

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**UTILIZACION DE BANANO DE RECHAZO PARA LA GENERACION  
DE ÁCIDO LÁCTICO A TRAVÉS DE UN PROCESO DE  
FERMENTACIÓN POR LOTE**

Tesis sometida a consideración del programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado de Magister Scientiae.

**Yanine Chan Blanco**

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" Costa Rica

2001

A Orlando José

## AGRADECIMIENTOS

A Ana Ruth Bonilla por toda la ayuda y horas extras brindada en la realización de este proyecto.

A Carmela Velásquez, por su orientación y guía a lo largo de toda esta investigación.

A Mónica Lois, por su apoyo, dedicación y orientación a lo largo del proyecto.

A Don Carlos Herrera, por su apoyo incondicional.

Al personal del Laboratorio de Microbiología y Química del CITA, por su apoyo y paciencia durante toda la realización de este proyecto.

A José Mejías, encargado del laboratorio de investigación de la EARTH, por todo su apoyo y colaboración.

A la EARTH, por ser quien me brindó la facilidad de poder llevar a cabo esta meta.

A Ceci, Hugo y Julieta, por trasnochar conmigo más de una vez.

A mi familia, que con su amor, apoyo y consejos me han ayudado a cumplir esta y otras metas.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Maestría en Ciencia de Alimentos.



---

M.Sc. Alicia Hernández Peñaranda  
Representante de la Decana del SEP



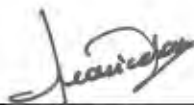
---

M.Sc. Ana Carmela Velázquez  
Directora del proyecto



---

M.Sc. Carlos Herrera Ramírez  
Asesor del proyecto



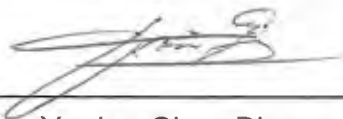
---

M.Sc. Mónica Lois Martínez  
Asesora del proyecto



---

M.Sc. Eric Wong González  
Director del Programa de Posgrado



---

Yanine Chan Blanco  
Candidata

## INDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
HOJA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR .....	iv
ÍNDICE GENERAL .....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN .....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	3
OBJETIVO GENERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
III. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 COMPOSICIÓN DEL BANANO .....	4
3.2 ÁCIDO LÁCTICO .....	6
3.3 MICROORGANISMOS LÁCTICOS .....	7
3.3.1 <i>Lactobacillus casei</i> .....	10
3.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO .....	11
3.4.1 Producción química de ácido láctico .....	11
3.4.2 Producción de ácido láctico por fermentación .....	11
3.5 FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA .....	14
3.6 SUSTRATOS DE FERMENTACIÓN .....	16
3.7 PROCESOS DE RECUPERACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO .....	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
4.1 UBICACIÓN DEL PROYECTO .....	19
4.2 MICROORGANISMO, MEDIO Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN Y ACTIVACIÓN .....	19
4.3 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL BANANO .....	19
4.4 MEDIOS DE FERMENTACIÓN .....	20
4.4.1 Precultivo .....	20
4.4.2 Tratamientos .....	20
4.5 PROCESOS FERMENTATIVOS .....	21
4.5.1 Cultivo .....	21
4.5.2 Equipo de fermentación .....	21

4.5.3	Variables de control .....	24
4.5.4	Periodicidad de la toma de muestra y volumen .....	24
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	24
4.6.1	Pretratamiento de la muestra .....	24
4.6.2	Determinación de azúcares y ácido láctico .....	25
4.7	MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	25
<b>V</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
5.1	EQUIPO DE FERMENTACIÓN .....	27
5.2	FERMENTACIÓN DEL TRATAMIENTO CONTROL .....	28
5.3	FERMENTACIÓN DEL BANANO DILUIDO .....	31
5.4	FERMENTACIÓN DEL BANANO DILUIDO ENRIQUECIDO ..	33
5.5	COMPARACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO GENERADO DURANTE LA FERMENTACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES SUSTRATOS .....	34
5.6	COMPARACIÓN DE GLUCOSA CONSUMIDA DURANTE LA FERMENTACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES SUSTRATOS .....	37
5.7	COMPARACIÓN DE FRUCTOSA CONSUMIDA DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LOS SUSTRATOS A BASE DE BANANO .....	38
5.8	COMPARACIÓN DE SACAROSA CONSUMIDA DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LOS SUSTRATOS A BASE DE BANANO .....	39
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>VII</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>43</b>
<b>VIII</b>	<b>APÉNDICES</b> .....	<b>47</b>
	APÉNDICE A. RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES DE LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS .....	48
	APÉNDICE B. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	53

## INDICE DE CUADROS

		<b>Página</b>
CUADRO 1.	Caracterización fisicoquímica del banano según el grado de Madurez (Carta de Maduración del Banano, DOLE) .....	4
CUADRO 2.	Composición química de banano maduro fresco.....	5
CUADRO 3.	Aplicaciones en alimentos del ácido láctico y sus derivados.	7
CUADRO 4.	Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas y configuraciones de ácidos lácticos que producen. ....	10
CUADRO 5.	Composición de los medios de fermentación utilizados .....	21
CUADRO 6.	Comparación de la eficiencia de la fermentación de los diferentes sustratos evaluados .....	36
CUADRO A 1.	Determinación de la absorbancia durante el tiempo en la fermentación del medio control .....	48
CUADRO A 2.	Comparación de la generación de ácido láctico en los tres tratamientos evaluados.....	49
CUADRO A 3.	Comparación del consumo de glucosa en los tres tratamientos evaluados .....	50
CUADRO A 4.	Comparación del consumo de fructosa en los dos tratamiento utilizando banano como sustrato.....	51
CUADRO A 5.	Comparación del consumo de sacarosa en los dos tratamiento utilizando banano como sustrato.....	52
CUADRO B 1.	Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable ácido láctico.....	53
CUADRO B 2.	Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable glucosa.....	53
CUADRO B 3.	Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable fructosa .....	54
CUADRO B 4.	Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable sacarosa .....	54

## INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Esquema de los intermediarios involucrados en la glicólisis para la obtención de ácido láctico.....	13
FIGURA 2. Fermentación heteroláctica de las bifidobacterias mostrando la partición fosforolítica en fructuosa - 6 - fosfato.....	14
FIGURA 3. Típica curva de fermentación láctica tipo lote (Fuente: Velázquez, 1998).....	16
FIGURA 4. Recuperación y purificación del ácido láctico producido en un proceso de fermentación.....	18
FIGURA 5. Diagrama de flujo del proceso de preparación de los tratamientos para el proceso de fermentación.....	20
FIGURA 6. Diagrama esquemático del sistema de fermentación en lote utilizado.....	23
FIGURA 7. Curva de crecimiento del <i>L. casei</i> en un sistema de fermentación por lote utilizando el medio control.....	28
FIGURA 8. Producción de ácido láctico y consumo de glucosa en la fermentación por lote utilizando el medio control inoculado con <i>L. casei</i> .....	30
FIGURA 9. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares en una fermentación por lote utilizando banano diluido (1:4) inoculado con <i>L. casei</i> .....	32
FIGURA 10. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares en una fermentación por lote utilizando banano diluido enriquecido inoculado con <i>L. casei</i> .....	34
FIGURA 11. Producción de ácido láctico en el proceso de fermentación con <i>L. casei</i> en los tres sustratos evaluados.....	37
FIGURA 12. Consumo de glucosa en el proceso de fermentación con <i>L. casei</i> en los tres sustratos evaluados.....	38
FIGURA 13. Consumo de fructosa en el proceso de fermentación con <i>L. casei</i> utilizando como sustrato banano diluido y banano enriquecido.....	39



FIGURA 14. Consumo de sacarosa en el proceso de fermentación con <i>L. casei</i> utilizando como sustrato banano diluido y banano enriquecido.....	40
--	----

## RESUMEN

*Chan Blanco, Yanine. Utilización de banano de rechazo para la generación de ácido láctico a través de un proceso de fermentación por lote. Tesis Maestría en Ciencia de Alimentos.-San José, C.R.:Y. Chan B., 2001. 54h. 26 refs.*

El presente proyecto se realizó con el objetivo de evaluar la utilidad del banano de rechazo para la generación de ácido láctico a través de un proceso de fermentación por lote utilizando *Lactobacillus casei*. Se adaptó un equipo de fermentación que permitiera trabajar asépticamente y se utilizaron tres tratamientos con sustratos diferentes: un tratamiento control utilizando un sustrato adecuado para el crecimiento del *L. casei*, banano diluido (1 parte pulpa banano y 4 partes de agua) y banano diluido pero enriquecido con sales y aminoácidos.

Para cada tratamiento, se compararon los procesos de fermentación en el tiempo, se evaluó la productividad máxima y rendimiento de ácido láctico generado y el porcentaje de consumo de glucosa, fructosa y sacarosa. Al evaluar el comportamiento de la fermentación en el tiempo, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tres tratamientos para cada una de las variables analizadas (generación de ácido láctico, consumo de glucosa, fructosa y sacarosa). La productividad máxima obtenida en el medio control fue de 1,48 g/L/hr, para el banano diluido fue de 0,13 g/L/hr y para el banano diluido enriquecido fue de 1,49 g/L/hr, no mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control y el banano enriquecido. El consumo de glucosa en el medio control y en el medio con banano diluido enriquecido, evidenció que el *L. casei* hizo un mayor uso de este sustrato que en el medio con banano diluido. Con respecto al consumo de fructosa en los tratamientos con banano, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en ambos, siendo mejor el tratamiento enriquecido. El consumo de sacarosa no fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) en ambos tratamientos, probablemente por el tiempo que se mantuvo la fermentación.

Se encontró que el banano diluido no es un buen sustrato para el *L. casei*, probablemente por la deficiencia de nutrientes requeridos por éste, por lo que al enriquecerlo, la generación de ácido láctico aumentó significativamente; sin embargo, su rendimiento total no llegó a ser tan eficiente como el medio control.

**Palabras claves:** *Lactobacillus casei*; ácido láctico; banano; fermentación.

**Directora de tesis:** M. Sc. Ana Carmela Velázquez Carrillo.

**Unidad académica:** Sistema de Estudios de Posgrado/ Maestría en Ciencia de Alimentos.

## I. INTRODUCCION

El ser humano en su afán de satisfacer sus necesidades de alimentación demanda día con día una gran cantidad y variedad de alimentos. En el proceso productivo de dichos alimentos, ya sea como materia prima o producto terminado, se generan una alta cantidad de remanentes que en algunos casos representan un alto porcentaje. Esos remanentes en la actualidad están representando un problema para la ecológico, ya que se acumulan y generan contaminación.

En Costa Rica, el banano representa la segunda fuente de divisas para la economía nacional, lo que para 1999 representó más de \$600 millones. Sin embargo, la producción bananera exportable cayó en los primeros tres meses de este año un 8,5% comparada con el mismo periodo del año pasado, esto debido tanto a condiciones climáticas, como a las condiciones dominantes en cuanto a los bajos precios en los mercados internacionales y la sobre oferta del producto; ocasionando una crisis en el sector que hace necesario buscar nuevas alternativas para mejorar la realidad bananera de Costa Rica (CORBANA, 2001),

Se estima que en Costa Rica alrededor de 50000 hectáreas de banano están sembradas, de las cuales se cosecha alrededor de 48 toneladas de banano por hectárea, equivalentes a una producción de 2400000 toneladas anuales (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2001; CORBANA, 2001). Si se considera que alrededor de un 8% de la cosecha es banano de rechazo, se está en presencia de 192000 toneladas anuales de desecho de banano, esto sin tomar en cuenta el rechazo en el campo que se estima en un 6% (Araya *et al*, 1995).

Se denomina banano de rechazo a todo aquel fruto que no reúne las cualidades internas y externas organolépticas para ser aceptado en el mercado internacional. Generalmente se clasifica como banano de rechazo a banano pequeño, con manchas y pintas en la cáscara o con algún daño mecánico (Araya *et al*, 1995).

Esta fruta, aunque en buen estado, no es apta para la exportación, pero puede ser utilizada para elaborar otros subproductos como puré de banano o comercializarla dentro del país como fruta fresca. Sin embargo, aunque ya se les esté dando un valor agregado a estos remanentes de la exportación, aún se presentan desechos que no son utilizados.

Además de los desechos propios de la comercialización del banano, la problemática que atraviesa el agro y en especial el sector bananero de nuestro país, debido a la dependencia de los mercados internacionales, ha hecho que el precio de esta fruta disminuya a valores tales que estén poniendo a las grandes y pequeñas compañías bananeras en una situación de crisis que ha provocado en algunos casos, el cierre de fincas lo cual acarrea una problemática laboral, social y económica palpable en Costa Rica (CORBANA, 2001; Barquero, 2001).

En vista de lo anterior, se plantea la necesidad de utilizar el banano no solo como un producto fresco que se comercializa en el exterior, sino como materia prima para generar una serie de subproductos con mayor valor agregado y que le permita al productor diversificar su cosecha y obtener mayores ingresos por la misma.

