



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TEMA

“PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA”

Trabajo de Investigación (Graduación). Modalidad: Seminario de Graduación. Presentando como Requisito Previo a la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTOR:

Barrera Vaca Rosa Verónica

TUTOR:

Ing. María Teresa Pacheco

AMBATO-ECUADOR.

2011

Ing. María Teresa Pacheco

TUTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Investigación: "**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA**". Desarrollado por la Egda. Barrera Vaca Rosa Verónica, observa las orientaciones metodológicas de la Investigación Científica.

Que ha sido dirigida en todas sus partes, cumpliendo con las disposiciones en la Universidad Técnica de Ambato a través del Seminario de Graduación.

Por lo expuesto:

Autorizo su presentación ante los organismos competentes para la respectiva calificación.

Ambato, Mayo 3 del 2011

.....
Ing. María Teresa Pacheco

TUTOR

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido del Trabajo de Investigación Científica:

"PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA", corresponde a Barrera Vaca Rosa Verónica, y de la Ing. María Teresa Pacheco, Tutor del Trabajo de Investigación, y el patrimonio intelectual del mismo a la Universidad Técnica de Ambato.

.....

Verónica Barrera

Autor del Trabajo de Investigación

.....

Ing.: María Teresa Pacheco

Tutor del Trabajo de Investigación

A CONSEJO DIRECTIVO DE LA FCIAL

El Tribunal de Defensa del Trabajo de Investigación "PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA", presentado por la Señorita Verónica Barrera y conformado por: Ingeniero Diego Salazar e Ingeniera Dolores Robalino. Miembros del Tribunal de Defensa y Tutor del Trabajo de Investigación Ingeniera María Teresa Pacheco y presidido por el Ingeniero Romel Rivera, Presidente de Consejo Directivo, Ingeniera Mayra Paredes E., Coordinadora del Décimo Seminario de Graduación FCIAL-UTA, una vez escuchada la defensa oral y revisado el Trabajo de Investigación escrito en el cuál se ha constado el cumplimiento de las observaciones realizadas por el Tribunal de Defensa del Trabajo de Investigación, remite el presente Trabajo de Investigación para su uso y custodia en la Biblioteca de la FCIAL

.....

Ing. Romel Rivera
Presidente del Consejo Directivo

.....

Ing. Mayra Paredes E.
Coordinadora Decimo Seminario de Graduación

.....

Ing. Dolores Robalino
Miembro del Tribunal

.....

Ing. Diego Salazar
Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

Esta investigación va dedicada a la memoria de mi Madre a mi Padre, hermanas y hermano. A Dios por darme la fuerza para seguir luchando por mis deseos de superación. A mi amigo y enamorado que siempre me apoya y alienta a terminar todas las metas que me propongo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme dado la vida y tener la oportunidad de estudiar, a mi directora de tesis por su apoyo y tiempo. A todos quienes forman parte de esta preciada Facultad.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

Carátula.....	i
Tutoría.....	ii
Autoría.....	iii
Aprobación del tribunal de grado.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice General de contenidos.....	vii
Índice de tablas.....	x
Índice de figuras.....	x
Índice de gráficos.....	xi
Resumen.....	xvi

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de investigación.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	1
1.2.1. Contextualización.....	1
1.2.2. Análisis Crítico.....	8
1.2.3. Prognosis.....	9
1.2.4. Formulación del Problema.....	9
1.2.5. Interrogantes de Investigación.....	9
1.2.6. Delimitación.....	10
1.3. Justificación.....	10
1.4. Objetivos.....	11
1.4.1. Objetivo General.....	11
1.4.2. Objetivos Específicos.....	11

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.	Antecedentes de investigación.....	12
2.2.	Fundamentación filosófica.....	14
2.3.	Fundamentación sociológica.....	14
2.4.	Categorías fundamentales.....	15
2.4.1.	Proceso de producción de ácido láctico.....	15
2.4.2.	Perfil del producto.....	23
2.4.3.	Materia prima.....	28
2.4.3.1.	Melaza.....	28
2.4.3.2.	Microorganismo.....	37
2.4.4	Métodos y técnicas utilizadas.....	41
2.5.	Hipótesis.....	47
2.6.	Señalamiento de variables.....	48

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1.	Enfoque de la investigación	49
3.2.	Modalidad de Investigación.....	49
3.3.	Nivel o Tipo.....	49
3.4.	Población y Muestra.....	50
3.5.	Operacionalización de Variables.....	52
3.6.	Plan de recolección de la información	54

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.	Caracterización de las diluciones de melaza.....	55
4.2.	Cinéticas de fermentación.....	55
4.3.	Estudios adicionales para el ácido láctico obtenido	57
4.4.	Verificación de la hipótesis.....	59

CAPÍTULO V

5.1.	Conclusiones.....	60
5.2.	Recomendaciones.....	62

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1.	Datos informativos.....	63
6.2.	Antecedentes de la propuesta.....	64
6.3.	Justificación.....	64
6.4.	Objetivos.....	65
6.5.	Análisis de factibilidad.....	66
6.6.	Fundamentación.....	67
6.7.	Metodología.....	69
6.8.	Administración.....	70
6.9.	Previsión de la evaluación.....	71

BIBLIOGRAFÍA

7.1.	Libros y Revistas.....	72
7.2.	Direcciones de Internet.....	75
7.3.	Anexos.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Producción mundial de caña de azúcar en países tropicales.....	5
Tabla 2.	Propiedades del Ácido Láctico.....	27
Tabla 3.	Composición de la melaza de caña de azúcar.....	30
Tabla 4.	Parámetros de la melaza (Ingenio San Carlos).....	34
Tabla 5.	Composición aproximada de la miel de caña. Ecuador.....	35
Tabla 6.	Aprovechamiento de la melaza de caña.....	36
Tabla 7.	Señalamiento de variables.....	48
Tabla 8.	Factores y niveles de estudio.	50
Tabla 9.	Esquema de Análisis de Varianza (ANOVA).....	51
Tabla 10.	Tratamientos por combinación de factores y niveles con su descripción.....	51
Tabla 11.	Operacionalización de la variable independiente.....	52
Tabla 12.	Operacionalización de la variable dependiente.....	53
Tabla 38.	Modelo Operativo (Plan de acción).....	69
Tabla 39.	Administración de la Propuesta.....	70
Tabla 40.	Previsión de la Evaluación.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Árbol de problemas sobre el uso de melaza para la producción de ácido láctico.....	7
Figura 2.	Categorías fundamentales de la producción de ácido láctico a partir de melaza.....	15
Figura 3.	Melaza de caña de azúcar.....	18
Figura 4.	Pesado de la melaza	19
Figura 5.	Muestras de melaza diluida.....	19
Figura 6.	Pasteurización de la melaza.....	19
Figura 7.	Neutralización de la dilución de melaza.....	20
Figura 8.	Filtración de la dilución de melaza.....	21
Figura 9.	Calentamiento de las muestras de dilución de melaza.....	21
Figura 10.	Equipo fermentador.....	22
Figura 11.	Muestras preparadas.....	22
Figura 12.	Proceso de fermentación.....	23
Figura 13.	Centrifugado de muestras.....	23
Figura 14.	Producto.....	23
Figura 15.	Isomería óptica L(+) o D(-).....	24
Figura 16.	Proceso de obtención de las melazas.....	31
Figura 17.	Vías metabólicas en la fermentación de hexosas por bacterias lácticas (Kandler, 1983).....	39
Figura 18.	Determinación de sólidos solubles (melaza).....	42
Figura 19.	Determinación de pH (melaza).....	42
Figura 20.	Determinación de la acidez (melaza).....	43
Figura 21.	Determinación de la acidez (ácido láctico).....	44

DIAGRAMAS

DIAGRAMA 1.	Producción de ácido láctico mediante el uso de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> a partir de melaza. Tratamientos: a ₀ b ₀ , a ₁ b ₀ , a ₂ b ₀	16
DIAGRAMA 2.	Producción de ácido láctico mediante el uso de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> a partir de melaza. Tratamientos: a ₀ b ₁ , a ₁ b ₁ , a ₂ b ₁	17

GRÁFICOS

Gráfico 1.	Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a ₀ b ₀	
Gráfico 2.	Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a ₀ b ₁	104
Gráfico 3.	Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a ₁ b ₀	
Gráfico 4.	Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a ₁ b ₁	105
Gráfico 5.	Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a ₂ b ₀	
Gráfico 6.	Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a ₂ b ₁	106

ANEXOS

ANEXO A	Propiedades físicas de las muestras de melaza.
ANEXO B	Propiedades físico químicas del producto obtenido (ácido láctico).
ANEXO C-1	Porcentaje de acidez de las muestras en fermentación en función del tiempo.
ANEXO C-2	Gráficos de la variación de la acidez en función al tiempo.
ANEXO D	Velocidad de fermentación.
ANEXO E	Análisis estadístico aplicado para seleccionar el mejor tratamiento para la producción de ácido láctico.
ANEXO F	Análisis de costos.

ANEXO A

- Tabla 13.** Datos experimentales de valores obtenidos de las propiedades físicas de las diferentes muestras de diluciones de melaza.
- Tabla 14.** Datos experimentales de valores de pH de las diferentes muestras de melaza.
- Tabla 15.** Datos experimentales de Porcentaje de ácido aconítico de las muestras de melaza.

ANEXO B

- Tabla 16.** Datos experimentales de valores de pH iniciales y finales de las diluciones de melaza utilizada a diferentes concentraciones y grados de pureza en tres réplicas.
- Tabla 17.** Datos experimentales de valores de los °Brix iniciales y finales de las diluciones de melaza utilizada a concentraciones y grados de pureza en tres réplicas.
- Tabla 18.** Datos experimentales de valores NaOH0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación. Tratamiento: (a_0b_0 , a_1b_0 , a_2b_0).
- Tabla 19.** Datos experimentales de valores NaOH0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación. Tratamiento: (a_0b_1 , a_1b_1 , a_2b_1)

ANEXO C-1

- Tabla 20.** Datos experimentales de promedio del porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamiento: a_0b_0 .
- Tabla 21.** Datos experimentales de promedio del porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamiento: a_1b_0 .
- Tabla 22.** Datos experimentales de promedio del porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamiento: a_2b_0 .
- Tabla 23.** Datos experimentales de promedio del porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamiento: a_0b_1 .
- Tabla 24.** Datos experimentales de promedio del porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamiento: a_1b_1 .
- Tabla 25.** Datos experimentales de promedio del porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamiento: a_2b_1 .

