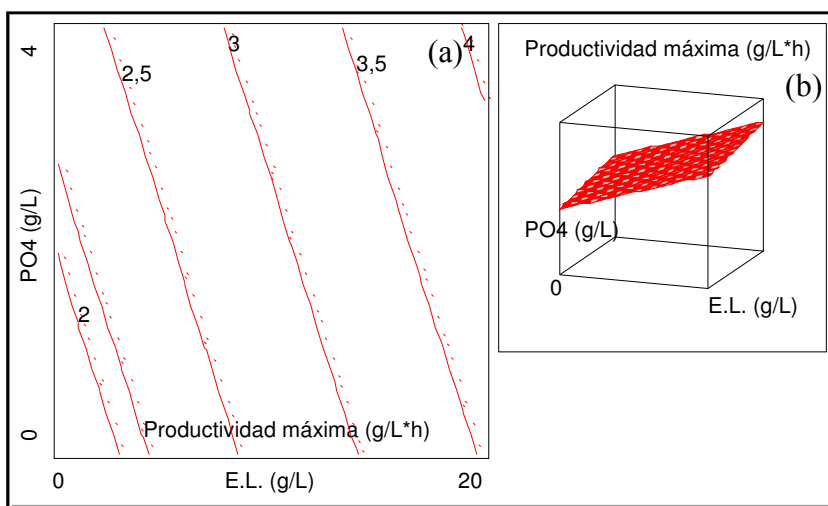


Figura 15. Grafica de contorno (a) y superficie de respuesta (b) de la productividad máxima en relación a la concentración de extracto de levadura (E.L.) y fosfatos (PO_4) ($R^2=0,5343$).

Mediante la grafica de contornos se puede obtener diferentes combinaciones de concentraciones de los nutrientes estudiados que permitan alcanzar una misma una

productividad máxima. Esto es muy útil para escoger el nivel de suplementación adecuado para el buen desempeño del microorganismo y a la vez, que permita reducir los costos de producción. Por ejemplo, para lograr una productividad máxima de 3,5g/L*h (sólo un 15% más baja que la productividad máxima posible) se pueden utilizar 20g/L de extracto de levadura con 0g/L de sales de fosfatos. Pero las sales de fosfatos son unos nutrientes baratos que pueden ser utilizados para contrarrestar una concentración menor de extracto de levadura. De manera que, es posible mantener una velocidad igual de 3,5g/L*h con una suplementación de solamente 13g/L de extracto de levadura (un 35% menos) y 4g/L de sales de fosfato. Hay que tomar en cuenta que los modelos obtenidos en el estudio son aplicables únicamente bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Es importante señalar que la productividad máxima fue influenciada mayormente por la concentración de extracto de levadura que por la concentración de sales de fosfato en el medio de fermentación. Esto se debe a que el nitrógeno es uno de los macronutrientes más importantes para el crecimiento de *Lactobacillus* y la concentración de minerales necesaria para lograr un buen desempeño del microorganismo es poca (Wee *et al.*, 2006).

De acuerdo a la literatura y a los resultados de composición química del jugo de piña, se consideró que este sustrato podría aportar minerales y nutrientes propios necesarios para el crecimiento de la bacteria y producción de ácido láctico, y de esta forma evitar la suplementación. Sin embargo, si el medio de cultivo a base de jugo de piña no es suplementado con extracto de levadura y sales de fosfato las productividades obtenidas, según los modelos, son muy bajas. Por lo tanto, se puede concluir que el jugo de piña como tal, no aporta la cantidad de nitrógeno y de fósforo necesaria para el buen crecimiento de la bacteria.

Los análisis de varianza de los modelos de segundo orden estimados para las variables respuesta rendimiento, concentración final de ácido láctico y tiempo total de fermentación, no fueron significativos ($p < 0,05$). Esto significa que el modelo de superficie de segundo orden no se ajusta a los resultados obtenidos en el ámbito de trabajo; sin embargo esto no quiere decir que estas variables respuesta no se ven afectadas por la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio. Naveena *et al.* (2005), probó diferentes

concentraciones de extracto de levadura (5-20g/L) y de sales de fosfato en la forma de NaHPO_4 (5,5-19g/L) mediante la metodología de superficie de respuesta y obtuvo un modelo de segundo orden significativo para la producción de ácido láctico por *L. amylophilus* GV6. En este estudio se logró obtener un rendimiento de 90% bajo las condiciones óptimas encontradas. Algunas posibles razones del resultado obtenido en este estudio incluyen el microorganismo utilizado, la composición química del sustrato, el sistema de fermentación, y las condiciones utilizadas.

El tiempo de fase lag es un parámetro importante de las fermentaciones y está asociado a la facilidad o dificultad del microorganismo de adaptarse al medio a su alrededor. La falta de nutrientes o de factores de crecimiento puede prolongar el tiempo de adaptación de la bacteria (Shuler & Kargi, 1992). A nivel industrial reducir esta etapa significaría mejorar la productividad del proceso en general. Por esta razón se analizó también el tiempo de fase lag como variable respuesta en busca de un mínimo.

De acuerdo al análisis de varianza del modelo de segundo orden para el tiempo de fase lag, éste es significativo ($p=0,0039$), es decir los datos observados tienen un comportamiento que puede ser predicho por el modelo ajustado. De acuerdo a los resultados, la ecuación que explica el comportamiento de los valores observados de tiempo de fase lag (y) es:

$$\bar{y} = -1,2704E.L + 2,4620\text{PO}_4 - 0,2381E.L * \text{PO}_4 + 0,0582EL^2 + 0,3215\text{PO}_4^2 + 11,0593 \quad (16)$$

Donde E.L. es la concentración de extracto de levadura y PO_4 la concentración de sales de fosfato (KH_2PO_4 y K_2HPO_4), en el medio de cultivo.

En la Figura 16 se presenta la gráfica de contornos y la superficie de respuesta para el tiempo de fase de adaptación del microorganismo.

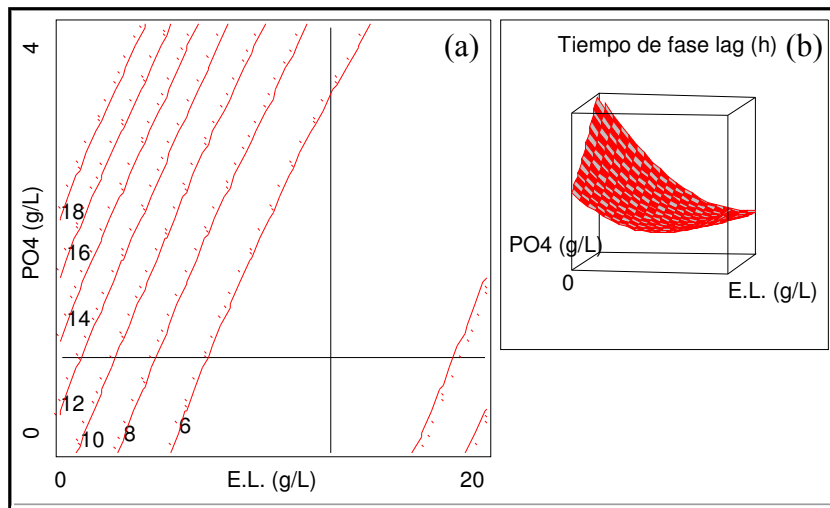


Figura 16. Grafica de contorno (a) y superficie de respuesta (b) del tiempo de fase lag en relación a la concentración de extracto de levadura (E.L.) y fosfatos (PO_4) ($R^2=0,8810$).

En este caso, el software utilizado encontró un mínimo para el tiempo de fase lag de 4,1h para una concentración de extracto de levadura de 12,7g/L y 0,89g/L de sales de fosfato (punto señalado con las líneas negras en la gráfica de contornos). Con estos mismos niveles de suplementación y utilizando los modelos obtenidos, se lograría obtener una productividad total de 4,75g/h y una productividad máxima de 3,00g/L*h (alrededor de un 30% menos de los valores máximos posibles para ambos parámetros).

Por otro lado, utilizando los niveles de suplementación de extracto de levadura y sales de fosfato para obtener las productividades más altas (20g/L E.L y 4g/L PO_4), se obtendría una fase lag de 4,9h (15% mayor del mínimo posible). Sería importante hacer un análisis de costo-beneficio para escoger la combinación más conveniente de nutrientes, de acuerdo a los intereses del proyecto.

En la gráfica de contornos se aprecia como el tiempo de fase lag, disminuye a medida que la concentración de extracto de levadura aumenta. En el estudio hecho por Thongwai (1999), se encontró también que al aumentar la concentración de extracto de levadura de 2 a 8g/L en un medio a base de melazas y con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*, la fase lag de crecimiento se redujo y la masa celular aumentó, dando como resultado una concentración de ácido láctico mayor.