Una de estas alternativas es aprovechar el banano como un sustrato para generar ácido láctico a través de un proceso de fermentación láctica. Bozoglu y Ray (1996) reportan que el ácido láctico es utilizado en la industria como materia prima para una gran cantidad de procesos: en la industria de alimentos se utiliza como saborizante y acidulante; en la industria del plástico es utilizado para generar un polímero (ácido poliláctico) biodegradable; en la industria farmacéutica se usa como producto intermedio para la manufactura de cosméticos, acidulante y la elaboración de polímeros biodegradables. De esta forma, se estaría aprovechando un desecho para generar un producto de interés comercial, lo que representa un paso hacia la sostenibilidad del agro y la industria.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el proceso de obtención de ácido láctico a partir de los remanentes de la producción de banano de exportación a través de una fermentación láctica por lote.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Adaptar el equipo y obtener un sistema que cumpla con los requerimientos del proceso de fermentación a realizar.
- Evaluar el desempeño de una fermentación láctica utilizando banano como sustrato.
- Evaluar el efecto de la adición de sales minerales y proteínas en dicha fermentación.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 COMPOSICIÓN DEL BANANO

El banano es una fruta que según su grado de madurez, presenta diferente composición fisicoquímica. De acuerdo a Hulme (1971) y Soto (1992), durante el proceso de maduración, el cambio más significativo que ocurre es la reducción del almidón presente (20 – 25% en la pulpa) debido a la hidrólisis enzimática que sufre, produciendo azúcares simples cuya concentración aumenta durante el proceso. Este aumento de azúcares simples en el proceso de maduración, hacen del banano una de las frutas con mayor contenido de azúcares. El siguiente cuadro ilustra estos cambios durante la maduración.

CUADRO 1. Caracterización fisicoquímica del banano según el grado de madurez (Carta de Maduración del Banano, DOLE)

Características	Grado de madurez						
	1	2	3	4	5	6	7
Color de cáscara	Verde	Verde con trazas de amarillo	Más verde que amarillo	Más amarillo que verde	Amarillo con extremos verdes	Totalmente amarillo	Totalmente amarillo con pecas
% almidón	17.73	13.68	8.76	4.96	2.65	1.73	0.82
% azúcares totales	1.32	3.21	6.57	11.26	16.18	19.50	19.71
% azúcares reductores	0.57	1.50	3.27	5.86	8.60	10.40	10.32
Sólidos solubles (°Brix)	4.69	7.28	12.48	17.78	20.81	22.10	22.61
PH	5.24	5.02	4.87	4.77	4.75	4.78	4.88
Acidez (%ácido málico)	0.41	0.54	0.63	0.67	0.67	0.62	0.52
Razón (pulpa/cáscara)	1.37	1.45	1.53	1.61	1.69	1.78	1.96
% humedad	72.00	72.32	72.64	72.97	73.28	73.61	73.92

Fuente: Araya, 1995

CUADRO 2. Composición química de banano maduro fresco.

COMPOSICIÓN	CANTIDAD en 100 g según Department of Agriculture Malaysia, 1999	CANTIDAD en 100 g según McArdle et al, 1996
Calorías	103 kcal	92 kcal
Proteína	1.3 g	1.031 g
Grasa	0.4 g	0.48 g
Carbohidratos	23.6 g	23.3 g
Ca	11.0 mg	6.13 mg
Fe	0.6 mg	0.35 mg
B <sub>1</sub>	0.07 mg	0.05 mg
B <sub>2</sub>	0.08 mg	0.099 mg
Fibra	0.5 g	2.04 g
Colesterol	---	0 mg
Humedad	73.3 g	---
Cenizas	0.9 g	---
Fósforo	28.0 mg	---
Sodio	29.0 mg	---
Potasio	241.0 mg	---
Caroteno	300 µg	---
Niacina	0.7 mg	---
Ácido ascórbico	17.3 mg	---

Como se muestra en el cuadro anterior, el componente que se encuentra en mayor concentración después del agua, son los carbohidratos, los cuales en su gran mayoría son azúcares sencillos (glucosa, fructosa y sacarosa). Estos tres azúcares incrementan su contenido en el proceso de maduración del fruto, manteniendo proporciones de 66% de sacarosa, 20% de glucosa y 16% de fructosa. (Hulme, 1971)

Esta alta proporción de azúcares, representan un sustrato adecuado para los microorganismos utilizados en los procesos de fermentación. Esto sugiere la posibilidad de utilizar el banano como medio de fermentación para la obtención de subproductos de dicha reacción biológica, uno de los cuales es el ácido láctico, que tiene una gran cantidad de aplicaciones en la industria.



### 3.2 ACIDO LACTICO

El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico o ácido  $\alpha$ -hidroxipropanoico) es utilizado como preservante en leches fermentadas, frutas, vegetales, carnes y panes. Fue descubierto en 1780 por Carl Wilheelm Scheele y llamado "ácido de la leche" (Litchfield, 1996).

Es un ácido orgánico que puede ser producido por fermentación o por síntesis química. Es un compuesto pequeño desde el punto de vista molecular que presenta actividad óptica por la presencia de los isómeros L(+) y D(-). El isómero L(+) está presente en los sistemas mamarios y es el más fácilmente asimilable por el organismo humano, mientras que en el sistema bacteriano es posible encontrar tanto el L(+) como el L(-) (Velázquez, 1998; Bozoglu y Ray, 1996).

Desde el punto de vista comercial, el ácido láctico se puede encontrar en el mercado en diferentes grados, 50, 80 y 88% UPS, siendo el de 88% de purificación el que es utilizado en la industria alimentaria, farmacéutica e industrial (Litchfield, 1996).

El mayor uso que se le ha dado al ácido láctico y sus derivados es como aditivos alimentarios. El Cuadro 3 muestra los usos comunes que tiene este aditivo.

En la industria, otro uso importante del ácido láctico es la obtención de ácidos polilácticos que pueden ser preparados de ambos monómeros. También se utilizan en la formación de biopolímeros con ácido láctico y ácido glicólico, los cuales son compatibles y biodegradables. Estos son utilizados en la industria farmacéutica para poner implantes, hilos de sutura y otros materiales médicos que luego son degradados por el cuerpo. (Bozoglu y Ray, 1996)

En la industria de los polímeros también ha tenido gran importancia la generación de biopolímeros degradables sobre todo en el manejo de remanentes

sólidos. En los últimos años, ha empezado a tener mucho auge la generación de plásticos biodegradables para ser utilizados en la industria como contenedores para alimentos, bolsas de basura, ropas medicinales, productos higiénicos, cuerdas, etc. (Litchfield, 1996).

CUADRO 3. Aplicaciones en alimentos del ácido láctico y sus derivados

Compuesto	Aplicaciones en alimentos	Código de Regulación Federal USA
L(+) ácido láctico D(-) ácido láctico DL ácido láctico	Agente antimicrobiano, saborizante, curado y curtido, controlador de pH, solvente y vehículo, resaltador	21 CFR 184.1061
Lactato de calcio	Resaltador de sabor, agente de firmeza, agente estabilizador, suplemento nutritivo, espesante	21 CFR 184.1207
Lactato ferroso	Suplemento nutritivo y en fórmula para infantes	21 CFR 184.1311
Lactato de potasio	Resaltador de sabor, saborizante, humectante, controlador del pH.	21 CFR 184.1639
Lactato de sodio	Resaltador de sabor, saborizante, humectante, controlador de pH, emulsificante.	21 CFR 184.1768

Fuente: (Litchfield, 1996)

### 3.3 MICROORGANISMOS LÁCTICOS

Los microorganismos que convierten carbohidratos a ácido láctico son muy numerosos. Según el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1986), se clasifica a las bacterias ácido lácticas en los siguientes tres grupos:

- Grupo 17: gram positivas cocci: *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Saccharococcus sp.*, *Streptococcus spp.*
- Grupo 18: bastones formadores de endosporas gram positivas y cocci: *Bacillus spp.*, *Sporolactobacillus sp.*
- Grupo 19: bastones regulares no esporulados gram positivos: *Lactobacillus spp.*

Existe una serie de factores que afecta el crecimiento y supervivencia de las bacterias ácido lácticas y por ende el proceso de fermentación, a saber:

**Requerimientos nutricionales:** Los *Lactobacillus* son organismos extremadamente fastidiosos, adaptados a un sustrato orgánico muy complejo en cuanto a nutrientes. Con respecto a los requerimientos de carbohidratos fermentables, la glucosa y sacarosa son la materia prima preferida por las bacterias ácido lácticas; también son utilizadas otras fuentes de carbohidratos como maltosa derivada del almidón hidrolizado de maíz o papa, o bien sacarosa de la caña y lactosa del suero lácteo. Las bacterias ácido lácticas son débilmente proteolíticas y lipolíticas (Velázquez, 1998 y Bozoglu y Ray, 1996).

Los *Lactobacillus* requieren aminoácidos preformados, péptidos, ácidos nucleicos, vitaminas del complejo B, ácidos grasos y bases púricas y pirimidínicas para su crecimiento y generación de ácido láctico.

Algunos alimentos en forma natural contienen compuestos antimicrobianos que afectan el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. Compuestos como los polifenoles pueden afectar significativamente el desarrollo del *L. plantarum* (Bozoglu y Ray, 1996).

**Requerimientos de oxígeno:** Las bacterias ácido lácticas son anaerobias facultativas o microaerófilas, desde el punto de vista del requerimiento de oxígeno. Los ambientes con presencia de oxígeno pueden ser tóxicos para algunas especies de *Lactobacillus*, por lo que siempre debe ser eliminado del proceso de fermentación (Velázquez, 1998).

**Efecto de la temperatura:** La gran mayoría son mesófilas (37 - 42°C), aunque unas son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 5°C y otras a temperaturas tan altas como 45°C.

Los procesos de pasteurización son usualmente suficientes para inactivar todos los tipos de bacterias ácido lácticas; sólo especies muy específicas (*Enterococcus faecalis*) requieren tratamientos térmicos tan fuertes como 70°C por 3 minutos para inactivarlas (Bozoglu y Ray, 1996).

**Efecto del pH:** Con respecto a su pH de crecimiento, la mayoría crecen a pH entre 4,0 - 4,5, aunque algunas son capaces de crecer a pH bajos como 3,2 y otras a pH altos como 9,6. El pH es usualmente controlado con la adición de hidróxido de amonio dada la capacidad de los cultivos de usar el amonio como fuente de nutrientes (fuente de nitrógeno) (Jay, 1994; Velázquez, 1998).

Estos microorganismos crecen bien en un medio cuyo pH inicial esté entre 4.5 - 6.5. Cuando el pH decrece entre 3.6 - 4.0, el crecimiento del microorganismo se ve afectado (Sneath, 1986).

Algunas bacterias ácido lácticas son susceptibles a la presencia de ácido acético, por lo que debe ser controlado en procesos de fermentación donde hay un gran contenido de carbohidratos (Bozoglu y Ray, 1996).

**Requerimientos de agitación:** La agitación no tiene un efecto importante en el proceso de fermentación láctica. (Velázquez, 1998; Karras, 1994)

CUADRO 4. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas y configuraciones de ácidos lácticos que producen.

Bacteria	Tipo de fermentación	Enantiómero ácido láctico
<i>Bacillus</i>		
<i>B. coagulans</i>	Facultativo/heterofermentativo	L(+)
<i>B. laevolacticus</i>	Facultativo/heterofermentativo	D(-)
<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i>	Homofermentativo	D/L
<i>L. agilis</i>	Heterofermentativo	L(+)
<i>L. amylovorus</i>	Homofermentativo	D/L
<i>L. delbrueckii</i>	Homofermentativo	D(-)
<i>L. brevis</i>	Heterofermentativo	D/L
<i>L. bulgaricus</i>	Homofermentativo	D(-)
<i>L. casei</i>	Homofermentativo	L(+)
<i>L. plantarum</i>	Homofermentativo	D/L
<i>L. lactis</i>	Homofermentativo	D(-)
<i>L. fermentum</i>	Heterofermentativo	D/L
<i>Leuconostoc</i>		
<i>L. cremoris</i>	Heterofermentativo	D(-)
<i>L. mesenteroides</i>	Heterofermentativo	D(-)
<i>L. dextranicum</i>	Heterofermentativo	D(-)
<i>L. lactis</i>	Heterofermentativo	D(-)
<i>Streptococcus</i>		
<i>S. faecalis</i>	Homofermentativo	L(+)
<i>S. lactis</i>	Homofermentativo	L(+)
<i>Sporolactobacillus</i>		
<i>S. inulinus</i>	Homofermentativo	D(-)

Fuente: Velázquez, 1998; Litchfield, 1996; Jay, 1994

### 3.3.1 *Lactobacillus casei*

Según el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986), esta bacteria ácido láctica presenta forma de bastón, generalmente de 0.7-1.1x2.0-4.0  $\mu\text{m}$ , a menudo con un ángulo recto terminal y tendencia a formar cadenas. No crece a temperaturas mayores de 45°C y es considerada una bacteria homofermentativa (Ver Cuadro 4).

Sus factores de crecimiento son los siguientes: riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio y niacina son esenciales; piridoxal o piridoxamina es esencial o estimulador, mientras que la tiamina, vitamina B<sub>12</sub> y timidina no son requeridas.

Existen 4 subespecies de *L. casei*: *L. casei* subesp. **casei**, *L. casei* subesp. **pseudopantarum**, *L. casei* subesp. **rhamnosus** y *L. casei* subesp. **tolerans**.

### 3.4 PRODUCCION DE ACIDO LACTICO

#### 3.4.1 Producción química de ácido láctico

El ácido láctico puede ser producido químicamente utilizando como materia prima carbón, petróleo y gas natural. Este proceso químico permite obtener sólo la mezcla racémica del D(-) y L(+) ácido láctico. El proceso comercial de obtención de este producto se basa en la síntesis del acrilonitrilo, que es producido por la reacción del acetaldehído y el cianuro de hidrógeno; posteriormente es recobrado y purificado por destilación e hidrolizado a ácido láctico utilizando ácido sulfúrico concentrado. El ácido láctico crudo es esterificado con metanol produciendo metil lactato, el cual es recobrado, purificado por destilación e hidrolizado con agua bajo catálisis ácida para producir finalmente el ácido láctico (Velázquez, 1998).