ANEXO C-2

- Gráfico 1. Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a_0b_0
- Gráfico 2. Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a_0b_1
- Gráfico 3. Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a_1b_0
- Gráfico 4. Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a_1b_1
- Gráfico 5. Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a_2b_0
- Gráfico 6. Porcentaje de acidez en función del tiempo. Tratamientos: a_2b_1

ANEXO D

- Tabla 26.** Valores experimentales de los porcentajes de acidez alcanzados a las dos horas de fermentación de las diluciones de melaza utilizada a diferentes concentraciones (20,30 y 40% (p/v)) y grados de pureza en tres réplicas. Tratamientos: a_0b_0 , a_0b_1 , a_1b_0 , a_1b_1 , a_2b_0 , a_2b_1 .
- Tabla 27.** Valores experimentales de los porcentajes de acidez alcanzados a las cuarenta y ocho horas de fermentación de las diluciones de melaza en tres réplicas. Tratamientos: a_0b_0 , a_0b_1 , a_1b_0 , a_1b_1 , a_2b_0 , a_2b_1

ANEXO E

- Tabla 29.** Tabla estadística ANOVA del porcentaje de acidez a las dos horas de fermentación. Tratamientos: a_0b_0 , a_0b_1 , a_1b_0 , a_1b_1 , a_2b_0 , a_2b_1
- Tabla 30.** Tabla estadística ANOVA de los porcentajes de acidez a las cuarenta y ocho horas de fermentación. Tratamientos: a_0b_0 , a_0b_1 , a_1b_0 , a_1b_1 , a_2b_0 , a_2b_1
- Tabla 31.** Tabla estadística Tukey a las cuarenta y ocho horas de fermentación verificación del mejor tratamiento.

ANEXO F

- Tabla 32.** Materiales directos e indirectos para la producción de un litro de ácido láctico de 2.87% de acidez.
- Tabla 33.** Costo por hora del proceso aplicado asumiendo una producción de un litro de ácido láctico de 2.87% de acidez.
- Tabla 34.** Estudio de la inversión para la producción de un litro de ácido láctico de 2.87% de acidez

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema:

**"PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE EL USO DE
Lactobacillus rhamnosus, A PARTIR DE MELAZA"**

AUTOR

Barrera Vaca Rosa Verónica

TUTOR:

Ing. María Teresa Pacheco

RESUMEN EJECUTIVO

La melaza (miel final subproducto de la industrialización de la caña de azúcar), es un desecho agroindustrial representa una alternativa para la producción biotecnológica de ácido láctico, por su alto contenido de nutrientes y azúcares así como por su bajo costo. El objetivo del trabajo de investigación fue desarrollar una tecnología adecuada determinando las condiciones necesarias, utilizando la melaza a diferentes concentraciones (20,30,40%(p/v)) como materias fermentables; se probó también la pureza de la misma para el proceso de fermentación.

Las fermentaciones se realizaron anaeróbicamente, a 42⁰C, ajustando el pH a 6, usando el 10 % de *Lactobacillus rhamnosus* liofilizado en un fermentador (shecker) en él se puede controlar la temperatura y agitación. Para las mezclas mencionadas se estudió el efecto de la concentración de ácido láctico alcanzado durante el tiempo de fermentación.

Se obtuvieron concentraciones de 2,87% de ácido láctico usando diluciones de melaza: 30% (p/v), filtrada. Con las siguientes características; índice de refracción 1.378, punto de ebullición 108.5°C, viscosidad 0.024 Pa.s, densidad 1114.83 (Kg/m³), pH 4.5, por lo que se concluye que la melaza sería una buena alternativa de aprovechamiento de residuos agroindustriales.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. TEMA.

“PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA”.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.2.1 CONTEXTUALIZACIÓN.

El ácido láctico fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blonodeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littlelon inicia la fermentación a escala industrial. Es un compuesto muy versátil utilizado en la industria química, farmacéutica, de alimentos y de plásticos

La producción mundial de ácido láctico es de 100.000 toneladas por año (Datta *et al.*, 1995 citado por Wang-Yu *et al.*, 2004), con un crecimiento en la demanda del 8,6% anual, debido al potencial que tiene este monómero de producir ácido poliláctico, un polímero biodegradable con aplicaciones industriales y médicas (Lisa, 2001; Naveena *al.*, 2005).

El ácido láctico puede ser obtenido por vía química o biotecnológica. La producción química, se basa en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico; otro tipo de reacción se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador.

La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos. (Goksungur y Guvenc, 1999; Szabo y Kirisci, 1998).

La principal desventaja de la producción por la vía fermentativa es el alto costo que ocasionan su aislamiento y purificación, por esta razón las investigaciones se han enfocado en la disminución del costo de producción e incrementar la pureza óptica del ácido láctico. (Goksungur y Guvenc, 1999; Szabo y Kirisci, 1998).

Se han utilizado diferentes sustratos puros, tales como glucosa, lactosa, almidón y celulosa, sin embargo, estos sustratos son económicamente desfavorables, no sólo porque los sustratos puros son costosos y requieren la adición de fuentes nitrogenadas complejas para producir ácido láctico en un tiempo razonable, sino también porque se requiere de un pretratamiento de los polisacáridos naturales para su posible fermentación. (Young-Jung *et al.*, 2004).

De acuerdo con Tejayadi y Cheryan (1995) citado por Oh *et al.* (2005). El costo de la materia prima en el proceso de producción de ácido láctico a partir de lactosuero y extracto de levadura con *Lactobacillus bulgaricus*, representa el 68%. Akerberg y Zacchi (2000) demostraron también que el mayor costo de producción lo representa la materia prima, y Kwon *et al.* (2000) indican que solamente el extracto de levadura representa más del 30% de los costos.

Los factores limitantes en la producción de ácido láctico por la vía fermentativa son principalmente, la baja concentración de bacterias lácticas en el sistema y la inhibición del crecimiento por el producto. (Monteagudo y Aldavero, 1999; Kulozik, 1998).

La mayoría de los estudios para la producción de ácido láctico están direccionados a nivel industrial y se enfocan al uso de suero de leche o medios sintéticos conteniendo lactosa, sacarosa o glucosa como única fuente de carbono mas no mediante la producción biotecnológica que se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos.

Las empresas: CCA Biochemical BV of The Netherlands con plantas en Europa, Brasil, y USA. Archer Daniels Midland (ADM) en USA. NatureWorks LLC en USA, han optado por la fermentación como proceso para sintetizar ácido láctico alcanzando el 90% de la producción.

Por lo anteriormente dicho, se sigue investigando activamente en la búsqueda de sustratos de fermentación láctica de bajo costo, bajo nivel de contaminantes, alta velocidad de fermentación, alto rendimiento en ácido láctico, poca formación de subproductos y disponibilidad durante todo el año.

Se pueden considerar dos métodos para la producción de ácido láctico:

Por fermentación:

- Bacterias
- Hongos

Por métodos químicos:

- Hidrólisis alcalina de los azúcares, empleando hidróxidos o carbonatos.

En la producción fermentativa de ácido láctico, los microorganismos utilizados pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, no obstante; debido a que una de las problemáticas es el alto costo de producción se han venido estudiando mezclas de cepas lácticas y no lácticas que permiten degradar sustratos complejos y/o mejorar los rendimientos. (Monteagudo y Aldavero, 1999; Kulozik, 1998).

Las materias primas utilizadas son cualquier producto que contenga azúcar o hidratos de carbono, estos productos están agrupados en tres grandes grupos.

Materias primas:

- **Materias azucaradas:** Mostos y jugos de diversas frutas, azúcar de remolacha y caña, melazas, sorgo azucarado, suero de leche.
- **Materias amiláceas:** Cereales que contengan almidón, tubérculos y raíces tales como patatas y yuca.
- **Materias celulósicas:** Maderas y sus residuos, paja, residuos agrícolas, líquidos sulfíticos residuales de la fabricación del papel que contiene azúcar, derivados de la celulosa y de hemicelulosa por la hidrólisis.

También es posible usar melazas, aunque plantean problemas en las etapas de recuperación [Moo-Young, 1986]. La disponibilidad de las mieles incristalizables como materia prima puede ser ventajosa, considerando que estas son poco empleadas, algunas cantidades desperdiciadas y otra cantidad exportada.

La melaza (miel final), en Ecuador representa una alternativa para la producción biotecnológica de ácido láctico, principalmente por su alto contenido en azúcares, así como por su bajo costo.

La cantidad de azúcar se calcula como producción de melaza de alta calidad, que en Ecuador es de 8.28 toneladas por 12 toneladas de caña. Como se detalla en la Tabla 1.

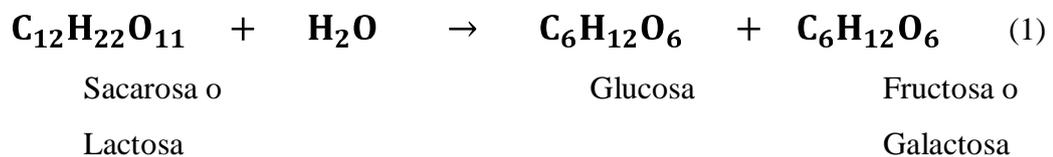
Tabla 1.- Producción mundial de caña de azúcar en países tropicales.