También es interesante ver como el tiempo de fase lag tiende a aumentar a medida que la concentración de fosfatos aumenta en el medio. El fósforo está relacionado con la adquisición de energía por parte de la célula mediante los enlaces exergónicos de fosfatos en la molécula de ATP (adenosin trifosfato). Cuando el nivel de fosfatos no es limitante, el ciclo de glicólisis puede llevarse a cabo más rápido, resultando en un aumento en la velocidad de formación del producto final, en este caso, el ácido láctico (Amrane, 2000). De manera que los fosfatos cumplen un papel indispensable en la etapa de reproducción de la bacteria no así en la etapa de fase lag, al contrario, de acuerdo a los resultados los fosfatos afectan la adaptación de la bacteria al medio de cultivo prolongando el tiempo lag.

Para propósitos industriales, existen dos puntos que hay que tomar en cuenta: el costo del extracto de levadura es alto y un nivel alto de suplementación puede provocar problemas posteriores en los procesos de purificación, especialmente la obstrucción de membranas (microfiltración, ultrafiltración) debido a su contenido de polisacáridos (Amrane, 2000). Los fosfatos, por otro lado, representan una buena opción para lograr obtener resultados similares pero con menor contenido de extracto de levadura en el medio de cultivo, permitiendo reducir el costo de suplementación y manteniendo la eficiencia del microorganismo. Sin embargo, utilizar una concentración alta de fosfatos puede generar mayores interferencias a la hora de la purificación del ácido láctico; y por ende, elevar los costos de producción. De manera que es importante analizar los procesos de producción del ácido láctico así como de purificación para determinar los niveles de suplementación más convenientes para obtener un producto fácilmente y de bajo costo.

En general, el jugo de piña utilizado, a pesar de tratarse de un desecho agroindustrial y presentar cierta variabilidad en su composición a través del tiempo, representa una alternativa muy buena para la producción biotecnológica de ácido láctico a nivel industrial, al ser un sustrato barato, con un contenido de azúcares considerable y que permite alcanzar altas concentraciones del ácido láctico, utilizando el nivel de suplementación adecuado. Además, representa una solución a los problemas actuales de disposición de desechos industriales.

VI. Conclusiones

1. El desecho de piña utilizado en el estudio resultó ser adecuado para el crecimiento y desempeño de *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*, de manera que representa una buena alternativa para la producción biotecnológica de ácido láctico a nivel industrial.
2. *L.casei* sub. *rhamnosus* no fue capaz de consumir la sacarosa presente en el medio de cultivo en un tiempo prudente sin la hidrólisis enzimática; mientras que la inversión de la sacarosa permitió aumentar significativamente el rendimiento de producción de ácido láctico de un 79 a 98%.
3. La bacteria logró metabolizar todos los azúcares presentes en el ámbito de 60-100% (v/v) jugo de piña, presentando rendimientos de un 100% y la concentración de ácido láctico final aumentó al aumentar el nivel de jugo, en el ámbito de trabajo. Sin embargo, el tiempo de fermentación aumentó considerablemente al aumentar el nivel de jugo de 80 a 100% (v/v).
4. El medio a base de 80% de jugo de piña es el que presenta los mejores parámetros de eficiencia, porque se obtiene la mayor concentración de ácido láctico sin disminuir la productividad total del proceso.
5. Se logró obtener un modelo significativo de primer orden que explica el comportamiento de la productividad total y productividad máxima en función de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfatos. Los valores máximos encontrados de productividad total (6,5g/h) y de productividad máxima (4,1g/L*h) se obtienen al utilizar 20g/L de extracto de levadura y 4g/L de sales de fosfatos.
6. El tiempo de fase lag se ajustó a un modelo de segundo orden presentando un mínimo de 4h, a valores cercanos de 12,7g/L de extracto de levadura y 0,9g/L de sales de fosfatos.
7. La suplementación con extracto de levadura es esencial para el crecimiento de *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*, sin embargo, las sales de fosfato pueden permitir una menor concentración de extracto de levadura y así, reducir los costos de suplementación sin afectar el desempeño del proceso de fermentación.

VII. Recomendaciones

1. Hacer un estudio económico del proceso de fermentación tomando en cuenta los costos de suplementación con nutrientes y del tratamiento enzimático, en relación a la concentración de ácido láctico que se podría recuperar.
2. Hacer un análisis del costo-beneficio que involucra mantener la fermentación del jugo de piña al 100% en la etapa de producción más lenta de ácido láctico, para conocer si el aumento del tiempo compensa el aumento de la concentración de ácido láctico producido.
3. Realizar una caracterización química del jugo de piña más detallado con el fin de determinar que otras sustancias pueden estar siendo fuente de ácido láctico.
4. Realizar un estudio con las mejores condiciones encontradas en las pruebas de optimización de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato para comparar el valor predicho por el modelo y el valor experimental obtenido.
5. Realizar un estudio con un ámbito de concentraciones mayor de extracto de levadura y sales de fosfato para encontrar un punto óptimo en la producción de ácido láctico.
6. Realizar análisis físico químicos al caldo de fermentación para conocer el nivel de nutrientes residuales no utilizados.
7. Realizar un estudio de fermentación de la pulpa de piña de desecho tal como se obtiene de la industria procesadora (sin prensar) para analizar el comportamiento de la bacteria en un medio con mayor contenido de sólidos.
8. Realizar el procedimiento de activación de la bacteria previo a la inoculación, en el mismo medio a base de jugo de piña en lugar de MRS, para determinar si la adaptación en el biorreactor es más rápida.
9. Realizar un estudio sobre el tiempo máximo en que se puede mantener un cultivo en un proceso por lote repetido, ya que la edad del cultivo afecta la eficiencia del microorganismo y existen posibilidades de mutación.

VIII. Bibliografía

- AKERBERG, C; HOFVENDAHL, K; ZACCHI, G. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1998. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetic of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole wheat flour. *Applied Microbiology Biotechnology* 49: 682–690.
- AKERBERG, C. & ZACCHI, G. 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technology* 75: 119–126.
- 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: 223-228.
- AMRANE, A. & PRIGENT, Y. 1998. Influence of yeast extract concentration on batch culture of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 529-534.
- AOAC (Association of Analytical Communities). 1990. *Official Methods of Analysis*. 15 ed. AOAC Internacional, Washington D.C.
- AOAC (Association of Analytical Communities). 2005. *Official Methods of Analysis*. 18 ed. Revisión 1 (2006). AOAC Internacional, Washington D.C.
- AXELSSON, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. & OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3 ed. Marcel-Dekker, Nueva York.
- BIN, H. & MOCH, A. 2007. Production of organic acid from local raw materials. Final Report. Technological University of Malaysia, Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering. Johor Bahru, Malasia.
- BOGAERT, J.C. & NAIDU, A.S. Lactic acid. En: NAIDU, A.S. 2000. *Natural food antimicrobial systems*. CRC Press, Florida.

- BRANEN, A.L. & KEENAN, T.W. 1971. Effect of citrate on the composition and metabolism of *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology* 21(6): 993-998.
- CAMACHO, A.C. 2009. Insensatez piñera. *El Financiero*. Edición 724. INTERNET: http://www.elfinancierocr.com/ef_archivo/2009/julio/05/enportada2006741.html#.
Revisado: 12/12/09.
- CARPENTER, D; NGEH-NGWAINBI, J. & LEE, S. Lipid analysis. En: SULLIVAN, D.M & CARPENTER, D.E. eds. 1993. *Methods of analysis for nutrition labelling*. AOAC Internacional.
- CHAN, Y. 2001. Utilización de banano de rechazo para la generación de ácido láctico a través de un proceso de fermentación por lote. Tesis M.Sc. en Ciencia de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- CHAN-BLANCO, Y.; BONILLA-LEIVA, A.R. & VELÁZQUEZ, A.C. 2003. Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology* 63: 147-152.
- CITA. 2005. Almidón por método enzimático. Método analítico P-SA-MQ-011. Emisión 1. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- CITA. 2009a. Humedad. Método analítico P-SA-MQ-002. Emisión 1. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- CITA. 2009b. Acidez Titulable. Método analítico AQCITA-M018. Emisión 3. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- CITA. 2009c. Determinación del pH. Método analítico P-SA-MQ-012. Emisión 1. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- CITA, 2009d. Cenizas Totales. Método analítico P-SA-MQ-004. Emisión 1. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

- CITA, 2009e. Nitrógeno Total por Método Kjeldahl. Método analítico P-SA-MQ-003. Emisión 1. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- CITA, 2009f. Grasa Cruda por Extracto Etéreo. Método analítico P-SA-MQ-005. Emisión 1. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- CITA. 2009g. Azúcares por HPLC. Método analítico P-SA-MQ-006, emisión 11. Laboratorio de Química del CITA. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- COMEX. 2009. Costa Rica principales productos de exportación en el 2008. INTERNET. <http://www.comex.go.cr/estadisticas/Exportaciones%20comercio%20de%20Costa%20Rica%20cifras%20global/Principales%20productos%20de%20exportación%20-%202009.pdf> Revisado 28/01/10.
- COUDEYRAS, S.; MARCHANDIN, H.; FAJON, C. & FORESTIER, C. 2008. Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. Applied and Environmental Microbiology 74(9): 2679-2689.
- DATTA, R.; TSAI, S.P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S.H.; FRANK, J.R. 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Reviews 16: 221–231.
- DE LA CRUZ, J. & GARCÍA, H. s.f. Operaciones post-cosecha de la piña. Instituto Tecnológico de Veracruz. INTERNET: <http://www.fao.org/inpho/content/compand/text/ch33s/AE614s01.htm>. Revisado: 03/02/10.
- DEMIRCI, A.; POMETTO, A.L.; LEE, B. & HINZ, P. 1998. Media evaluation of lactic acid repeated-batch fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46: 4771-4774.