#### 3.4.2 Producción de ácido láctico por fermentación

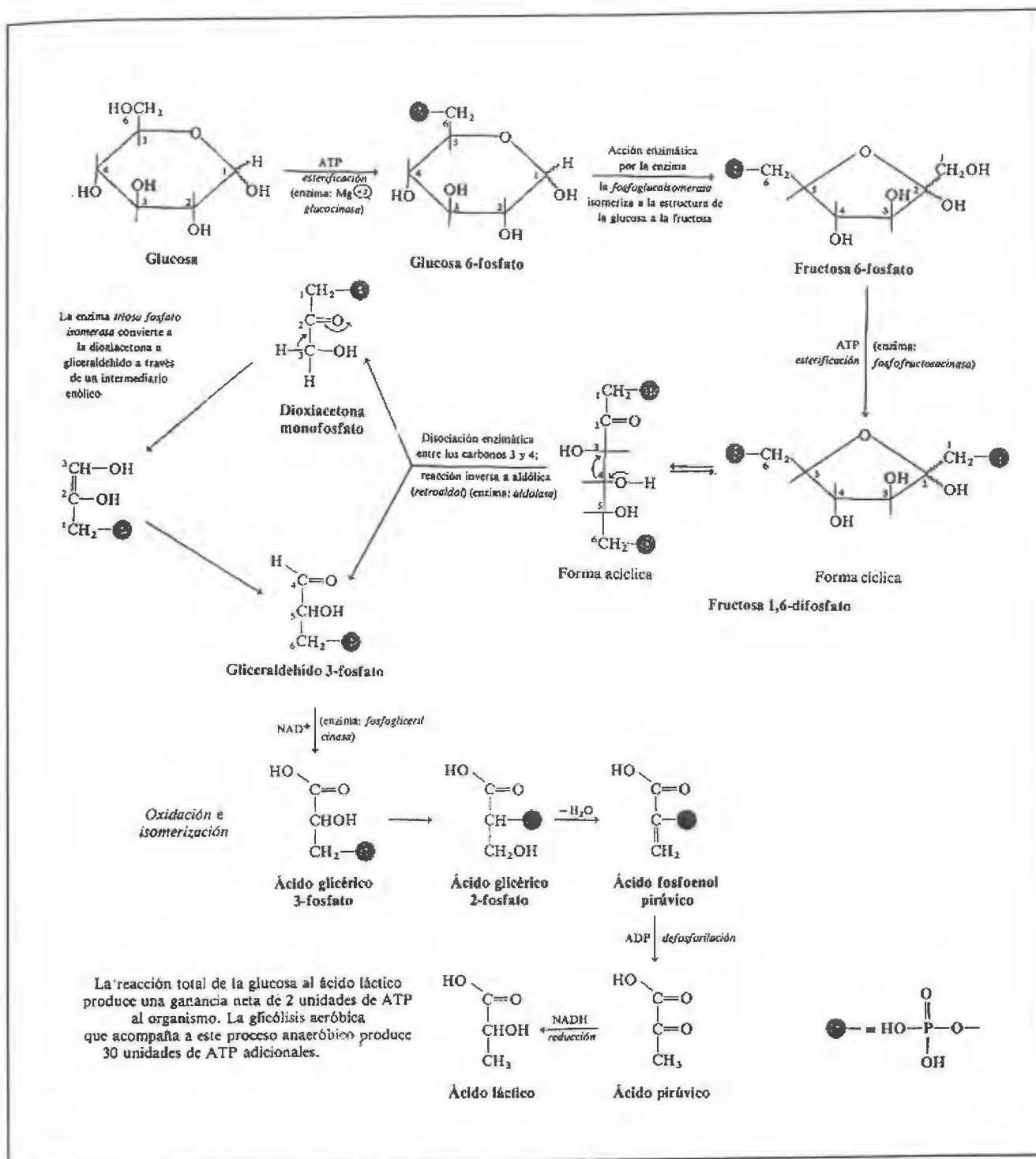
Son tres las vías de producción de ácido láctico: la homofermentativa, la heterofermentativa y la de las bifidobacterias.

**Homofermentativas:** producen ácido láctico como producto principal de la fermentación, sin otros productos metabólicos como ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, cetonas o dióxido de carbono. En este proceso la glucosa es degradada por la vía Embden-Meyerhof-Parnas o glicólisis a dos moléculas de piruvato (Figura 1). El piruvato es usado directamente como aceptor de equivalentes reductores del NADH<sub>2</sub> producidos durante la glicólisis, dando como resultado dos moles de ácido

láctico y dos moléculas de ATP por cada mol de glucosa (Litchfield, 1996; Gottschalk, 1986).

**Heterofermentativas:** produce ácido láctico junto con otros compuestos orgánicos y dióxido de carbono. Este proceso involucra primero la transformación de glucosa a través de la vía de la pentosas fosfato para producir ribulosa-5-fosfato, vía 6-fosfogluconato. La producción de xilosa-5-fosfato, la cual es fraccionada en gliceraldehido-3-fosfato y acetyl fosfato por la fosfocetolasa. El acetyl fosfato es convertido a acetyl CoA por la fosfotranscetilasa con la subsecuente reducción a acetaldehido y etanol. El gliceraldehido-3-fosfato formado en la reacción con la fosfocetolasa es convertido a lactato como en la vías homofermentativa. Durante la reacción 2 NADH son formados y consumidos. Se produce 1 ATP por mol de glucosa, lo cual representa la mitad de lo que se produce en la vía homofermentativa (Velázquez, 1998; Gottschalk, 1986).

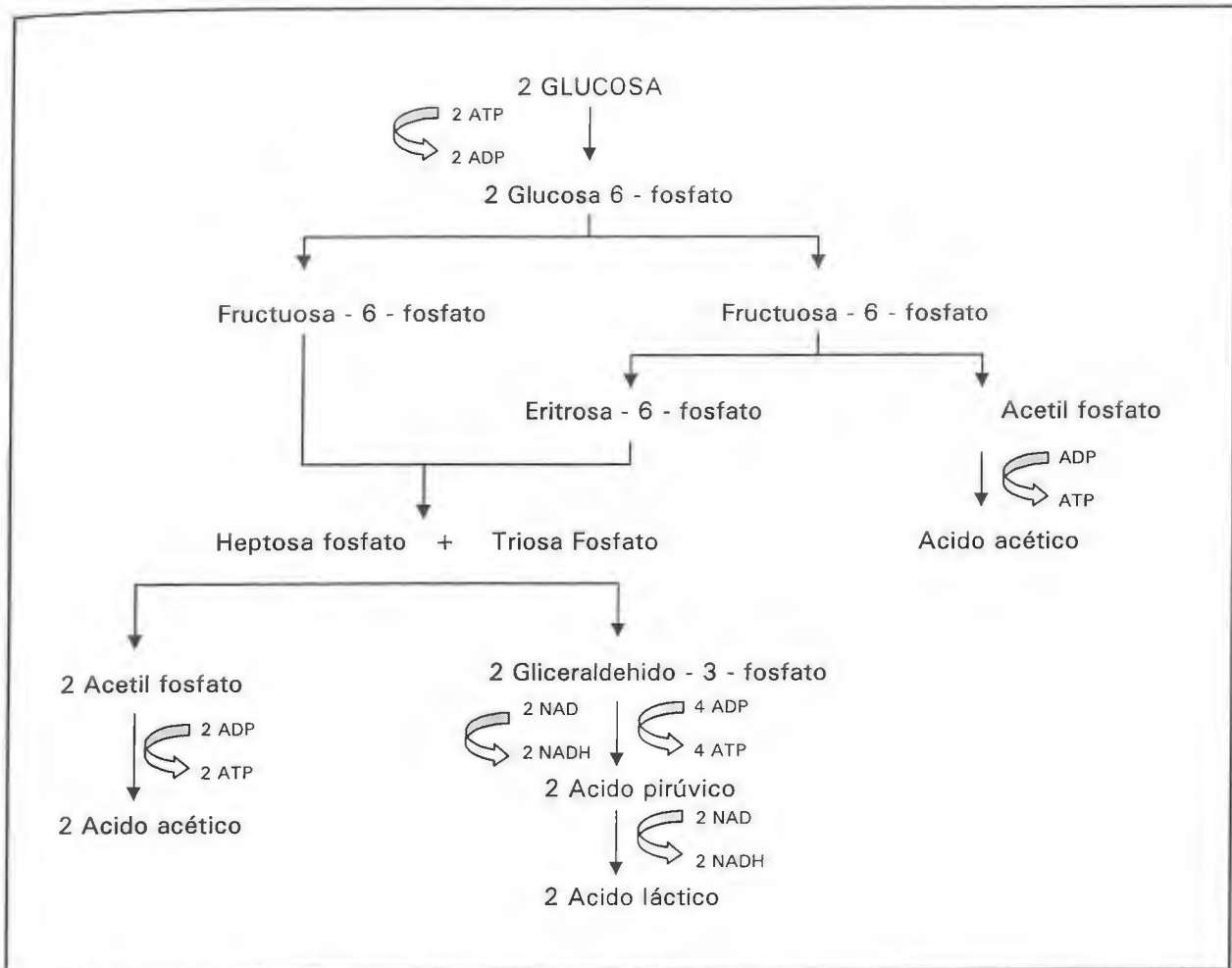
**Bifidobacterias:** La vía de las bifidobacterias a través de una fermentación heteroláctica genera como productos finales acetato y lactato en una razón de 3 a 2, como un resultado del catabolismo de 2 moles de glucosa (ver Figura 2) (Marshall and Tamime, 1997; Gottschalk, 1986).



Fuente: Wingrove, 1984

FIGURA 1. Esquema de los intermediarios involucrados en la glicólisis para la obtención de ácido láctico.





Fuente: Marshall and Tamime, 1997

FIGURA 2. Fermentación heteroláctica de las bifidobacterias mostrando la partición fosforolítica en fructuosa - 6 - fosfato.

### 3.5 FERMENTACION ACIDO LACTICA

Los tipos de procesos de fermentación condicionan directamente la producción de ácido láctico. Dicha fermentación láctica se puede llevar a cabo por procesos de lote, de lote alimentado y continuos. Además, se deben tomar en cuenta variables como el tipo de microorganismos, especies, tamaño del inóculo, requerimiento nutricional, temperatura, pH, concentración y pretratamiento del sustrato, presencia o ausencia de contaminantes competitivos, grado de esterilidad del medio, presencia de bacteriófagos y la inhibición del microorganismo por el

incremento en la concentración del ácido láctico y la generación de compuestos tóxicos como furfural y hidroximetilfurfural. Otro factor que se debe controlar es la presencia o ausencia de oxígeno cuando el proceso lo requiera (Litchfield, 1996).

A nivel comercial, la producción de ácido láctico se realiza generalmente por una fermentación en lote, ya que se puede tener mejor control del proceso.

**Fermentación por lote:** Este tipo de fermentación es considerado un sistema cerrado, en donde una vez iniciado el proceso no se adiciona ni elimina ningún compuesto. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos generalmente cambia constantemente como un resultado del metabolismo de las células. Después de la inoculación, se observan las cuatro fases típicas de crecimiento (Figura 3): fase lag, fase log, fase estacionaria y fase de muerte (Crueger , 1993).

Durante la fermentación de este tipo, la dependencia de la formación del producto en energía sigue una combinación de tipo I, cuando el producto es derivado directamente de un metabolismo primario usando la energía de producción, y de tipo II, cuando el producto es derivado del sustrato usado para el metabolismo primario, pero la producción sigue una vía secundaria que está separada del metabolismo primario (Crueger, 1993).

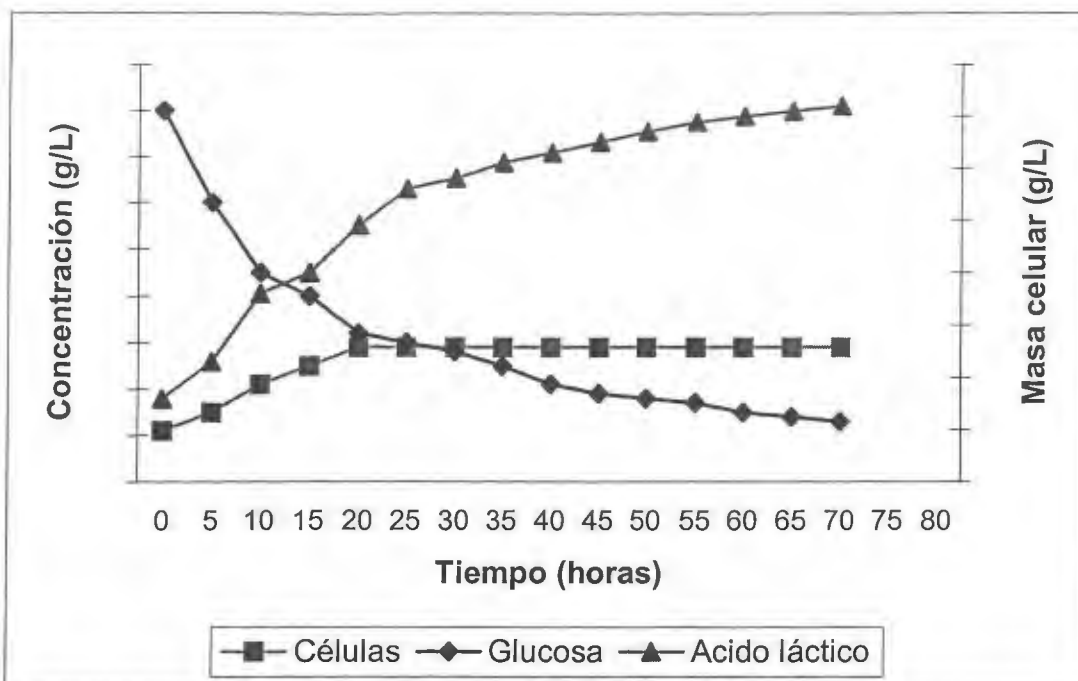


FIGURA 3. Típica curva de fermentación láctica tipo lote. (Fuente: Velázquez, 1998)

### 3.6 SUSTRATOS DE FERMENTACIÓN

Es posible utilizar una gran variedad de sustratos para la obtención de ácido láctico a través de un proceso de fermentación. Carbohidratos refinados como glucosa, lactosa, sacarosa y almidón son altamente utilizados, sin embargo, existen otro tipo de sustratos más complejo como celulosa, arroz, maíz, papa, suero lácteo y melaza entre otros, que también han sido usados en la obtención de ácido láctico (Litchfield, 1996).