País	Maíz en grano		Sorgo en grano		Tubérculo de yuca		Caña de azúcar (melaza de alta calidad)	
	T	TND (t)	T	TND (t)	T	TND (t)	T	TND (t)
México	1.2	0.96	2.5	2.00			11.4	7.48
Jamaica	1.2	0,96			2.3	0.40	12.6	8.28
Ecuador	0.5	0.40			7.1	1.24	12.6	8.28
Perú	1.6	1.28	1.7	1.36	11.9	2.07	26.5	17.41
China	2.4	1.92	1.6	1.28	16.1	2.80	13.4	8.80

Fuente: Anuario de producción de la FAO.2005

La fermentación en general obedece a secuencias muy similares en los diferentes procesos, observando pequeñas variaciones únicamente en lo que respecta a algunas condiciones de trabajo como: microorganismo adecuado, temperatura óptima de actividad, nutrientes específicos, pH requerido en base a la materia prima empleada, requerimiento de oxígeno, duración de la fermentación y producto que se requiere obtener.(Dautant.1985)

Las reacciones de fermentación pueden expresarse como:



Se puede obtener una gran variedad de productos mediante fermentación en la industria de alimentos clasificándose de la siguiente manera:

- Fermentaciones no alcohólicas

Panadería (fermentación por levaduras de panadería), vegetales fermentados, (encurtidos en general), ensilado (fermentación de forraje).

- Fermentaciones alcohólicas

Vino (fermentación alcohólica y maloláctica), cerveza, sidra, destilados, vinagre (transformación de alcohol en ácido acético por fermentación con acetobacter)

- Fermentaciones cárnicas

Embutidos crudos curados (salame, chorizo español), · jamón serrano (producto curado), · productos de pescado fermentado (fermentación en filetes de pescado ahumado)

- Fermentaciones lácticas

Leches fermentadas en general, yogur (fermentación de leche con microorganismos acidificantes, como *lactobacillus*), quesos (fermentación con determinados cultivos bacterianos inoculados), bebidas lácticas alcohólicas (kefir).

- Fermentaciones locales especiales

Salsa de soya, miso, tofu, otros productos.

- Otras aplicaciones en tecnología enzimática y biocatálisis

Mejora genética de microorganismos.

Figura 1. ÁRBOL DE PROBLEMAS.

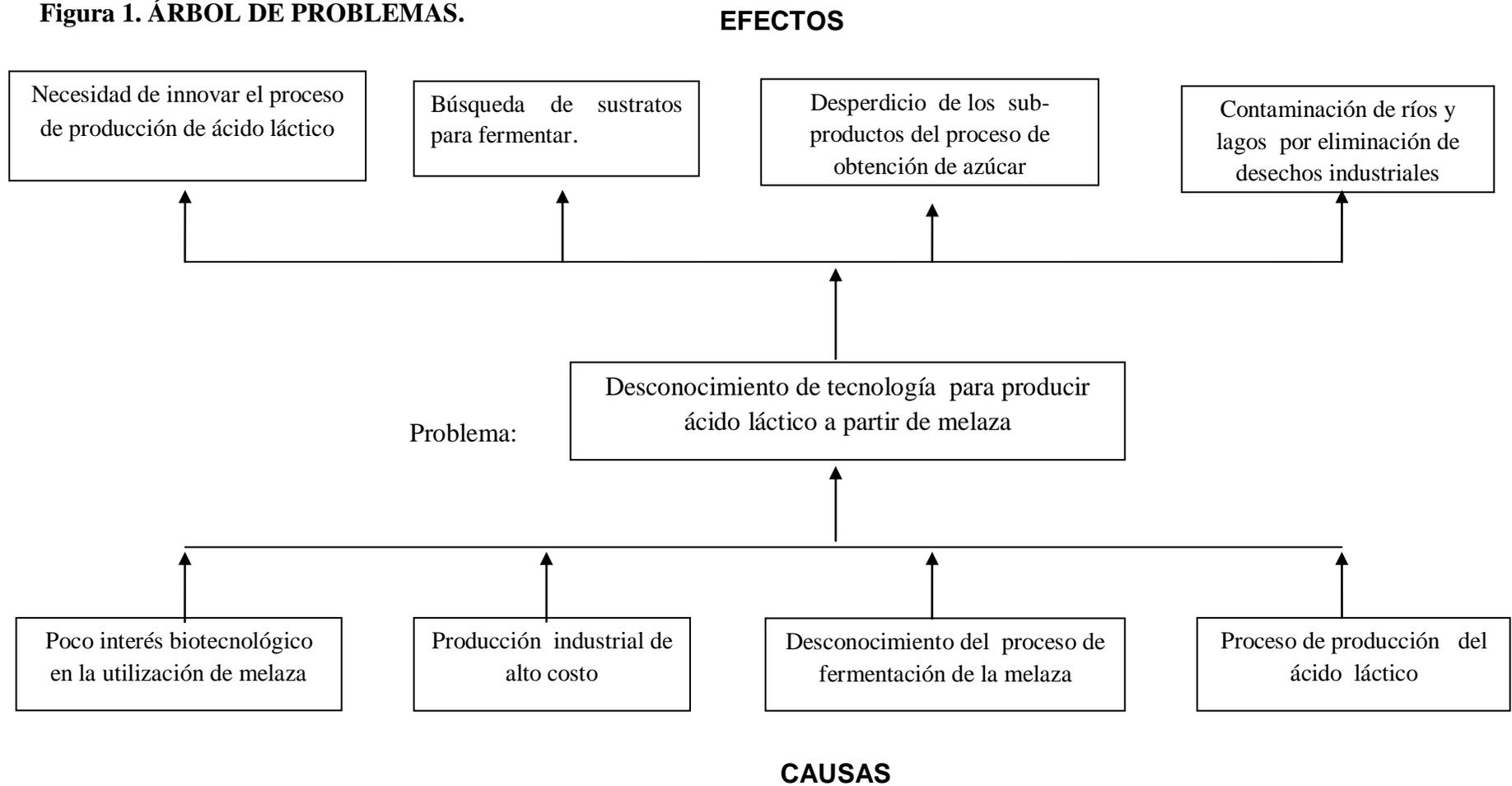


Figura 1: Árbol de problemas sobre el uso de melaza para la producción de ácido láctico.

Elaborado por: Verónica Barrera. (2011)

1.2.2 ANÁLISIS CRÍTICO.

Un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados, como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso. Otros aspectos que son también importantes se refieren a todos los procesos y operaciones previas y posteriores a la etapa de fermentación y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos.

Al representar la materia prima el mayor costo de producción al utilizar lacto suero y extracto de levadura se sigue investigando en la búsqueda de sustratos de fermentación láctica de bajo costo, bajo nivel de contaminantes, alta velocidad de fermentación, alto rendimiento en ácido láctico, poca formación de subproductos y disponibilidad durante todo el año.

Mediante ensayos adecuados con soluciones diluidas de melazas, se ha demostrado que éstas, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias. Es así que siguiendo una secuencia en el proceso de fermentación de la melaza sería la materia prima para un producto de gran aplicación.

Varios compuestos químicos pueden ser, o lo son ya, reemplazados por compuestos microbiológicos en todos los campos de la producción. La tendencia mundial va en busca de una producción más limpia, lo que ha abierto un campo para el desarrollo de productos biológicos estables, eficaces y de bajo impacto ambiental. Aunque existen técnicas de mejoramiento químico para lograr un mejor producto en las diferentes fermentaciones a nivel industrial y para su uso a

nivel ambiental, generalmente es una mejor opción el trabajar con fuentes naturales inalteradas.

1.2.3 PROGNOSIS

De no solucionarse el problema señalado en el área focalizada, se podrían esperar las siguientes consecuencias:

- No se impulsaría la utilización de melaza en la producción de ácido láctico en la industria biotecnológica ni tampoco estudios posteriores que involucren el mejoramiento del mismo.
- Afección directa en la producción y comercialización de ácido láctico.
- Altos costos de productos procesados que requieren el uso de ácido láctico en su formulación, debido a la importancia de este recurso.

1.2.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál será la metodología adecuada para producir ácido láctico mediante el uso de *Lactobacillus rhamnosus* sobre la melaza de caña de azúcar?

1.2.5 INTERROGANTES DE LA INVESTIGACIÓN

- ¿Cómo se puede utilizar la melaza para la obtención de ácido láctico?
- ¿Cuál será la concentración más adecuada para obtener ácido láctico?
- ¿Cuál será el costo y el rendimiento del ácido láctico producido a base de melaza de caña de azúcar?

1.2.6 DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN

Delimitación del contenido:

Campo: Biotecnológico

Aspecto: Fermentación

Área: Tecnológico

Delimitación Temporal: La investigación se realizó durante los meses de Noviembre 2010 – Abril 2011.

Delimitación Espacial: La investigación se realizó en la Universidad Técnica de Ambato, específicamente en los Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Esta investigación es de gran interés porque promueve el estudio de nuevas fuentes de sustratos utilizados para la producción de ácido láctico como es la melaza, que corresponde a un producto residual del proceso de elaboración de azúcar, para la sustitución total o parcial de la materia prima generalmente utilizada.

Por la escasa investigación sobre el uso de la melaza (miel de desecho obtenida de la caña de azúcar al producir el azúcar refinado) en procesos biotecnológicos se da la aplicación de otros métodos para producción de ácido láctico.

Es factible porque existe acceso a información, en revistas técnicas e internet, hay también varios recursos biotecnológicos en los laboratorios y docentes dispuestos a transmitir sus conocimientos.

El interés biotecnológico de la utilización de la melaza se debe que es un desecho de la industria azucarera que se destina para alimento de animales por lo cual no debe ser afectado en su composición mucho menos contener restos de químicos que afecten a los mismos, es por eso la necesidad de innovar un proceso de producción de ácido láctico para que el residuo sea aprovechado y no forme parte de los contaminantes que generalmente son desechados a los ríos o vegetación de nuestro país.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar la tecnología más adecuada para aprovechamiento la melaza como materia prima fermentable en el proceso de producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la concentración óptima de melaza para la producción de ácido láctico.
- Demostrar la influencia de los métodos de purificación sobre la producción de ácido láctico.
- Determinar el rendimiento, costo y propiedades del ácido láctico, obtenido mediante la acción de *Lactobacillus rhamnosus* sobre la melaza de caña.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Visitada la biblioteca de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos e internet se encontraron los siguientes trabajos:

ERAZO en 1981, investigó sobre la “Obtención de Alcohol Eílico a partir de Melaza” y determinó las condiciones más favorables para dicha producción.