- DING, S. & TAN, T. 2006. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry* 41: 1451-1454.
- ELIZONDO, A. 2007. Piña fresca. Boletín Consejo Nacional de Producción. INTERNET. http://www.mercanet.cnp.go.cr/SIM/Frutas_y_Vegetales/Historicos/Pi%C3%B1a_fresca/2007/Pi%C3%B1a_Fresca_27-enero-2007.pdf. Revisado 14/05/08.
- ELIZONDO, A. 2008. Piña fresca. Boletín Consejo Nacional de Producción. INTERNET. http://www.cnp.go.cr/php_mysql/admin/KTML/uploads/files/Bol%20pi%C3%B1a%20No.27-enero-2008.pdf. Revisado 27/08/08.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1994. Cleaner Technologies Substitutes Assessment (CTSA): Screen Reclamation. INTERNET: <http://www.epa.gov/dfe/pubs/screen/ctsa/pdf/chap-02.pdf>. Revisado: 09/11/09.
- FAOSTAT. 2010. Bases de datos de producción y comercio agrícola mundial. INTERNET. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>. Revisado 05/02/10.
- FITZPATRICK, J; AHRENS, M. & SMITH, S. 2001. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. *Process Biochemistry* 36: 671-675.
- FITZPATRICK, J; MURPHY, C; MOTA, F.M. & PAULI, T. 2003. Impurity and cost considerations for nutrient supplementation of whey permeate fermentations to produce lactic acid for biodegradable plastics. *International Dairy Journal* 13:575-580.
- GOKSUNGUR, Y. & GUVENC, U. 1997. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO-3202. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 69: 399-404.
- GONCALVES, L., XAVIER, A. & ALMEIDA, J. 1991. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microbiology and Technology* 13: 314-319.

- GONZÁLEZ, M.; ALVAREZ, S.; RIERA, F. & ALVAREZ, R. 2006. Purification of lactic acid from fermentation broths by ion-exchange resins. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45(9): 3243-3247.
- GULLÓN, B., GARROTE, G., ALONSO, J.L. & PARAJÓ, J.C. 2007. Production of lactic acid and oligomeric compounds from apple pomace by simultaneous saccharification and fermentation: A response surface methodology assessment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55(14): 5580-5587.
- HABOVA, V.; MELZUCH, K.; RYCHTERA, M. & SEKAVOVA, B. 2004. Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth. *Desalination* 163: 361-372.
- HIRATA, M.; GAO, M.; TOORISAKA, E.; TAKANASHI, H. & HANO, T. 2005. Production of lactic acid by continuous electrodialysis fermentation with a glucose concentration controller. *Biochemical Engineering Journal* 25(2): 159-163.
- HO, G.; POMETTO, A. & HINZ, P. 1997. Optimization of L-(+)-lactic acid production by ring and disc plastic composite support through repeated-batch biofilm fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 63(7): 2533–2542.
- HOFVENDAHL, K. & HAHN-HÄGERDAL, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microbiology and Technology* 26:87–107.
- HUJANEN, M., LINKO, S., LINKO, Y. & LEISOLA, M. 2001. Optimization of media and cultivations conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 126-130.
- IDRIS, A. & SUZANA, W. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry* 41: 1117-1123.

INEC, 2009. Importación de ácido láctico. Sistema de consulta de comercio exterior. INTERNET.

<http://www.inec.go.cr/sicceweb/PrincipalReporte.aspx?fecha1=01/01/2009&fecha2=01/12/2009&flujo=1®imenes=todos&tpartidas=3&partidas=2918110000&paises=todos&aduanas=todos&tRC=todos&cRC=todos&RC=todos&grupo=1&fechas=1/2009 al 12/2009&nav=1>. Revisado 11/01/10.

JIN, B.; YIN, P.; MA, Y. & ZHAO, L. 2005. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus fungi* from food processing waste streams. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 678-686.

JOHN, R.; NAMPOOTHIRI, K.M. & PANDEY, A. 2006. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry* 41: 759–763.

JOHN, R.; NAMPOOTHIRI, K.M. & PANDEY, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 524–534.

KORTBECH-OLESEN, R. 1996. Tropical fruit products: a well established market. *International Trade Forum* 3: 10-15.

KOTZAMANIDIS, C., ROUKAS, T. & SKARACIS, G. 2002. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 441-448.

KRUEGER, D.; KRUEGER, R. & MACIEL, J. 1992. Composition of pineapple juice. *Journal International AOAC* 75(2): 280-282.

MADZINGAIDZO, L.; DANNER, H. & BRAUN, R. 2002. Process development and optimization of lactic acid purification using electrodialysis. *Journal of Biotechnology* 96: 223-239.

- MAYRA-MAKINEN, A.; SUOMALAINEN, T. & MEIJERIEN, V. 1995. *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*: Bacterial preparations comprising said strain, and use of said strain and preparations for the controlling of yeast and moulds. Patente 5,378,458. United States Patent and Trademark Office, Estados Unidos.
- MAYRA-MAKINEN, A. & BIGRET, M. 2004. Industrial use and production of lactic acid bacteria. En: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. & OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3 ed. Marcel-Dekker, Nueva York.
- MEGAZYME, 2005. Sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure K-SUFRG. Megazyme International. Irlanda. INTERNET: <http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/K-SUFRG.pdf>. Revisado: 15/05/09
- MEHTA, J.; KUMAR, V.; BHUNIA, H. & UPADHYAY, S. 2005. Synthesis of poly(lactic) acid: a review. Journal of Macromolecular Science 45: 325–349.
- MERCIER, P.; YERUSHALMI, L.; ROULEAU, D. & DOCHAIN, D. 1992. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 55:111-121.
- MOON, N.J. & WOODROOF, J.G. 1986. Plant sanitation and waste disposal. En: WOODROOF, J.G. Commercial Fruit Processing. 2 ed. Avi Publishing Company, Connecticut.
- MURILLO, O.M. s.f. Ficha técnica de industrialización de la piña (*Ananas comosus* L.). Consejo Nacional de Producción. INTERNET: http://www.cnp.go.cr/php_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/Pina_FTP.pdf. Revisado: 26/08/09.
- NAKASAKI, K., YANAGISAWA, M. & KOBAYASHI, K. 2008. Microbial quality of fermented milk produced by repeated-batch culture. Journal of Bioscience and Bioengineering 105(1): 73-76.

- NANCIB, A.; NANCIB, N.; MEZIANE, D.; BOUBENDIR, A.; FICK, M. & BOUDRANT, J. 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology* 96: 63-67.
- NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. & SRIVASTAVA, A. 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* 7(2): 167-179.
- NAVEENA, B.J.; ALTAF, M.; BHADRAYYA, K. & REDDY, G. 2004. Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran. *Food Technology and Biotechnology* 42(3): 147-152.
- NAVEENA, B.J.; ALTAF, M.; BHADRAYYA, K.; MADHAVENDRA, S.S. & REDDY, G. 2005. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. *Process Biochemistry* 40: 681-690.
- POLOM, E. & SZANIAWSKA, D. 2006. Rejection of lactic acid solutions by dynamically formed nanofiltration membranes using a statistical design method. *Desalination* 198: 208-214.
- POSTEN, C.H. & COONEY, C.L. 1993. Growth of microorganism. In: REHM, H.J. & REED, G. eds. *Biotechnology: biological fundamentals*. Wiley VHC, Nueva York.
- QUESADA, K.; ALVARADO, P.; SIBAJA, R. & VEGA, J. 2005. Utilización de fibras del rastrojo de piña (*Ananas comusus*, variedad Champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 6(2): 157- 179.
- QUIJANDRÍA, G.; BERROCAL, J. & PRATT, L. 1997. La industria de la piña en Costa Rica: un análisis de sostenibilidad. INCAE, Costa Rica. INTERNET. <http://www.incae.ac.cr/ES/clacds/nuestras-investigaciones/pdf/cen707.pdf>.
Revisado 26/08/08.