La glucosa o sacarosa son los sustratos preferidos para la obtención de ácido láctico a través de procesos de fermentación comerciales, esto debido principalmente a costos, disponibilidad, pureza y facilidad para recuperar el producto final. En Estados Unidos, se utiliza glucosa obtenida de la hidrólisis ácida o enzimática de almidón de maíz como sustrato de fermentación a nivel comercial.

Países como Brasil y Europa han usado sacarosa (azúcar de caña o remolacha) debido a la disponibilidad de estos sustratos en sus regiones. (Litchfield, 1996).

### 3.7 PROCESOS DE RECUPERACION DEL ACIDO LACTICO

El ácido láctico utilizado en la manufactura de aditivos alimentarios, derivados plásticos o para aplicaciones médicas, debe estar libre de impurezas como residuos de azúcares. También deben ser eliminados los productos de la reacción de Maillard entre carbohidratos y aminoácidos, otros ácidos orgánicos, compuestos orgánicos nitrogenados y metales pesados. Esto hace que el proceso de recuperación y purificación pueda ser bastante complejo. (Litchfield, 1996)

Dependiendo de su uso así será el grado de purificación. Se conocen tres grados de purificación: técnico, para alimentos (FCC) y farmacéutico (USP), siendo el último el de mayor grado de pureza. (Velázquez, 1998)

Lo primero que se debe hacer en el proceso de recuperar el ácido láctico generado en un proceso de fermentación, es aumentar la temperatura del producto de la fermentación entre 80 - 100°C e incrementar el pH entre 10 – 11, basificando con hidróxido de calcio. Esto hace que los microorganismos mueran, se coagule la proteína, se degraden algunos residuos de azúcares y se solubilice el lactato de calcio. Posteriormente el líquido es decantado y filtrado, eliminando de esta forma la proteína coagulada y las células, produciendo un extracto crudo del lactato de calcio, el cual puede ser procesado utilizando las siguientes técnicas:

- Precipitación y acidificación (filtración, tratamiento con carbón y evaporación)
- Centrifugación y microfiltración/ultrafiltración
- Destilación
- Intercambio iónico y adsorción
- Extracción con solventes y fermentación extractiva

La siguiente figura ilustra las diferentes formas en que se puede recobrar y purificar el ácido láctico obtenido en un proceso de fermentación.

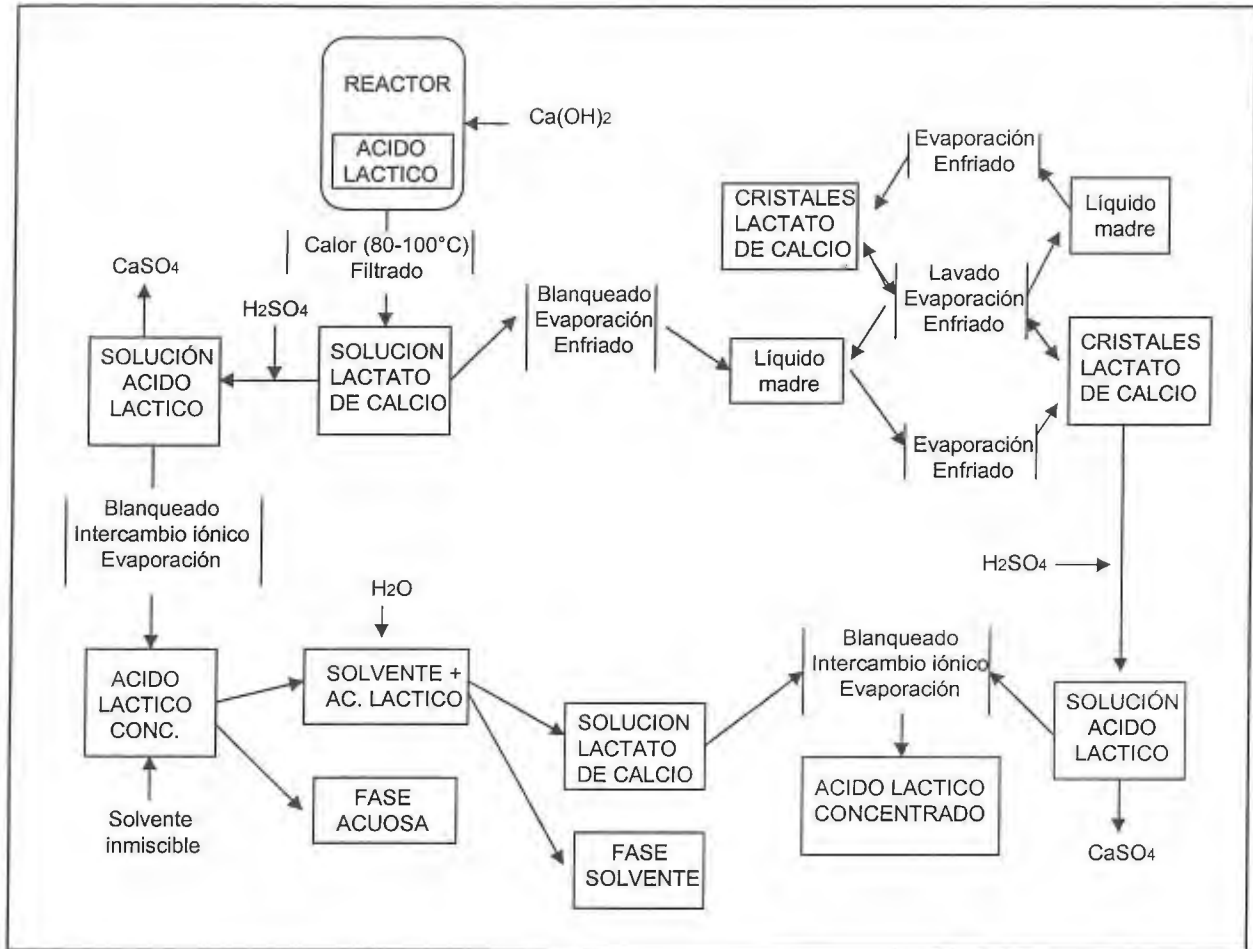


FIGURA 4. Recuperación y purificación del ácido láctico producido en un proceso de fermentación.

## IV MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 UBICACIÓN DEL PROYECTO

El proyecto se realizó en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica y en la Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda (EARTH) ubicada en Guácimo, Limón.

### 4.2 MICROORGANISMO, MEDIO Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN Y ACTIVACIÓN

El cultivo utilizado fue el *Lactobacillus casei* liofilizado de la casa comercial Cr. Hansen, el cual fue activado colocando 0,1% del cultivo puro liofilizado en un medio MRS (medio selectivo para lactobacilos) e incubado a 37°C/18 horas. Esta bacteria es homofermentativa generadora de L(+) ácido láctico. Este cultivo madre se mantuvo a 4°C por no más de 4 semanas.

Para la obtención de un nuevo medio se utilizó 1 mL de cultivo madre en 10 mL del medio MRS y se incubó por 18 horas a 37°C.

### 4.3 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL BANANO

La materia prima que se utilizó en la investigación fue banano de la variedad **Musa AAB Cavendish "Gran Nain"** obtenido de la planta empacadora de banano localizada en las fincas de la EARTH.

Este banano se maduró en cámaras de maduración con etileno para llevarlo a un grado de maduración 7 (totalmente maduro con manchas negras, según la tabla de maduración de banano de DOLE) donde se obtiene la mayor concentración de azúcares simples.

## 4.4 MEDIOS DE FERMENTACIÓN

### 4.4.1 Precultivo

El precultivo que se utilizó fue el mismo medio de fermentación en cada uno de los tratamientos (ver Cuadro 5). Se transfirieron 10 mL del *Lactobacillus casei* activado en MRS y mantenido a 4°C por no más de 4 semanas, a 100 mL del medio y se mantuvo en incubación por 18 horas a 37°C antes de su utilización.

### 4.4.2 Tratamientos

Se trabajó con tres tratamientos diferentes. El tratamiento 1 fue un medio control ya reconocido como apto para el crecimiento del *L. casei*; el tratamiento 2 fue puré de banano diluido en una relación 1:4 para lograr una concentración de azúcares totales cercana al 5%, concentración utilizada en el medio control; el tratamiento 3 fue puré de banano diluido en una relación 1:4 enriquecido con sales y proteínas. La Figura 5 muestra el diagrama de flujo del proceso de preparación de los diferentes tratamientos evaluados.



FIGURA 5. Diagrama de flujo del proceso de preparación de los tratamientos para el proceso de fermentación.

CUADRO 5. Composición de los medios de fermentación utilizados

TRATAMIENTO COMPONENTES	Tratamiento 1 (control)	Tratamiento 2 (puré diluido)	Tratamiento 3 (puré enriquecido)
Puré de banano: agua (1:4)	---	100%	1 L
Agua destilada	1 L		
Glucosa	50 g	---	---
Extracto de levadura	4 g	---	4 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.6 g	---	0.6 g
Acetato de sodio	1 g	---	1 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.03 g	---	0.03 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g	---	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	---	0.5 g
pH	5		

## 4.5 PROCESOS FERMENTATIVOS

### 4.5.1 Cultivo

Se adicionaron 20 mL del cultivo previamente activado en cada uno de los medios de fermentación a 600 mL del medio de trabajo para que iniciara el proceso de fermentación.

### 4.5.2 Equipo de fermentación

La fermentación se llevó a cabo en un fermentador piloto modelo MINI-FERM MODEL M-1000, de la casa comercial Fermentation Desing Inc., el cual tiene capacidad para realizar ensayos de 1 litro, con sistema de agitación, control y regulación de temperatura, control de pH y de oxígeno.

Una vez adaptado el equipo, se preparó el medio de fermentación, se colocó en los frascos fermentadores y se procedió a esterilizar todo el equipo armado en un autoclave a 15 psi/121°C/15 min.

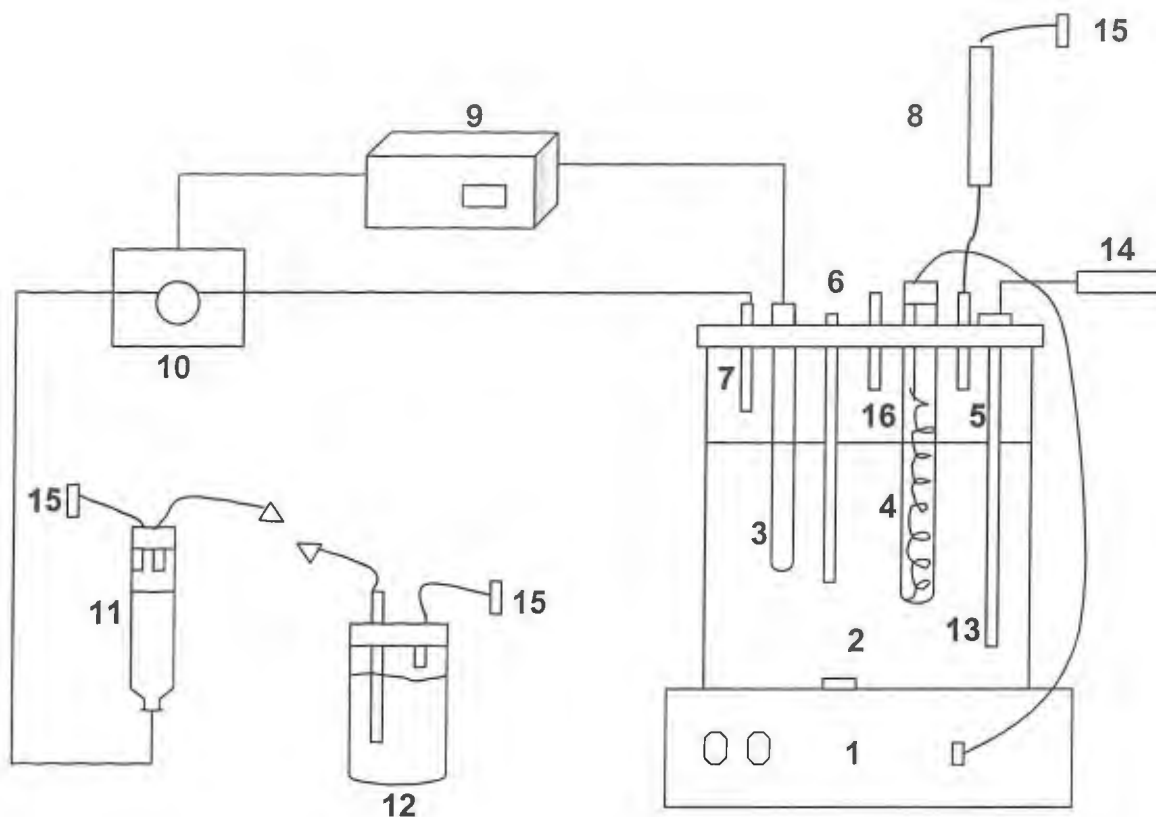


Posteriormente se bajó la temperatura a 37°C para inocular el microorganismo y dar inicio a la fermentación.