DAUTANT F,1985, realizó un estudio sobre la producción de ácido láctico a partir de un proceso de fermentación de melaza, teniendo como finalidad la evaluación económica para determinar la factibilidad de uno de los procesos industriales para la fermentación empleando como materias primas mieles sub producto de la industria azucarera.

MORALES Oscar, 2003 , en su estudio se enfocó al rendimiento que se tiene al utilizar *Latobacillus delberki* en medios sintéticos que contengan lactosa, sacarosa y glucosa como única fuente de carbono.

SERNA Liliana (2004), estudió la producción de ácido láctico, conversión de glucosa y el rendimiento del producto de *Lactococcus lactis* aislado de cultivos de caña de azúcar , *Streptococcus salivarius* aislado de un fermento comercial y de una mezcla de ambas cepas en fermentación a escala de laboratorio utilizando como sustrato caldo MRS adicionado de glucosa.

SERNA Liliana (2005) , evaluó los potenciales de las mezclas de jugos de cogollos y hojas, con jugo de caña de azúcar cosechado con quema , y con jugo de caña de azúcar cosechado sin quema como sustratos en la producción fermentativa de ácido láctico.

SOLÁ Gustavo, en el (2006) de acuerdo a estudios realizados determinó el contenido de lactosa presente en diferentes muestras de suero de leche, a fin de determinar la factibilidad de la utilización del suero procedente de la producción de quesos para la producción de ácido láctico por fermentación

WALDIR Estela, propuso en el 2007, optimizar la producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus plantarum* L10 cultivado en sistemas batch y continuo, así como también optimizar la composición del medio de fermentación para facilitar el proceso de aislamiento y purificación del producto.

CASTRO,G.B.(2007), en su investigación sobre “Aprovechamiento biotecnológico de glucosa, fructosa y sacarosa para la producción de ácido láctico”, estudia el aprovechamiento biotecnológico de mieles para la producción de ácido láctico, determinando las condiciones adecuadas de fermentación que permitan un alto rendimiento.

GIL-HORÁN Ricardo en el 2007, en su estudio: Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja, estableció procesos de separación, y purificación y diseñó un proceso para la obtención de ácido láctico a partir de la biorreacción en fase sólida de cáscara y bagazo de naranja, con *Rhizopus oryzae*

2.2. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA

Esta investigación, se ubica en el paradigma positivista, según Moo Young, 1986, ya que tiene la visión de una realidad y una comprensión especial que puede ser dinámica ya que está en constante cambio y establece propuestas viables que permiten superar el problema.

Además tiene un fundamento de carácter académico científico con clara predisposición dialéctica en la que predomina el análisis, porque permite desglosar las partes del tema investigativo.

2.3. FUNDAMENTACIÓN SOCIOLÓGICA

El perfil de investigación científica está diseñado para el beneficio de las personas, que es razón y fundamento de toda investigación científica. El ser humano necesita tener a su alcance nuevos elementos para su bienestar, por ello el trabajo planteado.

Para la realización de la siguiente investigación no se dispone de una norma específica que regule el proceso seguido o la calidad del producto. Se dispone de la ficha técnica del ácido láctico comercial de acuerdo a la casa fabricante reportada.

2.4. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

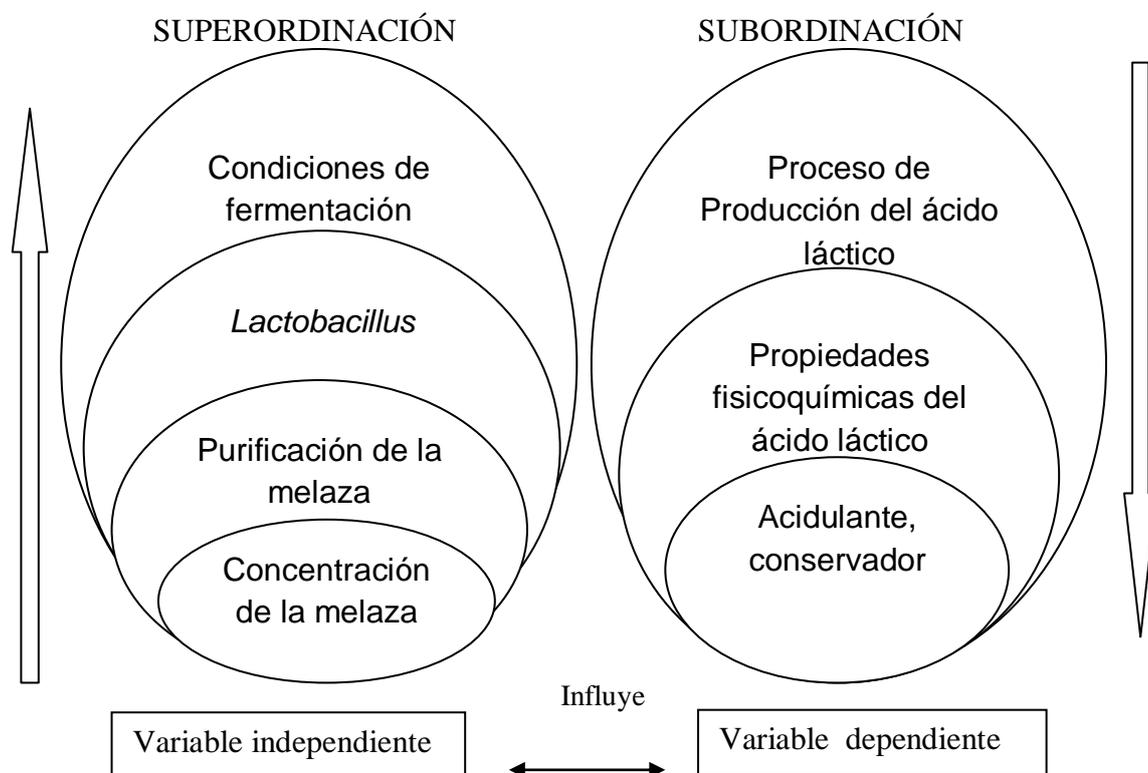


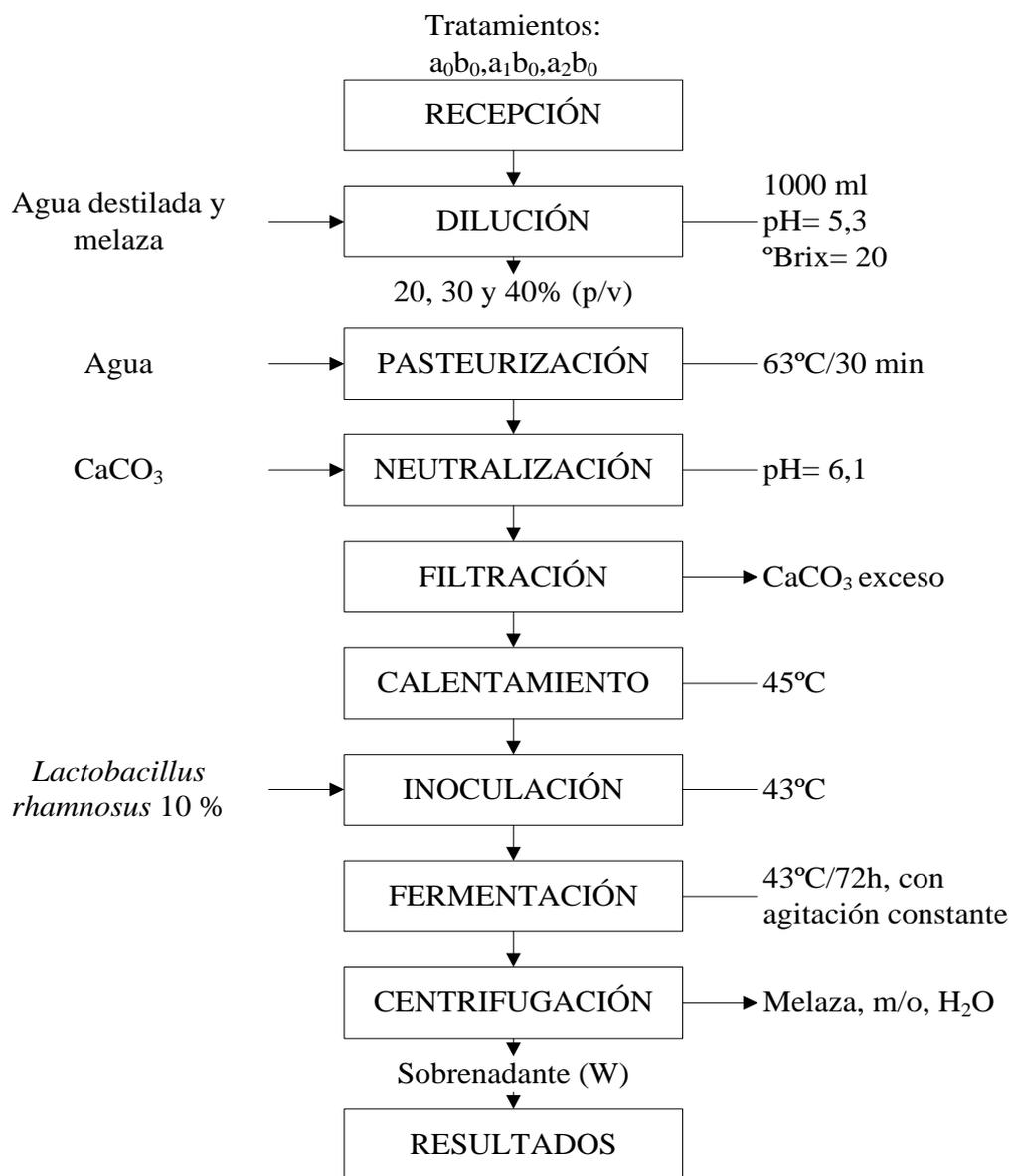
Figura 2. Categorías fundamentales de la producción de ácido láctico a partir de melaza

Elaborado por: Verónica Barrera, 2011

2.4.1. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.