- RASHID, R. 2008. Optimization and modeling of lactic acid production from pineapple waste. Final Report. Technological University of Malaysia, Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering. Johor Bahru, Malasia. INTERNET. <http://eprints.utm.my/5830/2/74263.pdf>. Revisado 15/05/08.
- SAARELA, U., LEIVISKA, K. & JUUSO, E. 2003. Modeling of a fed-batch fermentation process. Control Engineering Laboratory, University of Oulu, Finland. Report A No. 21:1-23.
- SABORÍO, D. & CAMACHO, O. 1996. Descripción del manejo post-cosecha y factores de rechazo de piña (var. Cayenna Lisa y clon Champaka) para exportación de la zona norte de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 20(1): 67-73.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. & OUWEHAND, A. 2004. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3 ed. Marcel-Dekker, Nueva York.
- SASAKI, K., NOPARATNARAPHORN, N. & NAGAI, S. 1991. Use of photosynthetic bacteria for the production of SCP and chemicals from agro industrial waste. En: MARTIN, A.M. Bioconversion of waste material to industrial product. Elvise Applied Science, London.
- SERNA, L. & RODRÍGUEZ, A. 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5(1): 54-65.
- SHULER, M.L. & KARGI, F. 1992. Bioprocess engineering: basic concepts. Prentice Hall, New Jersey.
- SIEBOLD, M., FRIELING, P., JOPPIEN, R., RINDFLEISCH, D., SCHUGERL, K. & ROPER, H. 1995. Comparison of the production of lactic acid by three different *Lactobacilli* and its recovery by extraction and electro dialysis. *Process Biochemistry* 30(1): 81-95.
- SINGH, S.K.; AHMED, S. & PANDEY, A. 2006. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry* 41:991-1000.

- SIRACUSA, V., ROCCULI, P., ROMANI, S. & DALLA-ROSA, M. 2008. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19: 634-643.
- SISWOYO, T., OKTAVIANAWATI, I., DJENAL, O., MURDIYANTO, & U. SUGIHARTO, B. 2007. Changes of sucrose content and invertase activity during sugarcane stem storage. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 8(2): 75-81.
- SOUTHGATE, D.A. 1976. Determination of food carbohydrates. Capítulo 8. *Select Methods*. Applied Science Publishers LTD: Londres.
- SULLIVAN, D.M & CARPENTER, D.E. eds. 1993. *Methods of analysis for nutrition labeling*. AOAC International.
- TEJAYADI, S. & CHERYAN, M. 1995. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Applied Microbiology Biotechnology* 43: 242-248.
- THONGWAI, N. 1999. Production of L-(+) lactic acid from blackstrap molasses by *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* ATCC 11443. PhD Thesis in Biological Sciences. Louisiana State University, Department of Biological Sciences. Louisiana.
- TORRES, M & LOIS, M. eds. s.f. *Métodos de análisis de alimentos: Manual de prácticas*. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- TRINDER, P. 1959. Determination of glucose in blood using 4-aminophenazone. *Journal of Clinical Pathology* 22:246.
- VELÁZQUEZ, A.C. 1998. Performance of plastic composite support (PCS) in repeated fed batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* with and without nystatin antibiotic addition. Tesis de maestría. Iowa State University, Iowa.
- VELÁZQUEZ, A.; POMETTO, A.; HO, K. & DEMIRCI, A. 2001. Evaluation of plastic-composite supports in repeated fed-batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 434-441.

- WASEWAR, K.; YAWALKAR, A.; MOULIJN, J. & PANGARKAR, V. 2004. Fermentation of glucose to lactic acid couple with reactive extraction: A review. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 43(19): 5969-5982.
- WEE, Y.; KIM, J. & RYU, H. 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 163-172.

IX. Apéndices

Apéndice A: Caracterización físico-química del jugo piña.

Cuadro A1. Resultados de la caracterización química del jugo del desecho de piña (Lote 1).

Análisis	Muestra		
	227	228	229
Humedad (%)	89,40	89,50	89,40
Acidez (% ac.cítrico)	0,41	0,41	0,41
pH	3,79	3,79	3,79
°Brix	10,45	10,45	10,38
Grasa (%)	N.D.	N.D.	N.D.
Cenizas (%)	0,26	0,25	0,25
Proteína Nx6,25 (%)	0,3	0,3	0,3
Carbohidratos totales (%)	9,60	9,60	9,70
Valor energético kJ/100g	166	165	167
Valor energético por grasa kJ/100g	0	0	0
Almidón (%)	No se realizó	No se realizó	No se realizó
Sacarosa (%)	1,8	1,8	1,9
Glucosa (%)	2,9	2,9	2,8
Fructosa (%)	2,9	2,9	2,8
Lactosa (%)	N.D.	N.D.	N.D.

Cuadro A2. Resultados de la caracterización química del jugo del desecho de piña (Lote 2).

Análisis	Muestra		
	267	268	269
Humedad (%)	90,60	90,60	90,60
Acidez (% ac.cítrico)	0,45	0,45	0,47
pH	3,62	3,67	3,63
°Brix	No se realizó	No se realizó	No se realizó
Grasa (%)	N.D.	N.D.	N.D.
Cenizas (%)	0,23	0,24	0,24
Proteína N x 6,25 (%)	0,30	0,30	0,30
Carbohidratos totales (%)	8,40	8,40	8,30
Valor energético kJ/100g	146,0	145,0	145,0
Valor energético por grasa kJ/100g	0,0	0,0	0,0
Almidón (%)	N.D.	N.D.	N.D.
Sacarosa (%)	1,3	1,3	1,3
Glucosa (%)	1,5	1,5	1,5
Fructosa (%)	1,4	1,4	1,4
Lactosa (%)	N.D.	N.D.	N.D.

Cuadro A3. Resultados de la caracterización química del jugo del desecho de piña (Lote 3).

Análisis	Muestra		
	1176	1177	1178
Humedad (%)	89,90	90,00	89,90
Acidez (% ac.cítrico)	0,4	0,2	0,4
pH	4,0	4,0	4,0
°Brix	10,29	10,29	10,29
Grasa (%)	N.D.	N.D.	N.D.
Cenizas (%)	0,19	0,20	0,19
Proteína N x 6,25 (%)	0,4	0,6	0,4
Carbohidratos totales (%)	9,1	8,8	9,2
Valor energético kJ/100g	160	158	160
Valor energético por grasa kJ/100g	0,0	0,0	0,0
Almidón (%)	N.D.	N.D.	N.D.
Sacarosa (%)	2,7	2,7	2,7
Glucosa (%)	3,1	2,9	2,8
Fructosa (%)	3,0	2,9	2,9
Lactosa (%)	N.D.	N.D.	N.D.

Apéndice B: Pruebas de la hidrólisis enzimática del medio con invertasa.

Cuadro B1. Fermentación control (R1) de un medio a base de jugo de piña (80%v/v) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	3,318	17,356	28,927	29,027
2	2	0,017	0	3,401	21,827	28,789	28,887
3	5	0,023	0	2,855	19,723	31,419	31,678
4	6,5	0,018	0	2,311	24,982	27,267	27,911
5	7,5	0,018	0	3,162	23,931	29,343	30,143
6	9	0,015	0	3,681	19,197	32,111	31,539
7	12,75	0,02	6	5,194	22,188	30,998	32,126
8	14	0,02	10	6,820	18,145	31,142	34,190
9	15	0,015	17	7,174	18,408	27,959	27,631
10	16,5	0,02	34	11,530	20,512	25,190	27,771
11	18	0,02	59	19,143	18,934	22,284	25,399
12	19,5	0,018	89	26,230	18,934	17,301	22,328
13	20,5	0,02	104	32,685	17,882	14,394	19,537
14	28	0,02	210	46,294	20,643	0,761	8,792
15	29	0,02	221	55,237	20,906	0,001	5,652
16	30	0,022	226	58,568	18,145	0,001	3,838
17	33	0,025	244	59,656	17,488	0,208	0,244
18	34	0,02	244	64,960	14,595	0,346	0,209
19	46,5	0,018	247	64,875	16,567	0,381	0,384

Cuadro B2. Fermentación control (R2) de un medio a base de jugo de piña (80%v/v) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	4,346	22,090	26,990	28,190
2	2	0,02	0	5,313	17,469	30,746	32,396
3	7	0,025	0	4,356	17,845	29,956	31,698
4	10,5	0,02	1	4,254	17,619	29,343	28,608
5	11,5	0,021	2	6,149	17,093	31,557	31,260
6	13	0,021	7	6,373	20,249	30,450	31,818
7	14,5	0,02	16	8,495	19,197	28,512	30,143
8	16,5	0,02	38	13,463	15,778	25,190	29,725
9	17,5	0,02	56	14,300	16,041	23,668	26,655
10	19	0,017	84	20,298	19,986	17,301	24,282
11	20,5	0,02	117	31,527	18,145	14,118	21,212
12	21,5	0,02	130	35,735	19,329	11,280	15,421
13	23	0,02	156	41,186	16,436	6,920	14,025
14	25	0,02	186	52,009	17,093	3,460	12,002
15	27	0,02	208	53,889	16,173	1,038	8,443
16	29	0,02	228	55,728	17,563	0,001	5,732
17	32,5	0,018	247	57,127	16,436	0,001	1,296
18	34	0,025	250	60,040	15,403	0,198	0,150
19	51,5	0,02	253	65,424	15,318	0,138	0,001