La Figura 6 muestra el diagrama del sistema de fermentación que se utilizó, el cual tenía entradas tanto para el cultivo como para la disolución de hidróxido de amonio. También debe tener salidas tanto de aire para evitar que se genere una presión interna, como de las muestras que se deben tomar periódicamente, de tal forma que no se genere contacto con el exterior para evitar que el medio se contamine.

El controlador de pH permitió que el pH se mantuviera entre 4.8 y 5.2, ya que al estar conectado a la bomba peristáltica que contiene la disolución de hidróxido de amonio, bombea la base si el pH desciende por debajo de 4.8.

La temperatura se reguló con un termostato para que se mantuviera a 37°C durante toda la fermentación.



- |  |  |
|--|--|
| 1. Agitador                                | 9. Controlador de pH                         |
| 2. Frasco de fermentación                  | 10. Bomba peristáltica                       |
| 3. Electrodo de pH                         | 11. Bureta con $\text{NH}_4\text{OH}$ 14.8M  |
| 4. Termostato                              | 12. Depósito de $\text{NH}_4\text{OH}$ 14.8M |
| 5. Salida de aire                          | 13. Toma de muestras                         |
| 6. Termómetro                              | 14. Recibo de muestra                        |
| 7. Entrada de $\text{NH}_4\text{OH}$ 14.8M | 15. Filtros de aire                          |
| 8. Condensador                             | 16. Puerto de inoculación                    |

FIGURA 6. Diagrama esquemático del sistema de fermentación en lote utilizado.

### 4.5.3 Variables de control

Durante la fermentación se controlaron las siguientes variables:

- Temperatura: 37°C (con un termostato incorporado al fermentador)
- pH:  $5 \pm 0.2$  (controlador de pH por adición de  $\text{NH}_4\text{OH}$  14,8M)
- Agitación (con un agitador magnético incorporado al fermentador)

### 4.5.4 Periodicidad de la toma de muestra y volumen

La fermentación de cada uno de los tratamientos inició con la adición del inóculo. Periódicamente se tomaron muestras del medio de fermentación para ser evaluadas y analizadas posteriormente; el tiempo entre tomas de muestra dependió de la velocidad de generación del ácido láctico y varió entre 1 y 3 horas. El volumen tomado dependió del tratamiento y del tiempo de fermentación y varió entre 3 y 5 mL, requiriéndose más volumen en los sustratos de banano que en el control. El proceso de fermentación se detuvo cuando ya no se generó ácido láctico o cuando los microorganismos habían consumido el sustrato.

## 4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.6.1 Pretratamiento de la muestra

Las muestras obtenidas del tratamiento 1 fueron colocadas en cubetas para determinar la absorbancia (620 nm) en el espectrofotómetro, esto como una medida de la masa celular de microorganismos; posteriormente fueron centrifugadas y el supernatante obtenido fue microfiltrado (filtro de  $0,45\mu\text{m}$ ) y congelado a  $-18^\circ\text{C}$  para su posterior análisis cromatográfico por HPLC. En el caso de los tratamientos 2 y 3, las muestras fueron centrifugadas y el supernatante obtenido fue microfiltrado (filtro de  $0,45\mu\text{m}$ ) y congelado a  $-18^\circ\text{C}$  para su posterior análisis cromatográfico por HPLC.

#### 4.6.2 Determinación de azúcares y ácido láctico

Para la determinación de azúcares y ácido láctico se trabajó por cromatografía líquida de alta resolución "HPLC". La determinación del ácido láctico, glucosa y fructosa se realizó utilizando una columna BioRad Aminex HPX-87H (300x7.8 mm; BioRad Chemical Division, Richmond Calif.), usando una muestra de 20  $\mu$ L y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.006M como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min y a una temperatura de 65°C. En el caso de la determinación de la sacarosa, se utilizó una columna BioRad Aminex HPX-87C (300x7.8 mm; BioRad Chemical Division, Richmond Calif.), usando una muestra de 20  $\mu$ L y agua bidestilada como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min y a una temperatura de 85°C (CITA, 1996).

#### 4.7 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Cada uno de los tres tratamientos (medio control, puré de banano y puré de banano enriquecido con sales minerales y extracto de levadura) se realizó por triplicado, manteniendo en todos los casos las condiciones de trabajo constantes. Las variables a comparar fueron:

- Consumo de azúcares en función del tiempo de fermentación.
- Generación de ácido láctico en función del tiempo de fermentación.
- Productividad máxima de ácido láctico.
- Rendimiento de ácido láctico.
- Consumo de azúcares.

Las curvas de consumo de azúcares y generación de ácido láctico en el tiempo se compararon por un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM (General Linear Models) del Programa Estadístico SAS, con un  $p < 0.05$ .

En el análisis de productividad máxima, rendimiento de ácido láctico y consumo de azúcares, se realizó un análisis de Duncan para determinar si existían diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos.

Las siguientes son las fórmulas utilizadas para el cálculo del rendimiento de ácido láctico y productividad máxima:

**Cálculo del rendimiento de ácido láctico (RAL)** expresado en porcentaje:

$$\text{RAL (\%)} = \frac{\text{porcentaje de ácido láctico producido}}{\text{porcentaje inicial de azúcares totales}} * 100$$

**Cálculo de la productividad máxima (PM)** expresado en g ácido láctico/L medio fermentación/hr. Se trabajó en la parte de la curva de generación de ácido láctico donde se presentó la mayor pendiente (fase logarítmica de crecimiento del microorganismo).

$$\text{PM (g/L/hr)} = \frac{\text{pendiente de la curva de producción de ácido láctico (g ácido láctico/hr)}}{\text{volumen del medio de fermentación (L)}}$$

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 EQUIPO DE FERMENTACIÓN

Como parte de la investigación realizada, fue necesario crear un sistema que permitiera llevar a cabo la fermentación láctica bajo los requerimientos que este tipo de procesos demanda.

Para esto, fue necesario adaptar una serie de equipos de tal forma que el proceso se llevara a cabo en las condiciones de esterilidad requeridas y con la facilidad de poder incorporar la disolución de hidróxido de amonio concentrado y poder tomar las muestras del medio de fermentación sin riesgo de contaminación.

El equipo utilizado se ilustra en la Figura 6 y muestra los principales componentes que formaron el sistema de fermentación. Un aspecto importante con respecto al equipo utilizado fue el frasco de fermentación, el cual tenía una capacidad de 800 mL; esto hizo que los volúmenes de fermentación fueran pequeños (600 mL), lo que no permitía que el tiempo de fermentación fuera muy prolongado debido a que las tomas de muestras reducían el volumen del medio. Sería recomendable para futuras investigaciones, utilizar un sistema de fermentación que permita trabajar con un volumen mucho mayor de medio de fermentación con el fin de poder prolongar el tiempo de fermentación.

El uso de equipo de esta naturaleza presenta cierta dificultad a la hora de realizar la fermentación, ya que la gran cantidad de uniones y conexiones representan un posible ingreso de contaminación microbiana, causando que el proceso de fermentación no sea llevado a cabo exclusivamente por el *Lactobacillus casei* inoculado. Esto fue evidente durante la investigación realizada, ya que en diferentes ocasiones el proceso de fermentación fue contaminado por otros microorganismos.

Para controlar esta situación, las muestras obtenidas se monitorearon constantemente a través de tinciones de Gram y evaluaciones al microscopio, con el fin de determinar la presencia de alguna levadura. Este tipo de control permitió afinar el diseño del equipo hasta lograr llegar al sistema mostrado en la Figura 6, garantizándose que no se presentaran problemas de contaminación.

## 5.2 FERMENTACIÓN DEL TRATAMIENTO CONTROL

El medio control fue preparado utilizando como sustrato glucosa, sales y aminoácidos requeridos por el *Lactobacillus casei* para su crecimiento (ver Cuadro 5). Este medio fue utilizado como medio control para poder comparar la eficiencia del microorganismo en otros sustratos. Investigaciones realizadas por Ho *et al* (1997) y Velázquez (1998), utilizaron medios similares de fermentación, ya que se ha encontrado que esta relación de nutrientes es adecuada para el crecimiento del *L. casei*.

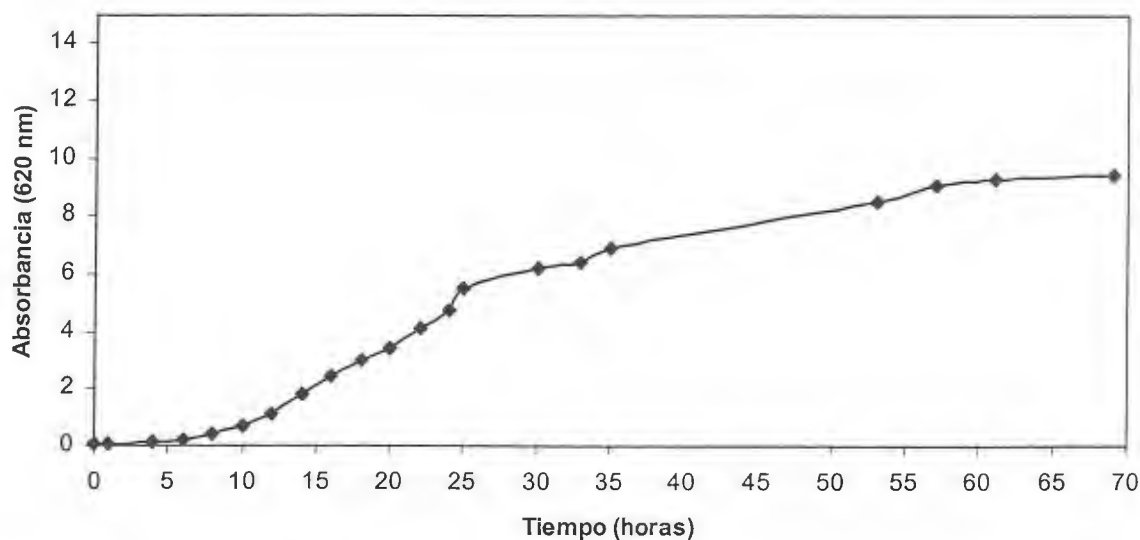


FIGURA 7. Curva de crecimiento del *L. casei* en un sistema de fermentación por lote utilizando el medio control.

La Figura 7 muestra la absorbancia promedio de tres repeticiones generada por la fermentación del medio control inoculado con el *L. casei*. La medida de absorbancia es una medida indirecta de la masa celular de microorganismos. Su aumento en el tiempo evidencia que la fermentación se está llevando a cabo. Se observa claramente que al inicio del proceso de fermentación, el microorganismo pasó por una etapa de adaptación (fase lag) que tomó alrededor de 8 horas; esta situación es reportada por Ho *et al* (1997), donde se mencionan tiempos de fase lag entre 9 y 11 horas utilizando diferentes concentraciones de extracto de levadura en un medio control similar; Velásquez (1998), también reporta tiempos de fase lag entre 6 y 8 horas utilizando medios de fermentación similares a los utilizados en este proyecto.

A partir de ese momento la fermentación se acelera entrando en una fase logarítmica que se lleva a cabo hasta cerca de las 25 horas de fermentación para posteriormente entrar en una fase estacionaria. Ho *et al* (1997) y Velásquez (1998), reportan en sus investigaciones tiempos de fase log cercanos a las 20 horas; esta variación en los tiempos puede obedecer a pequeños cambios tanto en las formulaciones de los medios (cantidad de glucosa) como en los equipos utilizados.

El proceso de fermentación se detiene a las 69 horas ya que no se experimentaban cambios aparentes en la absorbancia con respecto al tiempo, lo cual indica que no se está generando masa celular y por lo tanto la generación de ácido láctico sería mínima.

Esta determinación se realizó con el objetivo de definir el tiempo de la fermentación, ya que al no haber crecimiento en la masa celular, se supone que los microorganismos están entrando a una etapa en donde la reproducción es semejante a la tasa de muerte, posiblemente por haber agotado el sustrato (glucosa). Se asume que en este tipo de fermentación no hay inhibición por producto (ácido láctico), ya que éste fue neutralizado durante el proceso de



fermentación con la disolución de hidróxido de amonio, manteniendo de esta forma el pH entre 4,8 y 5,2, condiciones requeridas para el crecimiento del *L. casei*.

Esto es evidente en la Figura 8 en donde se muestra que al cabo de las 69 horas, la cantidad de glucosa presente es bastante reducida y se presenta una disminución en la velocidad con que es consumida, por lo tanto es de esperar que la fermentación en ese tiempo esté finalizando.