La metodología experimental se resume en los diagramas de flujo 1 y 2 en los cuales se especifica las condiciones y requerimientos para la producción de ácido láctico mediante el uso de *Lactobacillus rhamnosus* a partir de melaza, de acuerdo al estudio realizado en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad.

**DIAGRAMA DE FLUJO 1.- PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO
MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA.**



Adaptado de: CASTRO, G.B. Investigación “Aprovechamiento biotecnológico de glucosa, fructosa y sacarosa en la producción de ácido láctico”. (2007)

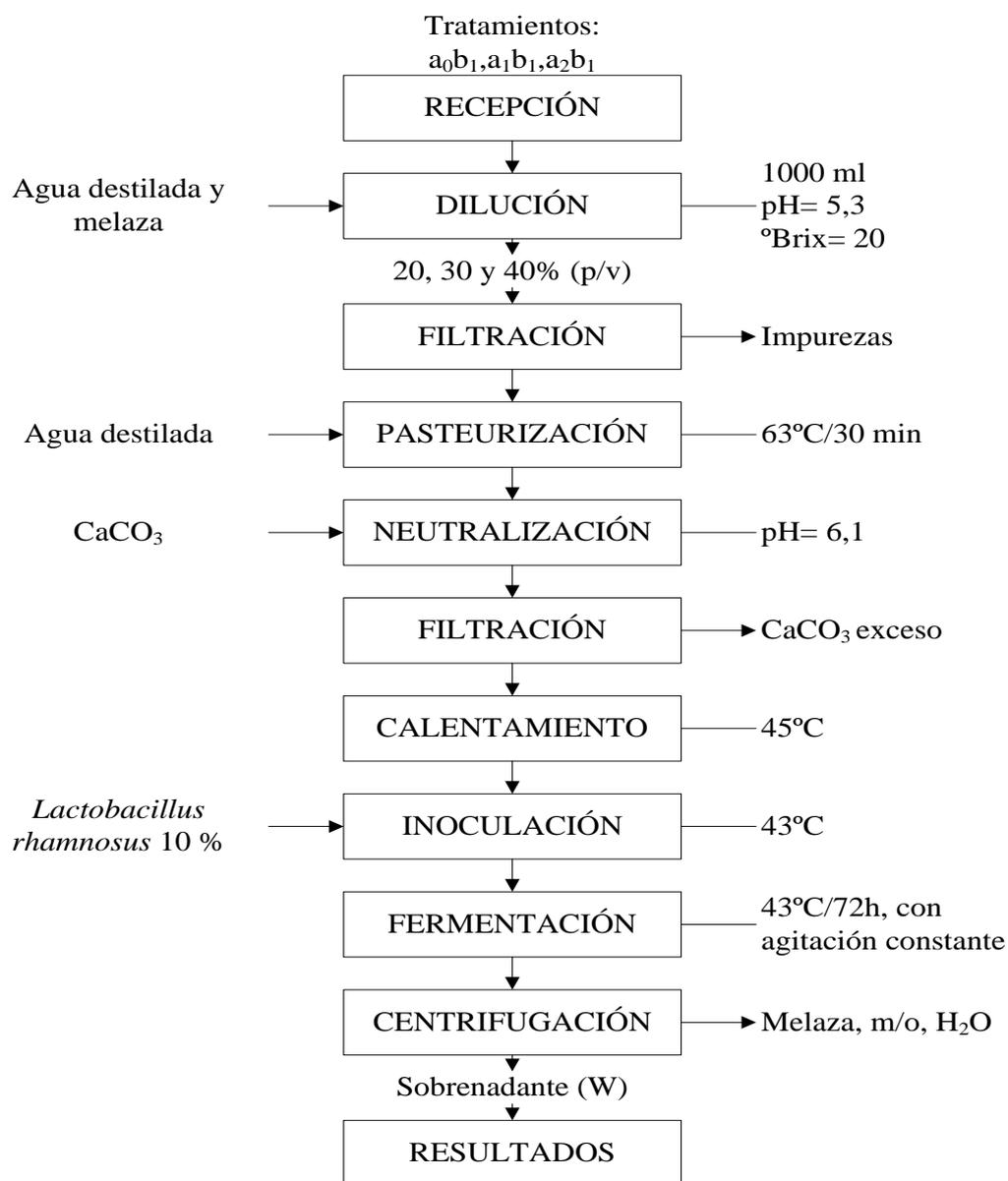
Tratamientos:

$a_0 b_0$: melaza 20 % (p/v), sin filtrar.

$a_1 b_0$: melaza 30 % (p/v), sin filtrar.

$a_2 b_0$: melaza 40% (p/v), sin filtrar.

**DIAGRAMA DE FLUJO 2.- PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO
MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA.**



Adaptado de: CASTRO, G.B. Investigación “Aprovechamiento biotecnológico de glucosa, fructosa y sacarosa en la producción de ácido láctico”.(2007)

Tratamientos:

a₀ b₁: melaza 20% (p/v), filtrada.

a₁ b₁: melaza 30% (p/v), filtrada.

a₂ b₁: melaza 40% (p/v), filtrada.

DESCRIPCION DEL PROCESO.

RECEPCIÓN

Para este estudio las muestras se obtuvieron a través de la colaboración de las personas que trabajan en los laboratorios del Ingenio San Carlos.

Se recibió diez litros de melaza de la última zafra realizada en el mes de diciembre de los tanques de almacenamiento que se encuentran a una temperatura de 8 grados centígrados y 85,7 grados brix, los mismos que son utilizados para el análisis en el laboratorio del Ingenio.

Se trabajó con un porcentaje en peso de:

Tratamientos	Melaza	Agua
a ₀ b ₀ sin filtrar	20% melaza	80% agua
a ₁ b ₀ sin filtrar	30% melaza	70% agua
a ₂ b ₀ sin filtrar	40% melaza	60% agua
a ₀ b ₁ filtrado	20% melaza	80% agua
a ₁ b ₁ filtrado	30% melaza	70% agua
a ₂ b ₁ filtrado	40% melaza	60% agua

Elaborado por: Verónica Barrera, 2011.

Figura 3. Melaza de caña de azúcar



DILUCIÓN

Debido a su elevada concentración de azúcar, la melaza no permite una fermentación directa, por lo tanto primero debe ser diluida a la concentración deseada. Se pesaron 200 gramos de melaza y se la mezcló con agua destilada obteniendo la concentración deseada para el proceso de fermentación (20,30 y 40 %).

Figura 4 Pesado de la melaza



Balanza digital (precisión de 0.1g)

Figura 5. Muestras de melaza diluida



PASTEURIZACIÓN

La pasteurización de la melaza fue realizada a baño maría a 63°C por 30 minutos para evitar contaminación del producto.

Figura 6. Pasteurización de la melaza

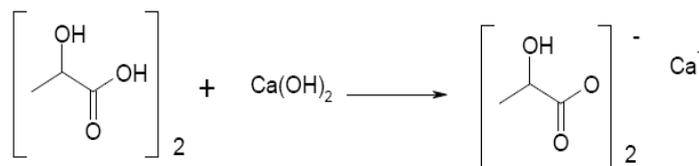


Termómetro (con escala de 0-200°C)

NEUTRALIZACIÓN

La fermentación transcurre de modo inmejorable cuando el pH está dentro de la zona ácida pero cercano a la neutralidad, lo que tiende a presentarse por la de carbonato de calcio o hidróxido de calcio.

Reacción de neutralización del ácido láctico.



Si no se neutraliza el ácido láctico, las bacterias no pueden tolerar la gran acidez desarrollada y se interrumpe la fermentación. Puede añadirse Ca(OH)_2 al principio de la fermentación ó intermitentemente a medida que ésta progresa. La ventaja de añadir el carbonato intermitentemente estriba en que, la reacción ácida del medio impide el desarrollo de los contaminantes. El pH se puede mantener en un valor constante por regulación continua, lo cual permite incrementar los rendimientos y velocidades de producción.

El pH óptimo del proceso fermentativo mediante *Lactobacillus rhamnosus*, está comprendido en un rango de 5.5 a 6.5. Si el medio es demasiado ácido, detiene la actividad de las enzimas y si es demasiado alcalino las fermentaciones producen hidrógeno e hidrógeno sulfídrico (H_2S).

Figura 7. Neutralización de la dilución de melaza



Muestras de melaza diluida y neutralizadas
Carbonato de calcio y pHmetro digital

FILTRACIÓN

Luego de la adición de carbonato de calcio, a la dilución, para su neutralización; quedan residuos y sedimentos los cuales se eliminaron al ser filtrados mediante embudos de vidrio y papel filtro.

Figura 8. Filtración de la dilución de melaza



CALENTAMIENTO

Las muestras fueron calentadas a 45°C para proceder a la inoculación, empleando baño maría y un termómetro.

Figura 9. Calentamiento de las muestras de dilución de melaza



INOCULACIÓN

Se inoculó *Lactobacillus rhamnosus*, por siembra directa al diez por ciento para cada tratamiento, tras el ajuste del pH, y control de temperatura para el ingreso de las muestras al equipo de fermentación.



Imagen de Lactobacillus rhamnosus,

FERMENTACIÓN

El proceso se lleva a cabo en un amplio rango de temperaturas, desde 35 hasta 45 °C. La temperatura óptima es de 43 °C con el uso de *Lactobacillus rhamnosus*. La agitación es importante para que el microorganismo trabaje y que la dilución sea homogénea.

Duración de la fermentación: Las bacterias requieren de un cierto tiempo para degradar la materia orgánica. La velocidad de degradación depende en gran parte de la temperatura, ya que a mayores temperaturas el tiempo de retención requerido para obtener una buena producción es menor ya que la fermentación con *L. rhamnosus* suele completarse en el espacio de 70-72 horas; se aplico este tiempo en el mencionado proceso, con agitación continua de las muestras colocadas en frascos plásticos con tapa, de un litro de capacidad, para cada tratamiento; y control de la temperatura con termómetro de escala 0 a 200°C, en el fermentador Skaker.