Cuadro B3. Fermentación control (R3) de un medio a base de jugo de piña (80%v/v) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,025	0	3,014	16,567	30,173	30,422
2	1	0,02	0	3,566	20,775	31,142	31,678
3	20	0,016	111	23,092	17,619	16,609	21,212
4	20,5	0,02	122	34,162	16,173	11,280	14,932
5	21	0,018	134	30,503	18,014	11,419	17,165
6	21,5	0,02	144	36,216	19,329	9,204	14,374
7	22	0,018	155	40,300	17,619	7,059	11,443
8	22,5	0,02	162	41,680	21,695	6,159	9,908
9	23	0,02	169	41,116	17,751	6,505	13,188
10	24	0,018	183	43,482	14,464	4,291	9,210
11	25	0,021	196	41,696	18,032	3,806	11,164
12	27,5	0,023	225	55,372	17,469	0,297	7,725
13	28,5	0,02	234	51,432	16,107	0,346	4,954
14	29,5	0,02	242	56,297	15,450	0,208	2,686
15	30,5	0,017	248	59,016	16,765	0,104	2,512
16	43	0,019	259	62,502	16,239	0,104	0,140
17	44,5	0,015	260	63,684	14,792	0,242	0,140
18	46,25	0,018	260	65,196	15,778	0,346	0,001

Cuadro B4. Fermentación con hidrólisis enzimática con invertasa (R1) de un medio a base de jugo de piña (80%v/v) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	1,484	3,287	36,294	37,981
2	7,7	0,018	3	2,690	0,526	35,156	36,842
3	9,5	0,02	11	4,171	0,001	35,156	37,121
4	11,25	0,02	26	5,565	0,263	33,218	35,167
5	15	0,019	72	20,920	0,526	25,329	29,306
6	16,3	0,021	104	26,029	0,001	17,924	20,724
7	19,1	0,023	148	35,504	1,841	17,716	21,631
8	20,75	0,019	171	44,825	0,630	11,419	13,397
9	22	0,02	187	47,886	0,001	14,118	16,467
10	31,75	0,02	277	60,090	0,001	4,118	6,873
11	32,8	0,019	284	61,963	0,237	2,540	0,014
12	35,55	0,015	301	63,292	0,001	0,934	3,489
13	37,3	0,019	311	66,052	0,131	0,001	2,372
14	39,3	0,02	321	67,158	0,263	0,001	0,105

Cuadro B5. Fermentación con hidrólisis enzimática con invertasa (R2) de un medio a base de jugo de piña (80%v/v) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	1,171	9,204	36,851	37,156
2	2	0,016	0	1,129	5,917	34,948	37,330
3	4	0,02	0	1,217	2,560	36,332	39,249
4	5,25	0,023	0	1,162	1,315	34,256	34,016
5	7,1	0,02	1	2,086	0,630	34,256	36,284
6	7,9	0,02	2	1,744	0,602	31,488	35,586
7	15,5	0,021	79	15,247	0,889	23,356	31,748
8	16,5	0,017	95	27,406	0,972	22,664	28,783
9	17,5	0,022	111	28,545	0,945	18,685	26,689
10	18,5	0,018	127	31,213	0,246	19,204	23,375
11	19,6	0,021	142	36,328	0,945	15,052	22,154
12	20,5	0,022	152	40,014	0,972	14,187	19,537
13	23,2	0,018	183	48,847	0,165	9,842	14,519
14	25,5	0,019	206	49,628	0,953	7,770	13,161
15	27	0,017	221	58,236	0,841	6,713	10,466
16	28	0,018	230	58,141	0,001	11,419	7,885
17	40	0,016	298	64,258	0,471	0,138	2,582
18	42,5	0,015	309	71,784	0,526	0,001	0,001
19	44	0,017	310	72,060	0,006	0,001	0,001

Cuadro B6. Fermentación con hidrólisis enzimática con invertasa (R3) de un medio a base de jugo de piña (80%v/v) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,015	0	2,080	0,001	35,848	37,819
2	3,3	0,02	0	3,048	0,526	37,509	40,191
3	5,2	0,018	0	4,535	0,297	36,574	39,111
4	7	0,02	0	4,948	0,263	34,879	37,121
5	8,4	0,022	2	5,948	0,001	36,401	39,354
6	9,3	0,021	6	6,034	0,001	34,879	37,121
7	10,25	0,019	11	7,153	0,001	33,879	36,073
8	11,1	0,02	19	8,247	0,578	32,803	35,725
9	18,7	0,016	162	30,156	0,001	16,332	21,770
10	19,7	0,0185	178	36,758	0,526	11,073	17,165
11	20,7	0,022	193	40,136	0,263	9,689	14,932
12	21,7	0,02	208	41,212	0,657	7,266	13,188
13	22,75	0,02	222	45,217	0,657	5,675	11,653
14	23,7	0,019	231	52,196	0,657	3,816	9,017
15	26,3	0,021	254	56,125	0,920	2,215	8,373
16	28,6	0,022	270	60,357	0,183	0,484	7,047
17	31	0,025	283	63,915	0,183	0,052	3,384
18	43,2	0,018	298	66,915	0,180	0,032	0,183
19	44,6	0,018	298	67,513	0,024	0,005	0,006

Apéndice C: Pruebas de la concentración inicial de azúcares en el medio de cultivo

Cuadro C1. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 60%v/v (R1) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,015	0	4,038	8,218	16,782	19,712
2	2	0,017	0	4,159	0,001	34,602	25,294
3	11,1	0,019	29	9,078	0,001	23,702	25,992
4	12,5	0,016	47	14,267	0,001	26,990	21,631
5	14	0,02	69	17,791	0,001	13,149	15,769
6	15,5	0,02	93	24,745	0,001	15,502	20,793
7	19,8	0,017	150	38,504	0,001	9,827	14,374
8	21,67	0,018	170	41,929	0,001	4,983	8,234
9	23	0,018	184	51,620	0,001	3,424	7,218
10	24,4	0,019	199	51,091	0,001	2,698	7,114
11	25,5	0,019	207	53,976	0,001	1,315	4,954
12	35,25	0,018	247	67,128	0,001	0,042	0,279
13	36,5	0,015	247	66,172	0,001	0,001	0,001

Cuadro C2. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 60%v/v (R2) con *Lactobacillus casei* sub. *ramnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	4,931	0,855	23,806	25,957
2	4,16	0,03	0	3,921	0,001	28,512	29,166
3	6	0,018	1	4,617	0,001	27,128	30,981
4	9,25	0,017	12	7,736	0,001	25,467	26,934
5	11,17	0,02	27	11,540	0,001	25,190	26,096
6	12,58	0,018	45	15,511	0,001	21,592	25,399
7	22,17	0,021	169	43,278	0,001	8,443	12,630
8	23	0,019	177	52,023	0,001	4,706	9,350
9	24	0,018	187	54,752	1,578	2,215	6,071
10	28,3	0,017	226	61,043	0,105	0,173	3,524
11	30	0,018	237	61,030	0,001	0,001	0,837
12	32,1	0,017	242	69,050	0,158	0,097	0,001
13	33	0,02	242	61,369	0,001	0,001	0,001

Cuadro C3. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 60%v/v (R3) con *Lactobacillus casei* sub. *ramnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	3,389	5,914	28,235	29,446
2	2,33	0,019	0	3,638	1,841	23,391	21,631
3	12	0,018	47	11,730	0,001	19,377	20,514
4	14,5	0,02	87	22,552	0,001	12,139	15,901
5	16,17	0,019	109	28,105	3,548	12,243	15,901
6	18,25	0,017	135	34,707	0,001	9,619	14,513
7	23,5	0,022	193	50,438	0,131	2,837	6,908
8	25	0,015	207	50,011	0,001	1,972	6,943
9	26	0,022	217	54,716	0,263	0,657	5,408
10	27	0,018	223	54,401	0,001	0,001	3,866
11	35,5	0,018	247	60,764	0,001	0,001	0,056

Cuadro C4. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v (R1) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	7,309	3,616	34,602	35,411
2	2	0,014	0	5,274	0,001	35,952	32,468
3	7,75	0,022	7	7,495	0,329	25,087	25,643
4	10,33	0,022	24	9,417	3,287	27,682	30,702
5	13	0,02	59	16,788	0,001	26,644	31,225
6	14,33	0,02	79	24,690	2,958	21,799	25,643
7	15,33	0,015	95	25,957	0,001	22,837	28,085
8	24,83	0,018	213	54,949	0,001	11,828	16,006
9	27,33	0,018	235	52,331	0,001	6,640	9,520
10	29,33	0,019	251	62,749	0,001	5,603	7,427
11	33	0,017	278	62,275	0,001	3,875	4,815
12	37,33	0,015	306	76,157	0,001	0,761	1,326
13	38,58	0,019	312	75,135	0,001	0,311	0,768
14	49,25	0,02	320	74,188	0,001	0,028	0,028