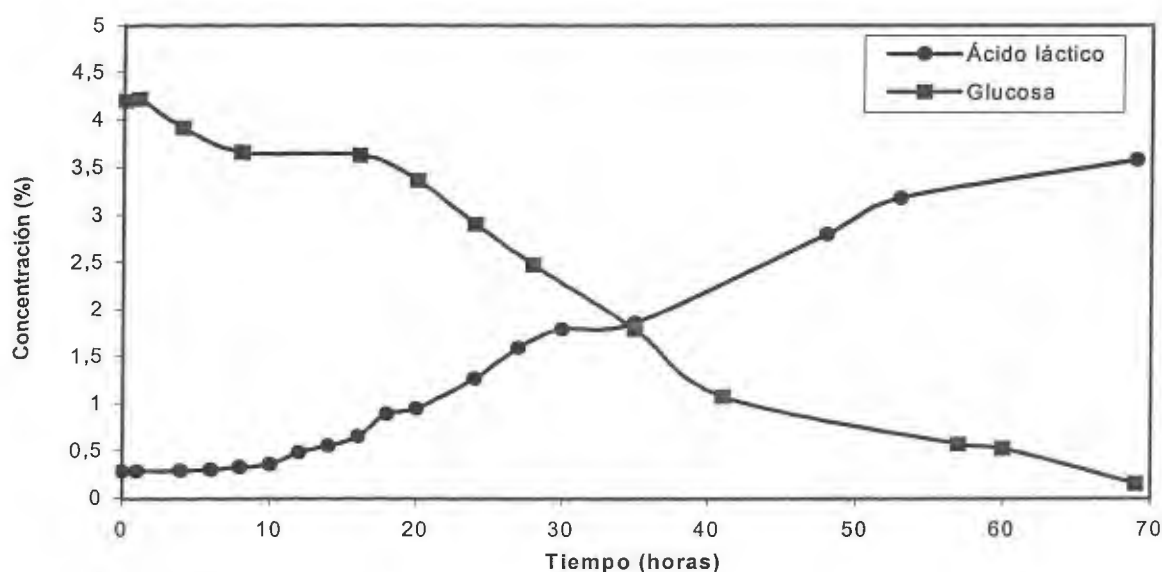


FIGURA 8. Producción de ácido láctico y consumo de glucosa en la fermentación por lote utilizando el medio control inoculado con *L. casei*.

Al utilizar un medio de fermentación especialmente elaborado para el crecimiento del *Lactobacillus casei*, se obtienen productividades máximas de ácido láctico de 1,48 g/L/hr y rendimientos del 88%. Investigaciones realizadas por Ho *et al* (1996) en un medio similar al utilizado en esta investigación, reportan productividades de 1,8 g/L/hr; por otro lado, Velázquez (1998), reporta datos de productividades máximas en medios similares que oscilan entre 1,7 - 1,8 g/L/hr utilizando *L. casei* como inóculo. Esta diferencia en la productividad pudo deberse al equipo utilizado; en esta investigación el mantenimiento de la temperatura fue

hecho por un termostato localizado en el interior del frasco fermentador, lo que pudo ocasionar que se presentaran pequeños gradientes de temperatura en el medio de fermentación. Al tener el *L.casei* una temperatura óptima, pudo ser que ese gradiente ocasionara que la productividad fuera menor a la reportada en otras investigaciones similares.

Por otro lado, la glucosa es consumida casi en su totalidad (96% de consumo), lo que evidencia que el proceso de fermentación se llevó a cabo satisfactoriamente. Es importante indicar que en las primeras 8 horas, el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico fue poca, esto debido a que el *Lactobacillus casei* estaba en su etapa de adaptación. Esto evidencia un sistema típico de fermentación tipo 1 como lo es el generado por el *L. casei*, en donde el producto deriva directamente del metabolismo primario utilizado para la producción de energía. En este caso, el crecimiento microbiano, el catabolismo de la glucosa y la formación de ácido láctico se llevan a cabo casi en paralelo (Crueger, 1993).

### 5.3 FERMENTACIÓN DEL BANANO DILUIDO

En el caso del tratamiento en el que se utilizó banano diluido sin enriquecer, se nota claramente que el proceso de fermentación fue bastante lento en comparación con la fermentación generada en el medio control, presentando un rendimiento del 10% y una productividad máxima de 0,13 g/L/hr. La Figura 9 muestra que la concentración de los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) disminuye muy poco en el tiempo, lo cual evidencia que el proceso de fermentación fue muy lento y por ende, la producción de ácido láctico también.

Esto indica que el medio utilizado (puré de banano diluido) no representa un sustrato adecuado para que el *Lactobacillus casei* se desarrolle satisfactoriamente, ya sea por un problema de falta de nutrientes o por la presencia de sustancia

inhibitorias del banano; esto debido a que el *L. casei* tiene requerimientos nutricionales complejos, principalmente en lo que respecta a vitaminas (Sneath, 1986).

Matamoros (1981) muestra que es posible fermentar pulpa de banano diluida utilizando *L. casei* y obtener en 15 horas de fermentación, reducciones de pH de 4,90 a 4,00. De Porres (1986) también muestra la factibilidad de fermentar el puré de banano, reduciendo el pH de 4,8 a 3,9 en 24 horas de fermentación utilizando *L. plantarum*. Esta reducción en el pH muestra que si bien es cierto hay producción de ácido láctico, ésta es muy poca y corrobora que el puré de banano como tal no es un medio adecuado para la producción de ácido láctico.

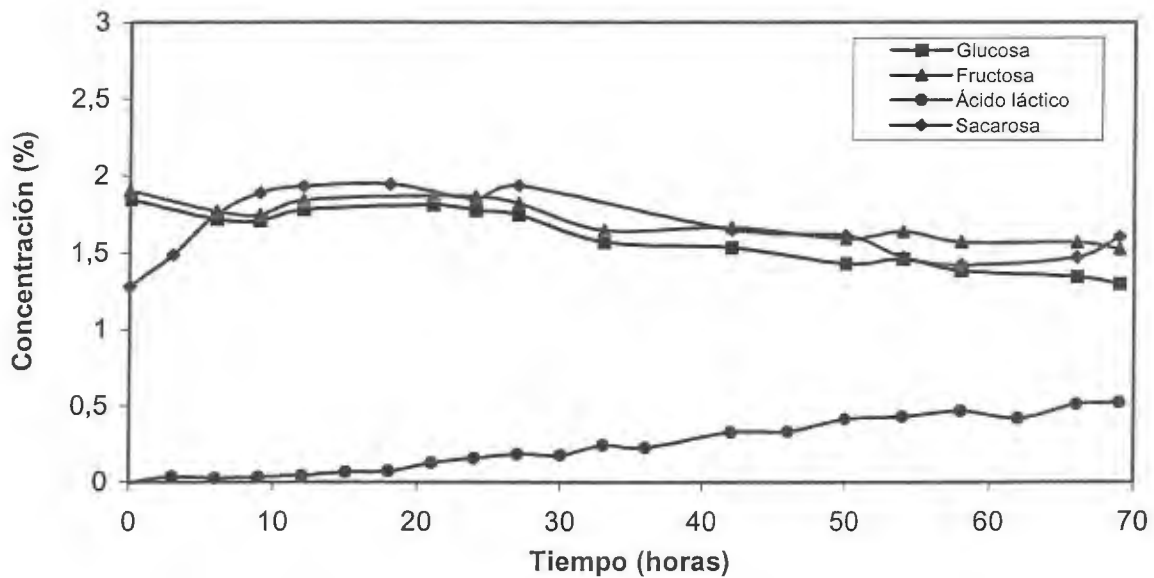


FIGURA 9. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares en una fermentación por lote utilizando banano diluido (1:4) inoculado con *L. casei*.

#### 5.4 FERMENTACIÓN DEL BANANO DILUIDO ENRIQUECIDO

Al contrario del proceso de fermentación del tratamiento con el puré de banano diluido, en el caso del puré de banano enriquecido, el proceso de fermentación fue mucho mayor, teniendo productividades máximas de 1,49 g/L/hr y rendimientos del proceso de 56%. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la productividad máxima entre el medio control y el banano diluido enriquecido, pero si se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el rendimiento de ácido láctico de estos dos tratamientos, siendo mayor en el medio control (ver Cuadro 6). Al compararlo con el banano diluido, el banano diluido enriquecido fue significativamente mejor, tanto en rendimiento como en productividad de ácido láctico. Esto evidencia que el problema del banano como sustrato para la fermentación con *Lactobacillus casei* es la falta de nutrientes que le impiden al microorganismo desarrollarse satisfactoriamente y no necesariamente a la presencia de sustancias inhibitorias propias de la fruta como taninos y fenoles.

En la Figura 10 se observa claramente que en el proceso de fermentación, el microorganismo primero hace uso de los azúcares sencillos (glucosa y fructosa) y posteriormente de la sacarosa; esta última, posiblemente por el tiempo de fermentación utilizado no fue consumida como los azúcares sencillos, por lo que es posible que si el tiempo de fermentación hubiese sido mayor, se esperaría que la sacarosa empiece a ser consumida igual que los otros azúcares.

Por otro lado, se observa que el consumo de glucosa y fructosa fue simultáneo, consumiendo la totalidad de fructosa y quedando un remanente de glucosa. Esta es situación particular, ya que teóricamente el *L. casei* consume primero la glucosa y luego la fructosa, esto por ser un homofermentador que utiliza la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para convertir la glucosa a ácido láctico (Gottschalk, 1986). Es posible que al tratarse de un medio tan heterogéneo como lo es el banano y tener diferentes azúcares, el *L. casei* genere una batería de enzimas

que permita degradar simultáneamente ambos monosacáridos. Sin embargo, no fue posible identificar la causa de que consumiera la totalidad de la fructuosa y quedara glucosa remanente.

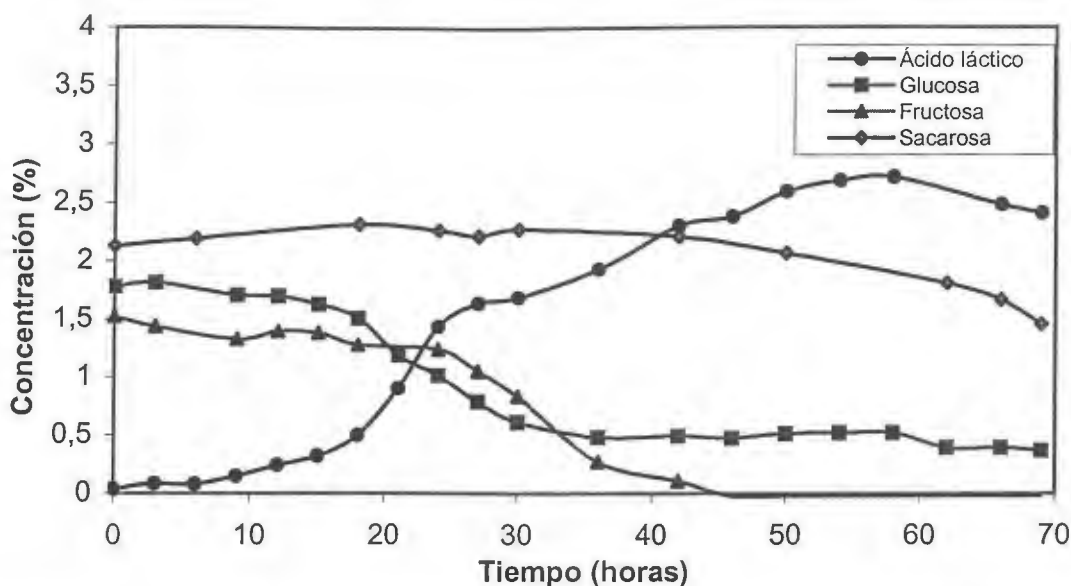


FIGURA 10. Producción de ácido láctico y consumo de azúcares en una fermentación por lote utilizando banano diluido enriquecido inoculado con *L. casei*.

## 5.5 COMPARACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO GENERADO DURANTE LA FERMENTACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES SUSTRATOS

Comparando los tres sustratos se observa que existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la cantidad total de ácido láctico producido, siendo el control el tratamiento que tuvo mayor producción, seguido por el tratamiento de banano enriquecido y por último el tratamiento con banano sin enriquecer (ver Cuadro 6). Esta diferencia en el rendimiento puede ser atribuida a que en el caso de los tratamientos con banano se tomó en cuenta todos los azúcares presentes en el medio (glucosa, fructosa y sacarosa), mientras que en el caso del medio control solo se trabajó con glucosa, la cual fue consumida más fácilmente. Esto hace que

los rendimientos sean menores en los tratamientos con banano, ya que como se mencionó anteriormente, el *L. casei* no utilizó eficientemente la sacarosa durante el tiempo de la fermentación.

Se debe tomar en cuenta que en el caso de medio control, el azúcar que está siendo utilizado es glucosa, lo cual representa un sustrato fácil de utilizar para el microorganismo. En el caso de los tratamientos con banano, los azúcares que están presentes son glucosa, fructosa y sacarosa; esto hace que el microorganismo tenga que adaptar su sistema metabólico a los diferentes sustratos, lo que implica que el proceso de fermentación se vuelva más lento y por lo tanto menos eficiente en su rendimiento, ya que cada vez que tenga que hacer uso de un nuevo azúcar, tendrá que adaptarse y producir una nueva batería de enzimas. Cuando se utilizan soluciones nutritivas complejas como el banano, frecuentemente se producen fases logarítmicas separadas por una segunda fase de latencia, proceso conocido como diauxia, debido a que uno de los sustratos se cataboliza preferentemente y reprime la utilización de los otros sustratos (Crueger, 1993).

Al comparar el medio control y el medio con banano enriquecido, se observó que durante las primeras 40 horas de fermentación, la producción de ácido láctico fue muy similar. Este tiempo concuerda con el tiempo que requirió en *L. casei* para consumir la gran mayoría de glucosa y fructosa del medio con banano enriquecido (Figura 10). Posterior a las 40 horas, es posible que el microorganismo entrara en una fase de latencia para adaptarse y utilizar la sacarosa como sustrato; en vista de lo anterior, se debe analizar la posibilidad de eliminar del medio a la sacarosa, hidrolizándola previamente, de tal manera que el sustrato sea solamente glucosa y fructosa. Esto podría aumentar los rendimientos de producción y reducir el tiempo de fermentación, lo que haría más atractivo a nivel comercial utilizar banano enriquecido como sustrato de fermentación.