Figura 10. Equipo fermentador



Figura 11. Muestras preparadas



Figura 12. Proceso de fermentación



CENTRIFUGACIÓN

La centrifugación es una técnica de separación de las partículas que se basa en la distinta velocidad de desplazamiento de las partículas de un medio líquido al ser sometidas a un campo centrífugo. Las muestras se centrifugan a 200 rpm con el fin de diferenciar dos capas la del producto obtenido y su residuo.

Figura 13. Centrifugado de las muestras



Figura 14. Producto



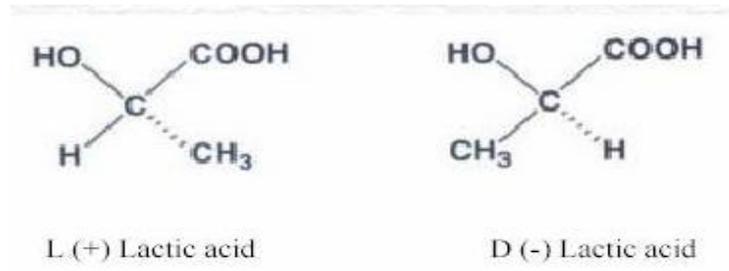
2.4.2 PERFIL DEL PRODUCTO

El ácido láctico es un compuesto ternario formado por carbono, oxígeno e hidrógeno. Es soluble en éter, miscible con agua y alcohol e insoluble en cloroformo, éter del petróleo y disulfuro de carbono.

Es fuertemente higroscópico y la presencia de dos grupos funcionales en su estructura (-OH, -COOH) lo hace formar, espontáneamente, dímeros y polímeros de ácido láctico y llevar a cabo diferentes reacciones químicas de oxidación, reducción, condensación y sustitución del grupo alcohol.

El ácido láctico es el hidroxiaácido más sencillo que existe. Presenta isomería óptica: L(+) o D(-), aunque es más común encontrarlo como mezcla racémica. Bulut, S.2004

Figura 15. Isomería óptica L(+) o D(-)



Fuente: Bulut, S.2004

Se presenta bajo tres formas:

- Dextrógira
- Levógira
- Racémica

El ácido comercial es de la forma inactiva o racémica, constituida por una mezcla de las formas dextrógira y levógira, y se vende en solución con un 85% de ácido y algunas impurezas orgánicas.

Es uno de los principales intermediarios metabólicos en la mayoría de los organismos vivos, desde procariontes anaerobios hasta humanos.

Los usos del ácido láctico pueden dividirse en dos categorías:

- Alimenticias y
- No alimenticias.

En general, el ácido láctico puede usarse como acidulante en cualquier clase de alimentos o bebidas, a causa de su sabor agradable y su marcada acción conservadora.

El material de partida para esta calidad de ácido es el lactato cálcico bruto obtenido luego de la centrifugación, el lactato cálcico se emplea en los polvos de repostería, en la panificación y en productos farmacéuticos. Así también como transportador de calcio en los alimentos, en los casos de deficiencia de calcio.

En el campo de la medicina en forma de un lactato cálcico muy puro para corregir alteraciones del metabolismo del calcio. Se usa en la industria de los plásticos, tiene importancia en el desencalado durante el curtido del cuero, para el teñido ácido de la lana, en la producción de resinas fenólicas como catalizador, y como agente dispersante en la industria de pinturas. www.acidolactico.com

También pequeñas cantidades de ácido L-láctico están presentes en la sangre y en otros fluidos y órganos del cuerpo; este ácido se forma en los tejidos, sobre todo los musculares, que obtienen energía metabolizando azúcar en ausencia de oxígeno. La acumulación de grandes cantidades de este ácido en los músculos produce fatiga y puede causar calambres.

Concentración del ácido láctico.

El ácido láctico comercial se vende en soluciones cuya concentración varía desde 22 a 50%. Se obtiene por acidificación directa del líquido fermentado que resulta de un substrato impuro de carbohidratos. La calidad depende del método de producción y el grado de refinación. (Dautant. 1985)

Para fines comestibles la concentración oscila desde 50 al 70% para este grado se especifica que solo se deben encontrar huellas de ácido sulfúrico, contaminantes, hierro, metales pesados y no presentar olor. El ácido láctico de alta pureza tendrá una concentración que varíe del 85 al 90% y debe ser completamente incoloro. (Dautant.1985)

1. Ácido láctico crudo, técnico o comercial (concentraciones de 22, 44 y 50 %)
2. Ácido láctico para usos alimenticios (concentraciones de 44 y 50 %)
3. Ácido láctico transparente o para plásticos (concentraciones de 65 y 85%)
4. Ácido láctico grado U.S.P. (United States Pharmacopeia) (Conc. 90%)

El grado técnico o bruto se utiliza para desencalar las pieles durante el curtido. Los grados comestibles se emplean principalmente como acidulantes de alimentos y bebidas. La cantidad restante se convierte en plásticos, disolventes y algunos productos químicos. El grado USP es un producto farmacéutico antiguo y bien establecido. (Dautant, 1985)

Las normas que han de cumplir estas calidades suelen estar, determinadas por los consumidores en relación con sus necesidades. Estas normas especifican el color, sabor y aroma, además del contenido de cenizas.

Propiedades del ácido láctico

El ácido láctico es inodoro y está clasificado como GRAS (generally regarded as safe) por la FDA en los E.E.U.U., a más de ser un componente terciario, formado por carbono, oxígeno e hidrógeno. Es soluble en agua y en disolventes orgánicos miscibles con agua, etanol y acetona. En la tabla 2 se muestran las propiedades del ácido láctico.

Tabla 2. Propiedades del Ácido Láctico.

Ácido 2-hidroxi-propanoico-Fórmula $C_3H_6O_3$	
Peso molecular	90,08 g/mol
Índice de refracción	1,4414
Punto de fusión	L(+) y D(-) 52,8 a 54 °C
Punto de ebullición	125-140 °C
Gravedad específica	1.206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40,33 mNsm ⁻²
Densidad	1,249 Kg/m ³
Constante dieléctrica	22ε

Fuente: www.acidolactico.com (2010).

Es importante mencionar que sin ser corrosivo puede producir inflamaciones en caso de contacto breve o repetido, pudiendo causar irritación de la piel y los ojos por contacto. Por lo cual se recomienda evitar contacto con ojos y piel, y no inhalar vapores.

Acidulante, conservador y saborizante.

Su interés radica en varios aspectos, siendo uno de los más destacados su aplicación en la industria alimentaria, debido a sus propiedades como acidulante y conservante.

Como acidificante se emplea en confitería y fabricación de extractos, esencias y zumos de frutas, limonadas, variantes, jarabes y otros productos. También puede emplearse en el curado de la carne y en la conservas de pescado y vegetales.

En las coles ácidas y guisantes actúa como preservativo de la putrefacción. Se emplea también para acidular los extractos de malta en la manufactura de cerveza, para ajustar la acidez de la salmuera en la preparación de aceitunas, para impedir el desarrollo de las bacterias de ácido butírico en la fabricación de levadura y en la fabricación de bebidas efervescentes.

Los acidulantes son sustancias adicionadas a géneros alimenticios con la función de intensificar el gusto ácido de alimentos y bebidas. También influyen en la conservación microbiológica de los alimentos. Los ácidos utilizados en tecnología alimenticia pueden ser obtenidos a partir de ciertos procesos de fermentación o por síntesis.

2.4.3 MATERIA PRIMA

Durante años han sido estudiados una gran cantidad de carbohidratos y materiales nitrogenados para la producción de ácido láctico. Se han investigado atendiendo a una alta producción del ácido láctico, una producción óptima de biomasa, una formación insignificante de subproducto, una rápida tasa de fermentación, menor pre-tratamiento, bajo coste, y fácil disponibilidad.

Las fuentes del carbono para el proceso de fermentación del ácido láctico pueden ser la glucosa, la maltosa, la sacarosa o materias primas como melaza y suero de queso o algunos subproductos agrícolas.

2.4.3.1. Melaza

La miel o también llamada melaza, es un líquido denso y viscoso de color oscuro, es producto final de la fabricación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar, se usa para alimentos concentrados para animales y como suplemento alimenticio para el hombre (Leeson y Summers, 2000).

Las melazas, mieles finales o melazas “blackstrap”, suelen ser definidas, por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos.

La Norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel final o melaza (no cristizable) al jarabe o líquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final lo que no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales, además contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña, así como los formados durante el proceso de manufactura del azúcar.

Estos compuestos no fermentables reductores del cobre, son principalmente caramelos libres de nitrógeno producidos por calentamiento requerido por el proceso y las melanoidinas que si contienen nitrógeno derivadas a partir de productos de condensación de azúcar y aminocompuestos (Honig, 1974).

Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables; las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de la melaza de caña de azúcar.