Cuadro C5. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v (R2) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,015	0	4,035	0,001	43,426	35,760
2	3,17	0,017	0	3,151	0,657	29,066	34,888
3	10,1	0,018	11	6,416	0,001	29,931	33,841
4	11	0,015	17	8,517	0,001	32,872	32,969
5	12	0,017	25	10,848	0,001	32,526	30,876
6	13,58	0,018	42	16,150	0,001	33,218	27,213
7	22,1	0,017	166	39,303	0,001	19,377	22,189
8	23,75	0,022	185	45,868	0,001	13,054	15,564
9	25,75	0,017	207	55,365	0,001	12,328	15,042
10	27	0,02	219	53,985	0,001	9,635	12,848
11	30,5	0,015	250	69,579	0,001	6,920	8,792
12	33,75	0,017	274	64,561	0,001	4,567	6,001
13	37	0,018	295	78,320	0,001	2,699	3,349
14	38	0,018	301	76,303	0,001	1,799	2,058
15	45,25	0,017	321	84,409	0,001	0,138	0,098

Cuadro C6. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v (R3) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,015	0	6,341	2,814	39,446	40,994
2	7,17	0,011	4	8,209	0,001	37,889	43,436
3	8,67	0,012	9	8,294	0,001	36,851	40,994
4	11,25	0,013	27	11,802	0,001	35,813	38,377
5	12,25	0,017	39	18,138	0,001	27,163	30,004
6	13,25	0,016	52	19,191	1,644	30,796	34,888
7	14,25	0,013	68	20,969	0,001	31,834	35,586
8	15,25	0,018	85	26,931	0,001	24,914	32,969
9	25,17	0,014	210	51,577	0,591	10,168	13,181
10	26,67	0,015	223	55,556	0,001	9,960	12,240
11	27,67	0,015	231	62,754	1,709	6,228	8,234
12	32,75	0,018	272	68,240	0,001	4,291	4,466
13	35	0,015	287	69,526	0,001	3,045	3,140
14	37	0,016	299	78,556	0,001	2,007	2,931
15	39	0,013	310	80,501	0,001	0,934	1,535
16	49,17	0,015	322	80,275	0,001	0,069	0,195

Cuadro C7. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 100%v/v (R1) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,017	0	2,557	2,922	53,057	44,579
2	9,75	0,02	11	5,210	0,001	43,253	49,037
3	11	0,017	18	6,666	0,001	38,255	40,703
4	12,5	0,018	31	13,800	0,001	40,561	42,641
5	14	0,018	48	18,678	0,001	40,946	41,090
6	18,33	0,02	110	30,977	0,001	42,768	32,934
7	20,17	0,018	132	37,389	0,001	30,035	29,585
8	21,5	0,019	146	41,328	0,001	26,298	26,655
9	24	0,02	171	47,695	0,001	24,498	25,678
10	33,75	0,018	247	65,834	0,001	16,990	15,982
11	36	0,018	261	66,423	0,001	12,743	11,699
12	37,5	0,015	269	65,191	0,001	14,711	12,430
13	39,58	0,017	280	72,263	0,001	11,350	9,490
14	41	0,015	287	63,697	0,001	11,073	8,443
15	45	0,02	304	81,038	0,001	8,512	8,164
16	47,75	0,019	315	75,805	0,001	6,228	5,861
17	55	0,016	343	89,343	0,001	2,657	1,984
18	69	0,015	360	96,975	0,001	0,001	0,001
19	71	0,018	362	96,325	0,001	0,001	0,001

Cuadro C8. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 100%v/v (R2) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,021	0	5,633	3,682	46,540	48,494
2	9,33	0,021	10	7,494	0,001	42,734	43,610
3	10,5	0,02	16	8,545	0,001	43,080	38,028
4	11,5	0,017	22	9,851	2,630	40,312	45,529
5	15,58	0,02	72	18,850	0,001	34,256	39,772
6	18	0,016	107	25,821	0,263	27,820	31,120
7	19,9	0,018	131	31,735	0,001	27,682	29,864
8	21,25	0,02	147	43,278	0,001	22,699	25,678
9	23,42	0,018	169	47,008	0,001	22,999	26,114
10	33,1	0,018	243	69,495	0,197	14,297	15,564
11	35,58	0,018	258	68,911	0,001	14,325	13,257
12	37,25	0,018	268	70,260	0,001	9,412	9,210
13	39,33	0,022	279	76,295	0,001	11,968	10,020
14	44,58	0,02	303	73,926	0,001	8,858	6,768
15	47,58	0,02	316	83,467	1,236	6,934	4,717
16	48,5	0,014	319	84,836	0,001	7,253	4,773
17	58	0,017	332	92,593	0,001	2,325	0,564
18	70	0,015	341	97,473	0,001	0,197	0,197

Cuadro C9. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 100%v/v (R3) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	6,249	0,001	53,633	43,261
2	7,75	0,017	4	4,296	0,001	52,076	42,675
3	10	0,02	11	5,353	0,001	44,291	39,947
4	12,67	0,02	29	9,705	0,001	43,253	41,691
5	15	0,018	54	18,097	0,001	41,177	40,994
6	16,5	0,018	73	21,703	0,001	36,401	40,749
7	18,75	0,032	105	36,683	0,001	31,142	31,539
8	20,5	0,021	125	40,944	0,001	29,343	30,841
9	22,5	0,018	147	40,828	0,001	26,298	29,585
10	32,25	0,02	228	64,465	2,953	17,301	17,026
11	35,42	0,018	246	73,180	0,001	14,918	12,012
12	38,25	0,02	262	72,894	2,235	12,180	10,955
13	41,5	0,019	278	70,983	0,001	11,488	8,652
14	45,1	0,02	292	85,690	0,526	9,204	6,629
15	48	0,017	304	88,212	0,001	7,958	5,512
16	55	0,018	327	89,002	0,001	4,810	2,686
17	63,5	0,019	350	92,993	0,001	2,671	0,795
18	70	0,02	360	101,621	0,001	0,197	0,026

Apéndice D: Optimización de la concentración de extracto de levadura y sales de fosfato en el medio de cultivo

Cuadro D1. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 0g/L de extracto de levadura y 2g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,015	0	2,558	9,861	38,927	39,772
2	16,2	0,015	0	3,059	0,001	39,965	39,947
3	21	0,02	7	5,016	0,001	36,159	36,981
4	37	0,017	56	15,288	0,001	26,644	27,038
5	42,1	0,015	70	20,306	0,001	24,775	25,259
6	46	0,019	78	21,165	0,001	25,467	25,957
7	60,3	0,014	110	27,230	0,001	19,170	18,142
8	65,8	0,017	122	31,222	0,001	19,170	17,305
9	69,2	0,017	130	32,104	0,001	15,087	13,537
10	82,25	0,01	155	38,611	0,001	13,564	11,374
11	88,5	0,016	165	45,344	0,001	13,149	10,397
12	95,1	0,016	176	43,189	0,001	11,460	8,764
13	109,67	0,017	197	48,054	0,001	9,356	6,754
14	118	0,014	209	45,347	0,001	8,397	6,094
15	131	0,012	225	51,228	0,001	7,128	3,873
16	141,25	0,016	236	50,512	0,001	5,509	1,926
17	161,6	0,014	255	49,680	0,001	2,533	0,181
18	167,2	0,016	260	58,828	0,001	1,336	0,049
19	177,75	0,013	265	57,245	0,001	0,057	0,033

Cuadro D2. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 3g/L de extracto de levadura y 3,35g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,013	0	3,292	2,301	36,332	41,866
2	4,33	0,017	0	2,721	0,001	41,004	45,006
3	9,6	0,014	0	2,120	1,315	38,754	44,482
4	12,6	0,015	0	2,871	0,001	40,139	44,657
5	14	0,014	0	2,710	0,001	40,831	42,389
6	23,2	0,012	40	12,138	0,001	33,391	39,424
7	24,1	0,014	50	15,109	0,657	31,315	36,633
8	25	0,013	63	17,492	0,001	31,142	36,284
9	26	0,014	77	20,525	0,001	26,990	30,981
10	27,5	0,012	95	25,805	0,471	26,713	28,190
11	33,6	0,016	178	40,256	0,747	15,675	17,584
12	49,67	0,015	303	73,912	0,001	0,165	0,031

Cuadro D3. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 10g/L de extracto de levadura y 0g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,021	0	4,897	12,491	33,737	36,981
2	7	0,015	3	3,835	0,001	34,256	37,679
3	10	0,012	8	5,480	0,001	26,990	28,608
4	19,25	0,012	108	26,579	0,001	19,896	21,282
5	21,2	0,017	138	32,133	0,001	16,332	16,328
6	23,6	0,016	168	39,835	0,001	10,242	10,187
7	25,25	0,015	186	42,800	0,001	6,747	7,013
8	26,75	0,015	199	45,805	0,001	5,294	4,605
9	31	0,02	233	48,986	0,001	4,498	1,186
10	33	0,021	248	53,141	0,001	2,803	0,001
11	42,2	0,011	263	56,241	0,001	0,001	0,001
12	44,8	0,012	263	57,812	0,001	1,038	0,174

Cuadro D4. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 10g/L de extracto de levadura y 2g/L de sales de fosfato (R1).