Con respecto al tiempo de adaptación del microorganismo al medio de fermentación, es importante notar que en el caso del medio control y del banano enriquecido, el tiempo de adaptación (fase lag) fue similar, por lo que la interferencia de otros azúcares no generó un problema en la adaptación del microorganismo en el medio con banano. En el caso del banano diluido, la generación de ácido láctico fue bastante baja (Figura 11) y no fue posible distinguir las diferentes fases del proceso de fermentación.

CUADRO 6. Comparación de la eficiencia de la fermentación de los diferentes sustratos evaluados

DATOS	MEDIO CONTROL	BANANO DILUIDO	BANANO DILUIDO ENRIQUECIDO
Productividad máxima (g/L/hr)	1,48 <sup>A</sup>	0,13 <sup>B</sup>	1,49 <sup>A</sup>
Rendimiento total de ácido láctico (%)	88 <sup>A</sup>	10 <sup>B</sup>	56 <sup>C</sup>
Consumo de glucosa (%)	96 <sup>A</sup>	28 <sup>B</sup>	92 <sup>A</sup>
Consumo de fructosa (%)	----	18 <sup>A</sup>	100 <sup>B</sup>
Consumo de sacarosa (%)	----	10 <sup>A</sup>	27 <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> Letras iguales indican que no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Al evaluar el comportamiento de la fermentación en el tiempo, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los tres tratamientos evaluados, tanto para la generación de ácido láctico, como para el consumo de glucosa, fructosa y sacarosa (Apéndice B), lo que evidencia el efecto que tuvo el sustrato en el metabolismo del *Lactobacillus casei*.

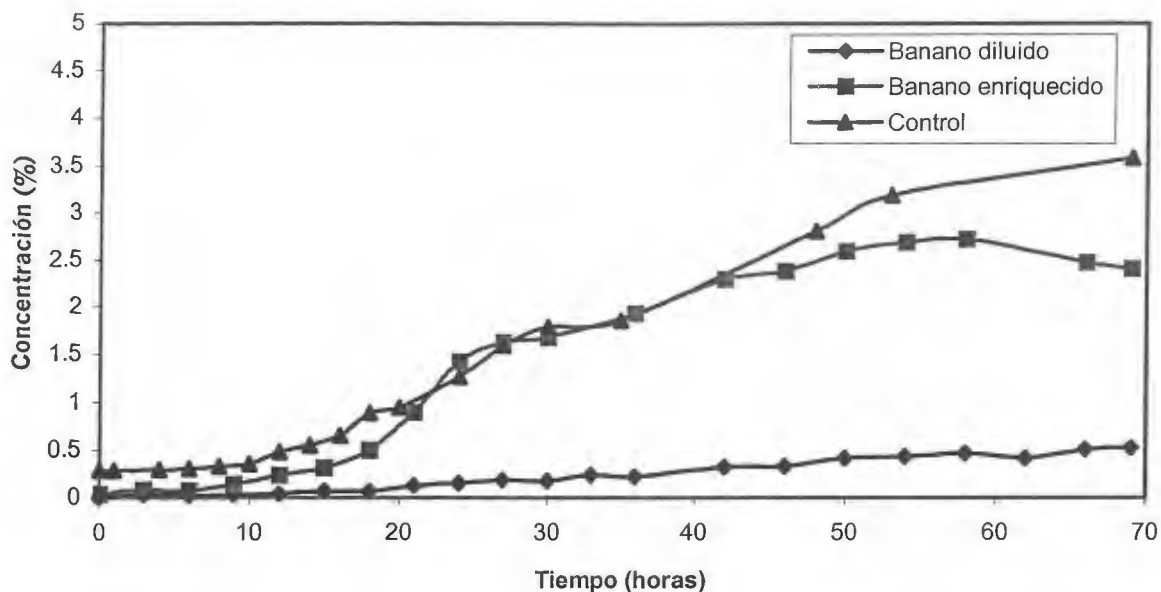


FIGURA 11. Producción de ácido láctico en el proceso de fermentación con *L. casei* en los tres sustratos evaluados

## 5.6 COMPARACIÓN DE GLUCOSA CONSUMIDA DURANTE LA FERMENTACIÓN UTILIZANDO DIFERENTES SUSTRATOS

La Figura 12 muestra el consumo de glucosa en los tres tratamientos; en el caso del tratamiento control la velocidad de consumo fue mayor, seguida por el tratamiento con banano enriquecido y por último el tratamiento con banano diluido. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos control y el banano enriquecido, mientras que el banano diluido si fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) a los otros sustratos utilizados. Esto evidencia que el banano por si solo no es un medio apto para que el *L casei* haga un uso eficiente de la glucosa, y por lo tanto, deba ser enriquecido con sales y aminoácidos, provocando de esta manera, que el microorganismo consuma la glucosa de una manera similar al medio control (ver Cuadro 6).



Es importante recalcar que las concentraciones iniciales de glucosa son mayores en el control que en los tratamientos con banano, debido a que en los medios donde se utilizó banano, se trató de manejar una concentración de azúcares totales (glucosa, fructosa y sacarosa) de alrededor del 5%, igual que la concentración de glucosa del medio control.

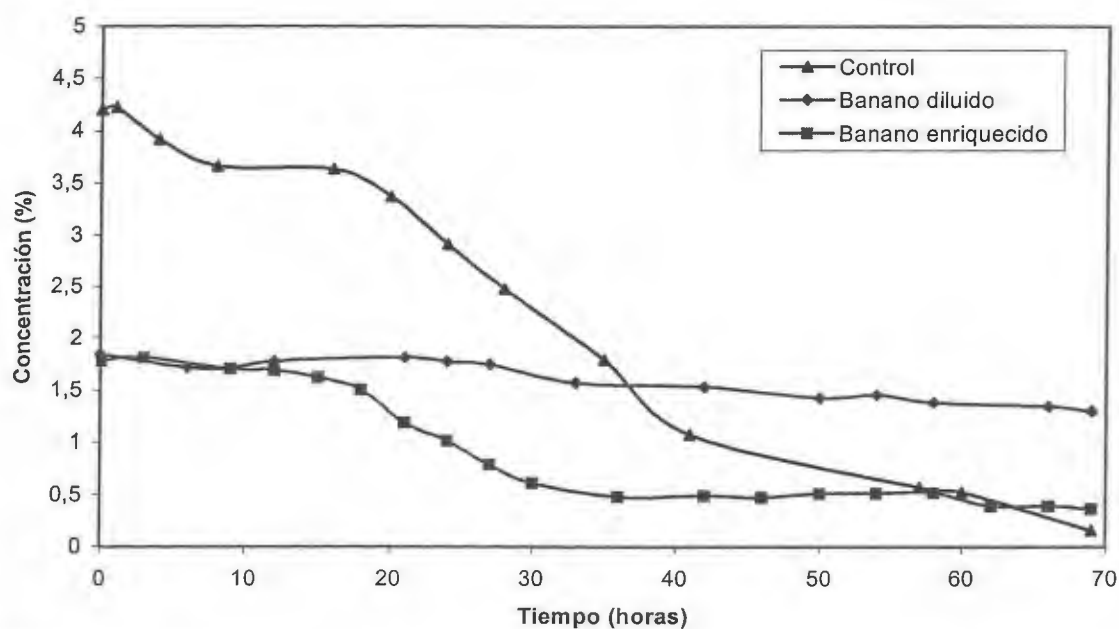


FIGURA 12. Consumo de glucosa en el proceso de fermentación con *L. casei* en los tres sustratos evaluados.

## 5.7 COMPARACIÓN DE FRUCTOSA CONSUMIDA DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LOS SUSTRATOS A BASE DE BANANO

El consumo de fructosa durante la fermentación en los dos tratamientos con banano mostró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). La Figura 13 muestra que el banano enriquecido por las sales y aminoácidos añadidos, permite al *Lactobacillus casei* desarrollarse más fácilmente y poder generar en su proceso metabólico las enzimas requeridas para poder utilizar la fructosa como sustrato. Esta situación no es evidente en el caso del tratamiento con banano diluido, ya que el consumo de

fructosa fue mucho menor, lo que hace suponer que el uso de nutrientes para enriquecer el banano es necesario para lograr que el microorganismo tenga una mayor actividad fermentativa con los diferentes sustratos presentes en el medio.

Si bien es cierto, el banano presenta en su composición vitaminas, minerales y algunos aminoácidos, es posible que el *L. casei* por ser un microorganismo fastidioso en cuanto a sus requerimientos nutricionales, demande nutrientes que el banano no presente naturalmente o que se encuentren en cantidades menores a las requeridas por el microorganismo.

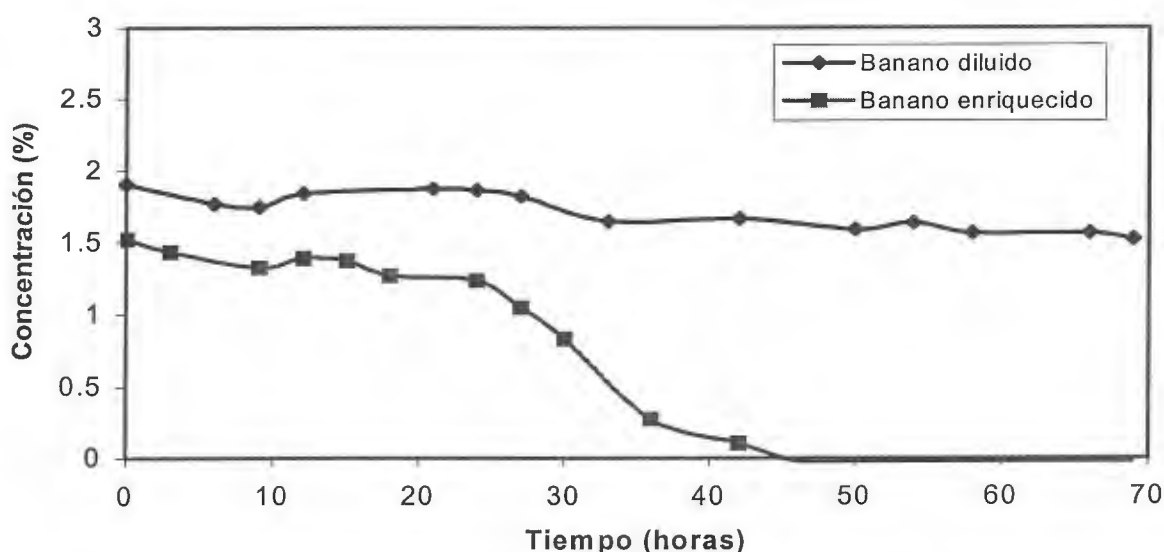


FIGURA 13. Consumo de fructosa en el proceso de fermentación con *L. casei* utilizando como sustrato banano diluido y banano enriquecido.

## 5.8 COMPARACIÓN DE SACAROSA CONSUMIDA DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LOS SUSTRATOS A BASE DE BANANO

Es importante notar, que probablemente debido al tiempo de fermentación que se utilizó en el experimento, la sacarosa en ninguno de los dos tratamientos con banano fue utilizada eficientemente como sustrato por el microorganismo, ya que por la presencia de glucosa y fructosa en el medio, fueron consumidos estos

dos azúcares inicialmente. Es importante establecer que aunque es mayor el consumo de sacarosa en el banano enriquecido que en el diluido, esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

El tiempo que requería el microorganismo para adaptarse y empezar a metabolizar la sacarosa probablemente no fue alcanzado en su totalidad, puesto que en el caso del tratamiento con banano diluido solamente se alcanzó un consumo de 10% de la sacarosa presente y en el caso del tratamiento con banano enriquecido el consumo fue de 27%. Este consumo reducido de sacarosa hace suponer, que si bien es cierto el *L. casei* puede hidrolizar la sacarosa para transformarla en glucosa y fructosa para luego utilizarlas para la producción del ácido láctico, es posible que el tiempo de la fermentación no haya sido el suficiente para lograr una hidrólisis total, y por ende, este sustrato no fue utilizado eficientemente en ninguno de los dos tratamientos.

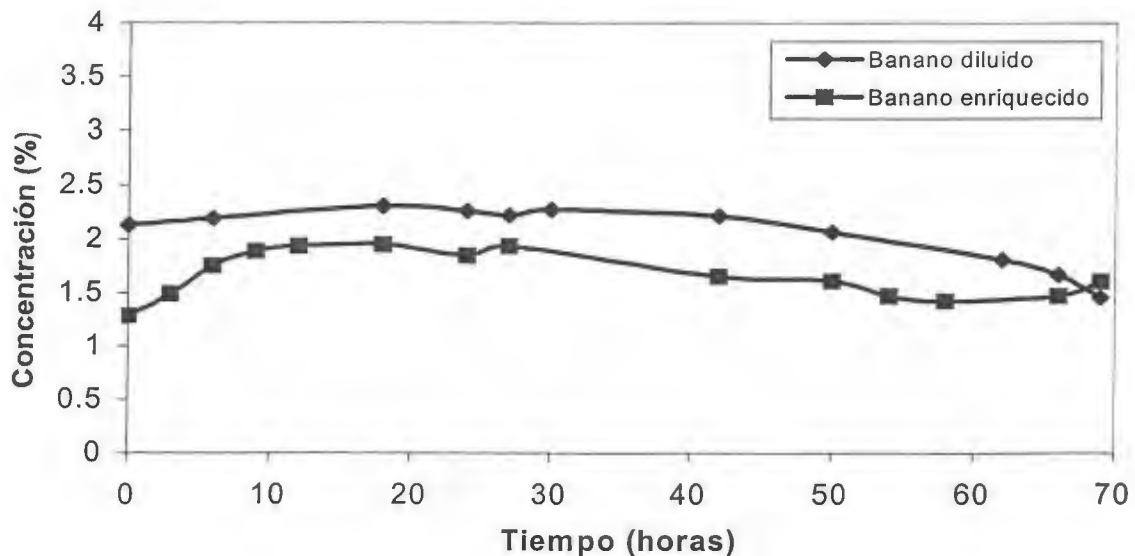


FIGURA 14. Consumo de sacarosa en el proceso de fermentación con *L. casei* utilizando como sustrato banano diluido y banano enriquecido.