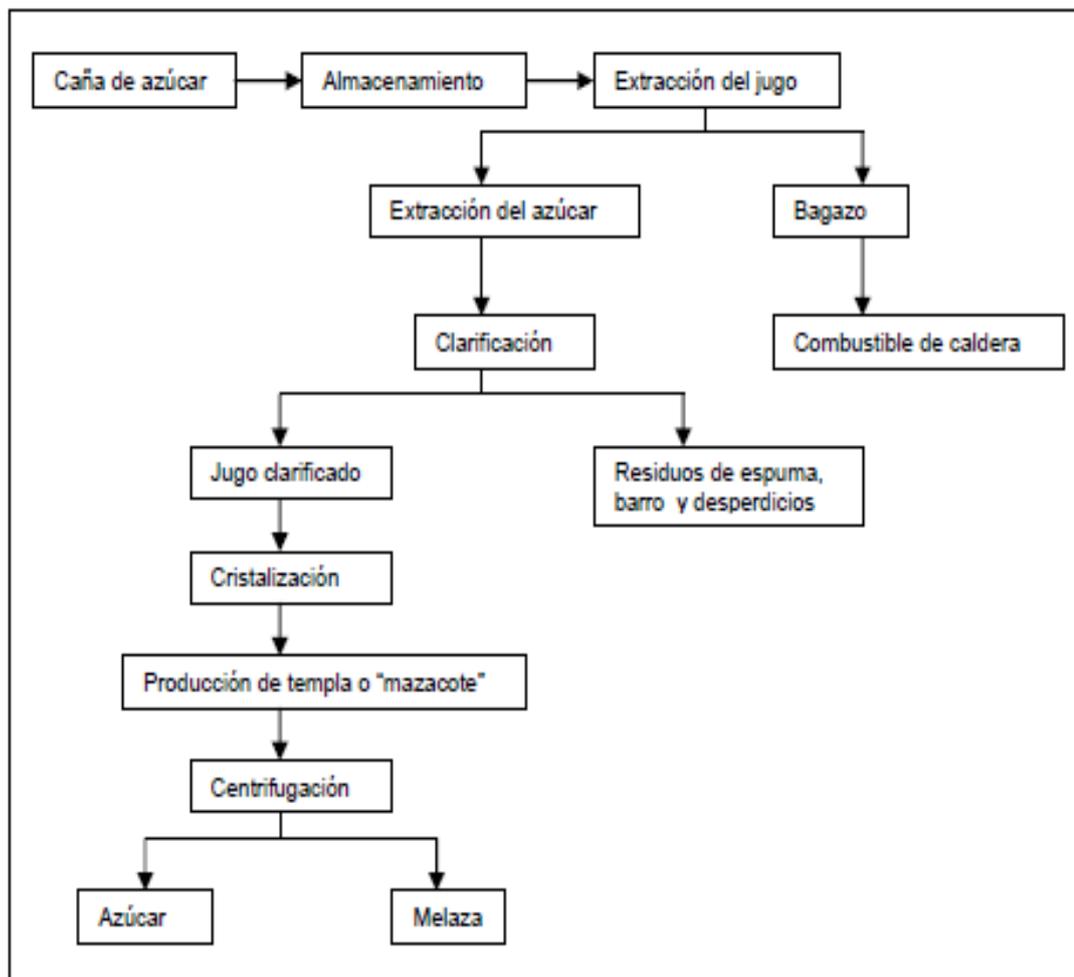
COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63% p/p
	Azúcares reductores	3-5% p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azucares)	4-8% p/p
	Agua	16%
	Grasa	0.40%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Contenido de aminoácidos.	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de vitaminas	Colina	600ppm
	Niacina	48.86ppm
	Ácido pantoténico	42.90ppm
	Piridoxina	44ppm
	Riboflavina	4.40ppm
	Tiamina	0.88ppm

Fuente: Tellez, 2004; Yepez, 1995.

Proceso de obtención

Las melazas se obtienen como un subproducto final de la elaboración del azúcar de caña. Se elabora mediante la cocción del jugo de la caña de azúcar hasta la evaporación parcial del agua que éste contiene, formándose un producto meloso semicristalizado. Se puede observar en la figura 16.

Figura 16.- Proceso de obtención de las melazas.



Fuente: Laboratorio del Ingenio San Carlos, 2008

Composición

La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos de 68-75% y un pH de 5.0-6.1 (Castro,1993) .

Composición variable: La miel final o melaza contiene la mayor porción de los azúcares del jugo de caña, junto con una porción de sacarosa y azúcares reductores se desprende que la composición debe variar con la variedad y madurez de la caña, las condiciones climáticas, el grado de molienda, la naturaleza de los procedimientos de clarificación y otros factores.

Durante el proceso de cocción ocurren ciertos cambios, cualitativa y cuantitativamente, los azúcares presentes en la miel difieren del jugo. Los cambios ocasionados por la acción de la cal u otros álcalis a temperaturas elevadas sobre los azúcares reductores, especialmente la levulosa, constituyen la fuente principal de los nuevos compuestos como melaninas que se encuentran en la miel.

Azúcares

Los principales azúcares en la melaza son la sacarosa (60-63% en peso), la glucosa o dextrosa (6-9% en peso), y la fructosa o levulosa (5-10% en peso); estas dos últimas constituyen la mayor porción de los azúcares reductores. La fructosa puede sufrir transformaciones al igual que la glucosa, debido a las reacciones dependientes de la temperatura. El contenido de glucosa y fructosa puede variar a causa de la hidrólisis de la sacarosa, a valores de pH ácido y a temperaturas altas (Castro, 1993).

No azúcares

Los no azúcares están compuestos por 33% de sustancias inorgánicas (Fe^{+++} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} , Hg^+ , Pb^+ y Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}); El 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes); y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, esterres, vitaminas, gomas y dextranos)(Castro, 1993).

Cenizas

En general la composición de las cenizas de las melazas, es cualitativamente similar al jugo, del cual se obtienen estas. Casi todos los análisis publicados, muestran que el contenido de potasa varía alrededor de 40% del peso de carbono total de la ceniza; el contenido de cal es del 10 al 20%, el de sulfatos varía entre el 10 y el 20%, y las sales de magnesio, sodio, aluminio, el sílice, los cloruros, fosfatos y los óxidos de hierro que completan el resto del contenido de cenizas (Castro, 1993).

Compuestos nitrogenados

Están constituidos principalmente por aminoácidos mono y dibásicos, amidas ácidas, betaínas y pequeñas cantidades de peptonas y nitratos. Cuando los azúcares reductores, glucosa y fructosa, son sometidos a los procesos de clarificación, en el tratamiento subsiguiente, se producen varias reacciones, siendo la más importante la de los aminoácidos con estos azúcares, formándose productos coloreados como las melaninas y los residuos fermentables en un contenido aproximado de 68% de nitrógeno combinado, en la melaza. El nitrógeno total de las melazas, varía entre 0.4 y 1.5% del peso total de la melaza.

Ácidos

El ácido aconítico, es el más abundante de los ácidos orgánicos presentes en la caña que se acumula en las melazas, representado aproximadamente el 6% del peso de sólidos en la melaza. Los ácidos málico y cítrico están presentes en cantidades apreciables en las melazas. El ácido fórmico está presente como producto de la descomposición de la melaza; la mayoría de estos ácidos son metabolizados por los microorganismos, como fuente de carbono y no presentan problemas de inhibición de crecimiento (Castro, 1993).

Vitaminas

Aquellas vitaminas resistentes a la acción del calor y los álcalis, aparecen encontradas en las melazas. La niacina, ácido pantoténico y riboflavina, importante para el crecimiento microbiano, pueden estar presentes en cantidades significativas y otras vitaminas lo están en cantidades muy pequeñas (Castro, 1993).

En la tabla # 4 y # 5 se reportan los parámetros y la composición aproximada de la melaza utilizada en la fase experimental producida en el ingenio azucarero San Carlos- Ecuador.

Tabla 4.- Parámetros de la melaza (Ingenio San Carlos)

% BRIX	% PUREZA
85.29	24.64

Fuente: Ingenio San Carlos_ Laboratorio de control de calidad. Ing. Eduardo Zambrano laboratorista. 2008.

Tabla 5 .Composición aproximada de la miel de caña. Ecuador

Constituyentes Principales	Componentes	Porcentajes	
Agua		17-25	
Azúcares	Sacarosa		
	Glucosa(dextrosa)	30-40	
	Fructosa(levulosa)	4-9	
	Otras sustancias reductoras (invertidos)	1-4	
Otros carbohidratos	Gomas, almidón, pentosanas, también trazas de hexitoles, mioinositol, D-manitol y ácido urónico (MeO 2.0-3.0)		
		%Cenizas	
Cenizas	Bases: K ₂ O	30-50	
	CaO	7-15	
	MgO	2-14	
	Na ₂ O	0.3-9	
	Ácidos: SO ₃	7-27	
	Cl	12-20	
	P ₂ O ₅	0.5-2.5	
	SiO ₂ e insolubles	1-7	
	Componentes Nitrogenados	Proteína cruda como N*6.25	2.5-4.5
		Proteína verdadera	0.5-1.5
Aminoácidos, principalmente ácido aspártico y glutámico, incluso algunas pirrolidina de ácido carboxílico.		0.3-0.5	

Ácidos no nitrogenados	Compuestos nitrogenados sin identificar.	1.5-3.0
	Ácido aconítico(1al 5%), cítrico, málico,oxálico, glicólico.	1.5-6.0
Cera, esteroides y fosfatidos	Mesacónico, succínico, fumárico, tartárico	0.5-1.5
Vitaminas		0.1-1.0
	Vitamina A , biotina, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina.	Cantidades variables

Fuente: Ingenio San Carlos_ Laboratorio de control de calidad. Ing. Eduardo Zambrano laboratorista. 2008.

Tabla 6. Aprovechamiento de la melaza de caña

UTILIZACIÓN	GENERALIDADES
Alimentos	Alimentación rica en nutrientes.
Animales	Alimentación menos rica: desecados sobre pulpas, mezclas con diversos alimentos, pulverizados de forrajes, suplemento de ensilajes
Recuperación de líquidos sin azúcar	Vinazas para la obtención de ácido glutámico Lejías finales como alimento animal y para la obtención de aminoácidos

Fermentación	<p>Levaduras para panificación.</p> <p>Levaduras para alimentación humana y animal: aditivo para piensos, extractos e hidrolizados de levadura, fuente de enzimas, vitaminas y ácidos nucleicos.</p> <p>Además es el sustrato utilizado en la producción de proteína unicelular.</p> <p>Alcohol etílico.</p> <p>Productos colaterales de fermentación alcohólica.</p>
--------------	---

Fuente: (Ariza y Gonzalez, 1997)

2.4.3.2. Microorganismo

La elección de un microorganismo depende sobre todo del carbohidrato que se fermentará. El *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovorus* son las dos bacterias capaces de fermentar el almidón, el *Rhizopus oryzae* tiene menos limitaciones alimenticias y puede fermentar directamente el almidón y además generar ácido láctico L (+) puro.