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	3,594	6,246	28,547	29,480
2	1,25	0,013	0	3,594	0,001	33,218	31,050
3	6,3	0,011	0	4,553	0,001	29,585	30,178
4	10,3	0,016	12	6,370	0,001	33,045	31,399
5	20,75	0,017	117	28,458	0,001	17,993	18,700
6	22,8	0,016	146	33,516	0,001	13,080	12,560
7	24,8	0,013	171	36,909	0,001	12,249	10,257
8	28,5	0,02	215	51,289	0,001	7,958	3,070
9	29,9	0,021	230	53,151	0,001	6,574	0,768
10	34	0,017	265	61,458	0,001	0,706	0,001
11	44,2	0,014	270	58,725	0,001	0,035	0,006

Cuadro D5. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 10g/L de extracto de levadura y 2g/L de sales de fosfato (R2).

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,015	0	3,116	2,958	34,256	34,714
2	3,9	0,02	2	4,017	0,001	38,408	29,655
3	9,6	0,017	24	8,180	0,001	31,834	31,399
4	15	0,015	80	18,868	0,001	23,529	24,073
5	15,5	0,02	90	22,829	0,001	19,377	20,933
6	24,25	0,032	210	45,953	0,001	7,180	3,227
7	27,25	0,015	245	54,005	0,001	4,360	0,977
8	30,3	0,015	265	61,898	0,001	0,166	0,056
9	33	0,012	265	59,982	0,001	0,132	0,098

Cuadro D6. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 10g/L de extracto de levadura y 2g/L de sales de fosfato (R3).

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,015	0	2,999	1,315	41,004	42,912
2	17,1	0,016	115	29,813	0,001	28,720	29,655
3	18	0,015	130	29,901	0,986	21,972	24,771
4	18,5	0,017	140	34,673	0,001	22,837	21,282
5	19	0,02	147	32,972	0,001	19,516	20,793
6	22,25	0,017	192	44,483	0,001	15,779	12,839
7	23,5	0,016	209	46,280	0,001	15,017	11,443
8	25	0,016	225	53,482	0,001	13,010	8,513
9	39	0,015	315	72,558	0,001	1,495	0,070

Cuadro D7. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 10g/L de extracto de levadura y 2g/L de sales de fosfato (R4).

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,019	0	2,970	3,945	40,312	40,296
2	6	0,014	2	4,626	0,986	41,177	41,168
3	8,5	0,015	10	5,726	0,001	37,889	41,342
4	9,5	0,02	15	7,054	0,657	36,851	39,424
5	10,5	0,017	22	9,187	0,001	38,062	38,028
6	11,5	0,017	30	8,154	0,001	36,505	36,981
7	22,2	0,016	178	39,047	0,001	20,484	19,119
8	23	0,017	190	48,532	0,001	15,260	12,874
9	24	0,018	202	47,782	0,001	14,792	11,339
10	25	0,018	213	51,941	0,001	13,080	8,582
11	27,5	0,018	242	55,301	0,001	11,073	4,815
12	29,5	0,016	254	63,193	0,001	8,720	0,907
13	35	0,018	294	68,201	0,001	0,766	0,010
14	36	0,012	294	67,122	0,001	0,068	0,027

Cuadro D8. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 10g/L de extracto de levadura y 2g/L de sales de fosfato (R5).

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	2,210	0,592	37,024	38,726
2	10,6	0,025	25	9,020	0,001	30,450	33,493
3	13,25	0,017	49	18,022	0,001	30,796	33,841
4	16,5	0,02	93	24,691	0,001	25,606	28,259
5	17,5	0,018	105	26,330	0,001	25,260	27,387
6	18,5	0,03	125	30,382	0,001	21,453	22,747
7	20,67	0,015	154	37,581	0,001	19,654	19,677
8	22,2	0,035	174	44,586	0,001	16,055	14,932
9	34,25	0,016	290	67,746	0,001	4,775	1,430
10	36,5	0,019	305	67,425	0,001	0,346	0,070
11	38	0,015	305	67,314	0,001	0,044	0,013

Cuadro D9. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 17g/L de extracto de levadura y 0,65g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	2,028	0,986	35,467	35,935
2	5,3	0,022	1	2,601	0,001	30,623	31,225
3	17,3	0,017	103	31,122	0,001	22,664	24,247
4	18	0,018	113	29,168	0,001	24,360	24,980
5	19	0,013	126	31,796	0,001	22,145	21,212
6	20,5	0,012	152	40,893	0,001	18,962	18,142
7	21,5	0,02	169	44,735	0,001	12,768	10,780
8	23,5	0,012	196	48,120	0,001	15,156	11,722
9	25,75	0,017	230	54,303	0,001	12,249	6,489
10	31	0,019	286	63,044	0,001	5,363	0,209
11	32	0,023	296	68,617	0,001	2,491	0,001
12	43	0,018	307	68,966	0,001	0,028	0,042
13	44	0,013	308	69,532	0,000	0,138	0,076

Cuadro D10. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 17g/L de extracto de levadura y 3,35g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,017	0	7,460	0,329	40,658	42,564
2	3,75	0,014	0	7,015	0,001	38,547	39,829
3	9	0,014	5	9,701	0,657	34,775	37,505
4	11	0,015	16	12,185	0,657	37,197	39,249
5	12	0,015	25	14,151	0,001	36,505	37,679
6	12,5	0,019	30	15,003	0,001	36,678	40,121
7	13	0,016	36	15,036	0,001	37,370	39,424
8	22,8	0,014	190	45,754	0,001	18,408	14,095
9	24	0,013	210	50,892	0,001	13,702	8,513
10	26	0,014	236	60,884	0,001	14,118	6,803
11	33,25	0,012	317	78,346	0,001	3,253	0,001
12	49,25	0,015	324	75,883	0,001	0,029	0,012

Cuadro D11. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 10g/L de extracto de levadura y 4g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	3,656	0,789	37,197	34,365
2	10,8	0,016	19	9,556	0,001	29,585	32,272
3	13	0,013	40	14,334	0,001	28,893	31,050
4	14,75	0,02	68	20,258	0,001	22,318	23,375
5	18,75	0,017	140	31,071	0,001	14,533	17,305
6	20,5	0,015	168	37,800	0,001	12,561	10,676
7	22,5	0,02	200	47,958	0,001	9,827	6,559
8	24	0,023	222	51,936	0,001	7,405	2,651
9	33,8	0,015	272	60,410	0,001	0,042	0,056
10	36,5	0,012	273	61,121	0,001	0,028	0,001

Cuadro D12. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 20g/L de extracto de levadura y 2g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,024	0	5,496	0,657	34,948	35,063
2	6,5	0,012	4	6,695	0,001	33,737	34,888
3	9	0,015	10	7,447	0,001	32,526	34,539
4	21	0,022	182	49,896	1,775	12,042	10,362
5	22	0,024	202	53,285	0,001	8,789	7,047
6	23,25	0,015	238	58,871	0,001	7,336	4,256
7	24,33	0,017	245	63,020	0,001	5,502	1,151
8	25,6	0,021	265	65,125	0,001	3,142	0,265
9	29,75	0,015	274	66,032	0,001	1,413	0,696
10	33,5	0,017	280	66,386	0,001	0,031	0,003

Cuadro D13. Fermentación de un medio a base de jugo de piña al 80%v/v con 3g/L de extracto de levadura y 0,65g/L de sales de fosfato.

Muestra	Tiempo (h)	Volumen muestra (L)	Volumen NaOH acumulado (mL)	Ácido Láctico (g/L)	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)
1	0	0,02	0	2,672	1,644	31,834	30,876
2	9,33	0,024	14	8,735	0,001	30,796	28,085
3	12	0,015	35	14,006	0,001	26,471	29,306
4	13,75	0,02	52	18,227	0,001	25,087	27,736
5	17,25	0,016	104	30,112	0,001	19,516	21,212
6	19,2	0,019	130	35,525	0,001	12,976	15,804
7	22,58	0,015	168	40,065	0,001	9,343	10,257
8	33,6	0,015	250	53,126	0,001	1,495	0,614
9	37,75	0,017	255	55,093	0,001	0,055	0,001
10	43,5	0,014	255	56,944	0,001	0,017	0,003
11	47	0,011	255	57,094	0,001	0,015	0,010

Apéndice E: Análisis estadísticos

Cuadro E1. Prueba t para la productividad máxima de ácido láctico de las pruebas de hidrólisis enzimática del medio de cultivo con invertasa.

	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con invertasa</i>
Media	5,480933333	3,939366667
Varianza	0,059568693	0,005267443
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,032418068	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	10,48610915	
P(T<=t) una cola	0,000233766	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,000467532	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Cuadro E2. Prueba t para el rendimiento de ácido láctico de las pruebas de hidrólisis enzimática del medio de cultivo con invertasa.