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se logró adaptar un equipo de fermentación con la menor cantidad de conexiones posibles, esto con el fin de reducir las vías de contaminación del medio de trabajo.
- Al evaluar el comportamiento de la fermentación en el tiempo, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los tres tratamientos para cada una de las variables analizadas (generación de ácido láctico, consumo de glucosa, fructosa y sacarosa).
- El tratamiento control fue el medio de fermentación que mayor rendimiento de ácido láctico generó, seguido por el tratamiento de banano diluido enriquecido y por último el banano diluido sin enriquecer.
- No se encontraron diferencias significativas en las productividades máximas de ácido láctico entre el tratamiento control y el medio con banano diluido enriquecido.
- El puré de banano diluido enriquecido es un mejor medio de fermentación para el *Lactobacillus casei* que el medio con banano diluido sin enriquecer.
- El banano por su composición, es un medio deficiente para el crecimiento del *L. casei* y producción de ácido láctico, por lo que debe ser enriquecido con sales y aminoácidos.
- En su proceso metabólico para la producción de ácido láctico, el *Lactobacillus casei* primeramente hace uso de los azúcares sencillos (glucosa y fructosa) y posteriormente utiliza la sacarosa.

- Se recomienda aumentar el tiempo de fermentación en los tratamientos con banano, para determinar si el *L. casei* hace un uso efectivo de la sacarosa como sustrato de fermentación.
- Se recomienda realizar este tipo de fermentaciones con volúmenes mayores del medio de fermentación, esto con el objetivo de poder tomar un mayor número de mediciones en el tiempo.
- Se recomienda realizar pruebas con puré de banano utilizando una dilución menor a la trabajada en este proyecto, con el objetivo de aumentar la concentración de sustratos.
- Se recomienda hidrolizar la sacarosa presente en el banano antes de utilizarlo como medio de fermentación, para determinar si hay un mayor rendimiento en la producción de ácido láctico.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Araya, O., Víquez, F., Rodríguez, A., Flores, W., Segreda, A.C., Bonilla, A.R. 1995. Alternativas de Industrialización del Banano y el Plátano. Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos. UCR. San Pedro, San José.
- Bailey, J. and Ollis, D. 1977. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill. New York.
- Bozoglu, T.F. y Ray, B. 1996. Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. Ed. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- CITA, 1996. Determinación de azúcares por "HPLC". Area de Química. Universidad de Costa Rica, San Pedro.
- Crueger, W. y Crueger, C. 1993. Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.
- De Arriola, M.C., De Porres, E., Carcía, R. y Rolz, C. 1984. Lactic acid Fermentation of Banana Puree. Symposium on the Importance of Lactic Acid Fermentation in the Food Industry. United Nations Industrial Development Organization, Mexico D.F.
- De Porres, E. 1986. Minimización del tiempo requerido para reducir el pH del puré de banano mediante fermentación láctica. Segundo Congreso Latinoamericano y del Caribe de Tecnología de Alimentos. San José.

Demerci, A., Pometto, A.L., Lee, B. and Hinz, P. 1998. Media Evaluation of Lactic Acid Repeated-Batch Fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* Subsp. *rhamnosus*. J. Agric. Food Chem. 46(11):4771-4774.

Department of Agriculture Malaysia. 1999. Banana.  
[http://agrolink.moa.my/comoditi/doa/ban\\_gen.html](http://agrolink.moa.my/comoditi/doa/ban_gen.html)

Gottschalk, G. 1986. Bacterial metabolism. Second Edition. Ed. Springer-Verlag, New York.

Ho, K., Pometto, A.L. and Hinz, P. 1997. Optimization of L(+) Lactic Acid Production by Ring and Disc Plastic Composite Support through Repeated-Batch Biofilm Fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 63(7):2533-2542.

Hulme, A.C. 1971. The Biochemistry of Fruit and their Products. Vol 2. Academic Press, London.

Jay, J. 1994. Microbiología Moderna de los Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza.

Kharas, G, Sanchez-Riera, F. and Severson, D. 1994. Polymers of lactic acid. P93-137. En D.P. Mobley (ed), Plastics from microbes. Hanser Publishers, Munich, Germany.

Litchfield, J.H. 1996. Microbial production of lactic acid. Adv. Appl. Microbiol. 42:45-95

- Marshall, V.M.E. and Tamime, A.Y. 1997. Physiology and Biochemistry of Fermented Milks. In: Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Second Edition. Blackie Academic and Professional. New York.
- Matamoros, J.J. 1981. Factibilidad técnica de fermentar pulpa de banano con *Lactobacillus casei* y posibilidades de obtener un producto base. Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José.
- McArdle, W.D., Katch, F.I. and Katch, V.L. 1996. Exercise Physiology: Energy Nutrition and Human Performance. Williams and Wilkins. Maryland.
- Salminen, S and Wright, A. 1998. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. Second Edition. Ed. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Siebold, M., Frieling, P., Joppien, R., Riendfleisch, D., Schügerl, K. and Röper, H. 1995. Comparison of the production of lactic acid by three different *Lactobacillus* and its recovery by extraction and electro dialysis. Process Biochem. 30(1):81-95
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Soto, M. 1992. Bananos, Cultivo y Comercialización. Litografía e Imprenta LIL, S.A. San José.
- United Nations Industrial Development Organization. 1984. Lactic Acid Fermentation of Banana Puree, Mexico City.



- Vaccari, G., González-Vara, A., Campi, A.L., Dosi, E., Brigidi, P. and Matteuzzi, D. 1993. Fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus casei* DMS 20011 and product recovery using ion exchange resins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:23-27.
- 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. Thesis submitted to the graduate faculty in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science. Iowa State University, Iowa.
- Wingrove, A.S. y Caret, R.L. 1984. *Química Orgánica*. Editorial HARLA S.A., Mexico, D.F.

## VIII. APÉNDICES

**APÉNDICE A**  
**RESULTADOS DE LAS FERMENTACIONES DE LOS TRATAMIENTOS**  
**EVALUADOS**

CUADRO A 1. Determinación de la absorbancia durante el tiempo en la fermentación del medio control

<b>TIEMPO (h)</b>	<b>ABSORBANCIA (620 nm)</b>	<b>Desv. est.</b>
0	0,06	0,01
1	0,07	0,01
4	0,14	0,02
6	0,24	0,05
8	0,41	0,11
10	0,72	0,06
12	1,14	0,09
14	1,82	0,11
16	2,47	0,09
18	2,98	0,24
20	3,41	0,32
22	4,11	0,42
24	4,77	0,51
27	5,32	0,36
30	6,22	0,44
33	6,42	0,15
35	6,92	0,29
53	8,48	0,72
57	9,04	0,13
61	9,31	0,30
69	9,43	0,21

CUADRO A 2. Comparación de la generación de ácido láctico en los tres tratamientos evaluados.

TIEMPO (h)	BANANO DILUIDO		BANANO ENRIQUECIDO		CONTROL	
	%	Desv. Est.	%	Desv. Est.	%	Desv. Est.
0	0,00	0,01	0,04	0,02	0,28	0,13
1					0,29	0,01
3	0,03	0,01	0,08	0,02		
4					0,29	0,00
6	0,03	0,02	0,08	0,00	0,30	0,01
8					0,33	0,01
9	0,03	0,02	0,15	0,06		
10					0,36	0,04
12	0,04	0,01	0,24	0,13	0,48	0,02
14					0,55	0,04
15	0,07	0,01	0,32	0,17		
16					0,65	0,07
18	0,07	0,01	0,50	0,11	0,89	0,13
20					0,95	0,12
21	0,13	0,01	0,90	0,15		
24	0,15	0,03	1,43	0,45	1,27	0,33
27	0,18	0,01	1,63	0,43	1,59	0,34
30	0,18	0,02	1,68	0,38	1,79	0,34
33	0,24	0,02				
35					1,86	0,00
36	0,22	0,06	1,93	0,24		
42	0,32	0,05	2,30	0,82		
46	0,33	0,05	2,38	0,54		
48					2,80	0,00
50	0,41	0,03	2,59	0,09		
53					3,18	0,53
54	0,43	0,05	2,69	0,43		
58	0,46	0,05	2,72	0,68		
62	0,42	0,04				
66	0,51	0,06	2,48	0,38		
69	0,52	0,04	2,41	0,18	3,58	0,37

CUADRO A 3. Comparación del consumo de glucosa en los tres tratamientos evaluados

TIEMPO (h)	CONTROL		BAN. DILUIDO		BAN. ENRIQUECIDO	
	%	Desv. Est.	%	Desv. Est.	%	Desv. Est.
0	4,20	0,79	1,85	0,31	1,78	0,26
1	4,22	0,28				
3					1,81	0,47
4	3,92	0,08				
6			1,72	0,18		
8	3,66	0,32				
9			1,71	0,22	1,70	0,41
12			1,78	0,31	1,69	0,29
15					1,62	0,59
16	3,63	0,57				
18					1,50	0,41
20	3,37	0,34				
21			1,81	0,23	1,18	0,16
24	2,91	0,61			1,01	0,03
27			1,75	0,22	0,79	0,21
28	2,48	0,00				
30					0,61	0,13
33			1,81	0,18		0,12
35	1,79	0,00				
36					0,48	0,07
41	1,08	0,00				
42			1,53	0,22	0,49	0,10
46					0,47	0,15
50			1,43	0,28	0,51	0,11
54			1,46	0,17	0,52	0,15
57	0,57	0,01				
58			1,38	0,23	0,52	0,15
60	0,53	0,00				
62					0,39	0,09
66			1,34	0,15	0,39	0,13
69	0,16	0,13	1,30	0,04	0,36	0,09

CUADRO A 4. Comparación del consumo de fructosa en los dos tratamiento utilizando banano como sustrato.

TIEMPO (h)	BAN. DILUIDO		BAN. ENRIQUECIDO	
	%	Desv. Est.	%	Desv. Est.
0	1,90	0,29	1,52	0,78
3			1,44	0,26
6	1,77	0,16		
9	1,75	0,16	1,32	0,18
12	1,84	0,34	1,39	0,35
15			1,37	0,65
18			1,27	0,39
21	1,87	0,26		
24	1,86	0,48	1,24	0,30
27	1,82	0,28	1,05	0,44
30			0,83	0,32
33	1,65	0,31		
36			0,27	0,21
42	1,66	0,22	0,11	0,18
46			-0,02	0,00
50	1,59	0,29	-0,02	0,00
54	1,64	0,22	-0,02	0,00
58	1,57	0,25	-0,02	0,00
62			-0,02	0,00
66	1,57	0,24	-0,02	0,00
69	1,52	0,11	-0,02	0,00

CUADRO A 5. Comparación del consumo de sacarosa en los dos tratamiento utilizando banano como sustrato.

TIEMPO (h)	BAN. ENRIQUECIDO		BAN. DILUIDO	
	%	Desv. Est.	%	Desv. Est.
0	2,13	0,51	1,28	0,45
3			1,49	0,39
6	2,19	0,49	1,75	0,79
9			1,89	0,47
12			1,93	0,41
18	2,31	0,39	1,95	0,53
24	2,26	0,18	1,85	0,45
27	2,21	0,26	1,93	0,41
30	2,27	0,29		
42	2,21	0,80	1,65	0,12
46			1,40	0,45
50	2,06	0,58	1,61	0,20
54			1,47	0,37
58			1,42	0,08
62	1,81	0,20		
66	1,66	0,27	1,47	0,39
69	1,45	0,24	1,60	0,33

**APÉNDICE B**  
**ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

CUADRO B 1. Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable ácido láctico.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIA	F	P
Tratamiento	2	44,77	22,38	43,04	<0,0001
Error (a)	6	3,10	0,52	.....	.....
Horas	32	73,45	2,30	33,81	<0,0001
Horas * tratamiento	25	25,34	1,01	14,93	<0,0001
Error (b)	101	6,86	0,068	.....	.....
<b>TOTAL</b>	<b>166</b>	<b>153,52</b>			

CUADRO B 2. Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable glucosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIA	F	P
Tratamiento	2	73,40	36,70	89,51	<0,0001
Error (a)	6	2,48	0,41	.....	.....
Horas	30	57,75	1,93	11,70	<0,0001
Horas * tratamiento	12	11,86	0,99	6,00	<0,0001
Error (b)	73	12,01	0,16	.....	.....
<b>TOTAL</b>	<b>123</b>	<b>157,51</b>			



CUADRO B 3. Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable fructosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIA	F	P
Tratamiento	1	27,24	27,24	42,56	<0,0001
Error (a)	4	2,56	0,64	.....	.....
Horas	20	16,99	0,85	8,37	<0,0001
Horas * tratamiento	10	4,24	0,42	4,17	0,0002
Error (b)	60	6,09	0,10	.....	.....
<b>TOTAL</b>	<b>95</b>	<b>57,12</b>			

CUADRO B 4. Análisis de varianza en bloques repetidos en el tiempo de la variable sacarosa.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIA	F	P
Tratamiento	1	2,78	2,78	1,18	<0,0001
Error (a)	4	9,44	2,36	.....	.....
Horas	15	3,43	0,23	2,67	0,005
Horas * tratamiento	8	0,88	0,11	1,28	0,28
Error (b)	46	3,93	0,09	.....	.....
<b>TOTAL</b>	<b>74</b>	<b>20,45</b>			