	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con invertasa</i>
Media	84,40259525	98,47843154
Varianza	4,341041714	1,223187391
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	2,782114552	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-10,33552003	
P(T<=t) una cola	0,000247265	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,00049453	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Cuadro E3. Prueba t para la productividad total de ácido láctico de las pruebas de hidrólisis enzimática del medio de cultivo con invertasa.

	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con invertasa</i>
Media	5,427980754	4,345725034
Varianza	0,123274035	0,011871337
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,067572686	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	5,099057722	
P(T<=t) una cola	0,003493594	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,006987189	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Cuadro E4. Prueba t para el tiempo de fermentación de ácido láctico de las pruebas de hidrólisis enzimática del medio de cultivo con invertasa.

	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con invertasa</i>
Media	34,66666667	40,43333333
Varianza	0,333333333	1,963333333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1,148333333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-6,590775099	
P(T<=t) una cola	0,001372453	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,002744905	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Cuadro E5. Prueba t para la concentración de ácido láctico de las pruebas de hidrólisis enzimática del medio de cultivo con invertasa.

	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con invertasa</i>
Media	63,69064793	74,82033259
Varianza	5,70187963	7,728574243
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	6,715226936	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-5,260150161	
P(T<=t) una cola	0,003126929	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,006253857	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Cuadro E6. Prueba t para el porcentaje de azúcares consumidos en las pruebas de hidrólisis enzimática del medio de cultivo con invertasa.

	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con invertasa</i>
Media	78,98628824	99,9011886
Varianza	3,834331913	0,17444194
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	2,004386926	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-18,09300273	
P(T<=t) una cola	2,74338E-05	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	5,48675E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Cuadro E7. Prueba t para el tiempo de fase lag en las pruebas de hidrólisis enzimática del medio de cultivo con invertasa.

	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con invertasa</i>
Media	11,16666667	7,333333333
Varianza	0,583333333	0,333333333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,458333333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	6,934760925	
P(T<=t) una cola	0,001135186	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846782	
P(T<=t) dos colas	0,002270372	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Cuadro E8. Análisis de varianza del rendimiento de ácido láctico para las pruebas de contenido de jugo de piña en el medio de cultivo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	72,5886404	2	36,29432022	1,573741	0,282194664	5,1432528
Dentro de los grupos	138,374607	6	23,0624346			
Total	210,963248	8				

Cuadro E9. Análisis de varianza de la productividad máxima de ácido láctico en las pruebas de contenido de jugo de piña en el medio de cultivo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00698473	2	0,003492368	0,0618523	0,940613142	5,14325285
Dentro de los grupos	0,33877799	6	0,056462999			
Total	0,34576272	8				

Cuadro E10. Análisis de varianza y prueba Tukey para la productividad total de ácido láctico en las pruebas de contenido de jugo de piña en el medio de cultivo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,80052015	2	1,900260079	39,981504	0,000340031	5,14325285
Dentro de los grupos	0,28517086	6	0,047528478			
Total	4,08569102	8				

*Prueba Tukey-Kramer HSD (Q*3,06815)*

Abs(Dif)-LSD	60	80	100
60	-0,5301	-0,0508	1,0331
80	-0,0508	-0,5301	0,5537
100	1,0331	0,5537	-0,5301

Cuadro E11. Análisis de varianza y prueba Tukey de la concentración de ácido láctico en las pruebas de contenido de jugo de piña en el medio de cultivo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2384,31141	2	1192,155705	68,471057	7,3956E-05	5,14325285
Dentro de los grupos	104,466536	6	17,41108935			
Total	2488,77794	8				

*Prueba Tukey-Kramer HSD (Q*3,06815)*

Abs(Dif)-LSD	100	80	60
100	-8,380	9,813	27,325
80	9,813	-8,380	9,132
60	27,325	9,132	-8,380

Cuadro E12. Análisis de varianza y prueba Tukey del tiempo de fermentación para las pruebas de contenido de jugo de piña en el medio de cultivo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1562,84722	2	781,4236111	85,181680	3,93757E-05	5,14325285
Dentro de los grupos	55,0416666	6	9,173611111			
Total	1617,88888	8				

*Prueba Tukey-Kramer HSD (Q*3,06815)*

Abs(Dif)-LSD	100	80	60
100	-6,684	14,566	24,983
80	14,566	-6,684	3,733
60	24,983	3,733	-6,684

Cuadro E13. Análisis de varianza del tiempo de fase lag para las pruebas de contenido de jugo de piña en el medio de cultivo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	6,05555555	2	3,027777778	6,0555555	0,036359547	5,14325285
Dentro de los grupos	3	6	0,5			
Total	9,05555555	8				

*Prueba Tukey-Kramer HSD (Q*3,06815)*

Abs(Dif)-LSD	100	80	60
100	-1,7714	-0,9381	0,2286
80	-0,9381	-1,7714	-0,6047
60	0,2286	-0,6047	-1,7714

Cuadro E14. Análisis de varianza del porcentaje de consumo de azúcares para las pruebas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,08148234	2	0,04074117	1,7584939	0,25058508	5,14325285
Dentro de los grupos	0,1390093	6	0,02316822			
Total	0,22049164	8				

Cuadro E15. Análisis de varianza del modelo para la productividad total (g/h ácido láctico) de ácido láctico y prueba de falta de ajuste.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	F	Prob > F
Modelo	3	14,231345	4,74378	5,3271	0,022
Error	9	8,014559	0,89051		
C. Total	12	22,245904			
Falta de Ajuste	5	7,6778553	1,53557	18,2424	0,0074
Error Puro	4	0,3367035	0,08418		
Error Total	9	8,0145588			

$R^2=0,6397$

Cuadro E16. Coeficientes estimados para la productividad total de ácido láctico de *L.casei* sub. *rhamnosus*.

Coeficiente	Estimado	Error Estándar	t	Prob> t
Intercepto	1,7201446	1,23431	1,39	0,1969
E.L.	0,2210316	0,110547	2,00	0,0766
PO4	0,5263457	0,554559	0,95	0,3673
E.L.X PO4	-0,02141	0,049929	-0,43	0,6782

Cuadro E17. Análisis de varianza para la productividad máxima de *L.casei* sub. *rhamnosus* y prueba de falta de ajuste.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	F	Prob > F
Modelo	2	3,4978516	1,74893	5,736	0,0219
Error	10	3,049048	0,3049		
C. Total	12	6,5468996			
Falta de Ajuste	6	2,8864527	0,481075	11,8349	0,0159
Error Puro	4	0,1625953	0,040649		
Error Total	10	3,049048			

$R^2=0,5343$

Cuadro E18. Coeficientes estimados para la productividad máxima de ácido láctico de *L.casei* sub. *rhamnosus*.

Coeficiente	Estimado	Error Estándar	t	Prob> t
Intercepto	1,7327087	0,424519	4,08	0,0022
E.L.	0,089796	0,027748	3,24	0,0089
PO4	0,1411851	0,141214	1	0,3410

Cuadro E19. Análisis de varianza para el rendimiento de ácido láctico de *L.casei* sub. *rhamnosus*.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	F	Prob > F
Modelo	5	575,6144	115,123	0,9439	0,5079
Error	7	853,7452	121,964		
C. Total	12	1429,3596			

Cuadro E20. Análisis de varianza para la concentración de ácido láctico final de *L.casei* sub. *rhamnosus*.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	F	Prob > F
Modelo	5	276,83716	55,3674	0,9233	0,5180
Error	7	419,74888	59,9641		
C. Total	12	696,58604			

Cuadro E21. Análisis de varianza para el tiempo de fermentación de *L.casei* sub. *rhamnosus*

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	F	Prob > F
Modelo	5	12387,897	2477,58	2,6013	0,1224
Error	7	6667,026	952,43		
C. Total	12	19054,923			

Cuadro E22. Análisis de varianza para el tiempo de fase lag de *L.casei* sub. *rhamnosus* y prueba de falta de ajuste.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados	F	Prob > F
Modelo	5	241,67483	48,335	10,3682	0,0039
Error	7	32,63286	4,6618		
C. Total	12	274,30769			
Falta de Ajuste	3	27,932862	9,31095	7,9242	0,0370
Error Puro	4	4,7	1,175		
Error Total	7	32,632862			

$R^2=0,8810$

Cuadro E23. Coeficientes estimados para el tiempo de fase lag de las fermentaciones con *L.casei* sub. *rhamnosus*.

Coeficiente	Estimado	Error Estándar	t	Prob> t
Intercepto	11,059316	3,33385	3,32	0,0128
E.L.	-1,270436	0,415887	-3,05	0,0185
Fosfatos	2,4619675	2,100195	1,17	0,2794
E.L*E.L	0,0581646	0,016507	3,52	0,0097
Fosfatos*E.L	-0,238095	0,11424	-2,08	0,0756
Fosfatos*Fosfatos	0,3214728	0,418394	0,77	0,4674