El género *Lactobacillus* está comprendido por bacterias en forma bacilar de 0,5 – 1,2 x 1,0 – 10,0 µm, comúnmente se asocian en cadenas cortas, son anaerobio facultativas ó microaerófilo, catalasa y citocromo negativos (Foo et al., 1993). Pueden poseer motilidad, se mueven ayudados por flagelos peritricos. Los lactobacilos son auxótrofos quimioorganotróficos, necesitan medios complejos para su crecimiento, degradan la sacarosa para producir lactato. La temperatura óptima de crecimiento de los lactobacilos está entre 30 – 40 °C (Foo et al., 1993; Morishita et al., 1981). Su habitat natural es variado pudiéndolos encontrar en el aparato gastrointestinal de mamíferos y aves, incluyen alimentos de origen vegetal y animal (Callon et al., 2004).

Las bacterias lácticas son un conjunto de bacterias Gram positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bacilos y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente

fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden Meyerhoff (glucólisis) y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6-fosfogluónico (heterofermentación).

Existen también estudios realizados con la *Saccharomyces cerevisiae* y la *Kluyveromyces lactis* para producción de ácido láctico L(+) puro debido a su capacidad para tolerar la alta concentración de los iones de hidrógeno .

Los géneros básicos que comprenden las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus* así como los Lactobacillales *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella*

La forma más rentable de obtener el isómero L (+) es por medio de la glucólisis (transformación de carbohidratos o hidratos de carbono a ácidos). La estereo-especificidad deseada del producto depende del uso previsto; sin embargo, el isómero L(+) del ácido láctico es utilizado para la mayoría de las aplicaciones (Skory, 2000; Vaidya y col., 2005).

La fermentación de hexosas se realiza por tres vías metabólicas principales (Fig. 1) (Kandler, 1983). Los lactobacilos homofermentativos como son estreptococos y pediococos utilizan la vía de glucosa EMP (vía metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas), y se caracterizan por degradar fructosa 1,6-difosfato aldosa en dos triosasfosfatos, los cuales son convertidos en lactato (Kandler, 1983; Hiyama et al., 1968).

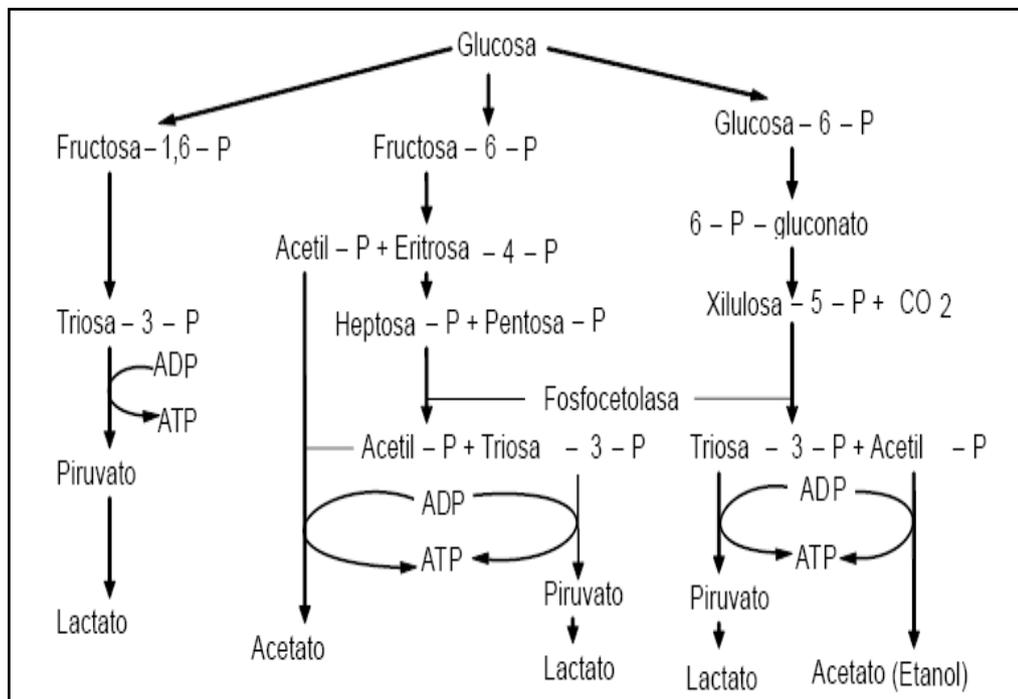
Teóricamente esta vía origina a partir de un mol de glucosa, dos moles de lactato. Sin embargo, el rendimiento real a condiciones de laboratorio e incluso de operación es de aproximadamente el 90% del rendimiento teórico (Bruno-Bárcena et al., 1999; Akeberg et al., 1998).

Por eso algunas especies del género *Lactobacillus* son heterofermentativos facultativos, en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis se comportan como homofermentativos, y en condiciones aeróbicas forman además de ácido láctico, ácido acético, acetoina y peróxido de hidrógeno (Li et al., 2006; Porro et al., 1999).

Las bacterias productoras de ácido láctico en general pertenecen al género *Lactobacillus*. Hay dos clases de bacterias: las homofermentativas producen ácido láctico casi exclusivamente, mientras que las heterofermentativas producen subproductos en cantidades apreciables. También es posible usar cepas de hongos como *Rhizopus* que producen ácido L(+) láctico.

Las bacterias heterofermentativas obligadas como por ejemplo el género *Leuconostoc*, oxidan la glucosa - 6 - fosfato a 6 - fosfogluconato. El producto final de su metabolismo es una mezcla equimolar de lactato, CO₂ y etanol ó acetato (Kandler, 1983).

Figura 17.- Vías metabólicas en la fermentación de hexosas por bacterias lácticas



Fuente: Kandler, 1983

Las bacterias lácticas sólo utilizan los azúcares como sustrato de manera fermentativa con formación de ácido láctico. Carecen de actividad respiratoria porque carecen de las enzimas de las cadenas respiratorias. A pesar de su metabolismo anaeróbico, son aerotolerantes. Debido a que su principal producto es el ácido láctico y a su tolerancia a la acidez (pH = 4-5), predominan ante otros microorganismos.

Debido al gran número de bacterias lácticas sólo son de interés los géneros altamente productores de ácido láctico. Para la producción industrial son de mayor importancia las bacterias lácticas homofermentativas, aquellas que sólo producen ácido láctico (González et al., 2000; Foo et al., 1993).

Se prefiere a los microorganismos que fermenten rápida y completamente con sustratos baratos, y con adición mínima de nutrientes nitrogenados. Se busca alta estereoespecificidad en condiciones de valores reducidos de pH y elevadas temperaturas, que se produzca muy poca biomasa y una cantidad de subproductos despreciable.

La digestión anaeróbica de la materia orgánica es un proceso bioquímico complejo que se desarrolla en tres etapas, utilizando en cada una un grupo de microorganismos específicos. La materia orgánica está constituida por moléculas cuyo principal constituyente es el carbono, asociado a otros elementos, principalmente nitrógeno, hidrógeno y oxígeno.

Las etapas de la digestión son las siguientes:

- Etapa de solubilización: En esta etapa la materia orgánica es hidrolizada por la acción de enzimas producidas por bacterias hidrolíticas, facultativas, transformándose en compuestos simples y solubles tales como: aminoácidos, glicéridos, pépticos y azúcares.

- Etapa de acidogénesis: En esta etapa los compuestos simples solubles de la primera etapa sufren un proceso de fermentación por ácido- bacterias que los convierten en ácidos simples de cadena corta. Estas bacterias formadoras de ácidos, llamadas acidogénicas son también facultativas, es decir viven tanto en presencia como ausencia de oxígeno.
- Etapa de metanogénesis: En esta etapa los ácidos orgánicos simples producidos en la etapa anterior, devienen en sustratos para la descomposición, estabilización y producción de metano mediante la producción de bacterias metanogénicas, estrictamente anaeróbicas, las cuales producen CH₄ por dos vías: fermentación de ácido acético y reducción de CO₂ por hidrógeno nascente.

La acción de las metanobacterias en la tercera etapa es el factor clave para el desarrollo de la fermentación anaeróbica de las bacterias metanogénicas, pues estos microorganismos son muy sensibles a los cambios bruscos de temperatura, viven solo en un rango muy estrecho de pH (6.6- 8.0). Además son sensibles a la toxicidad de ciertos materiales reduciéndose o hasta paralizándose la digestión.

2.4.4 MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE MELAZA.

a) Sólidos Solubles.

Se utilizaron brixómetros con escalas de 0 a 28 y de 28 a 62°Brix para medir el contenido de sólidos solubles; el cual, en jugos y bebidas no alcohólicas representa el contenido de azúcares.

El procedimiento de medida fue el siguiente: se mezcló la muestra perfectamente para homogenizarla, se limpió el brixómetro con agua destilada y se secó con papel adsorbente; con la ayuda de una varilla de agitación se colocó la muestra en el brixómetro y el campo claro se observó directamente el contenido de sólidos solubles expresados en °Brix. Finalmente se limpió el brixómetro con agua destilada y se secó. Los valores son presentados en la Tabla 13 del Anexo A.

Figura 18. Determinación de sólidos solubles.



b) pH

Se homogenizó la muestra mediante agitación y se calibró el pHmetro de electrodo previamente con la solución buffer 7. En aproximadamente 50 ml de muestra contenida en un vaso de precipitación se determinó el pH, introduciendo los electrodos del potenciómetro en el vaso de precipitación con la muestra, y finalmente se leyó directamente el pH de la muestra. Los valores se pueden observar en una forma ordenada en la Tabla 14 del Anexo A.

Figura 19. Determinación de pH



pHmetro de electrodo

c) Determinación de Acidez titulable de la Melaza (% de ácido aconítico)

Chen (1991), especificó el método para determinar el % de ácido aconítico.

- **Método**

En aproximadamente 10 g de muestra en un matraz erlenmeyer se añade 4 gotas de fenolftaleína, se titula con NaOH 0.1 N o 0.01N hasta conseguir un color rosado persistente que desaparece lentamente, finalmente se lee el volumen de NaOH consumido. Los valores de NaOH gastados se reportan en la Tabla 13 Anexo A y los valores de ácido aconítico se reportan en la tabla 15 en el Anexo A.

- **Ecuación (1).** $\% \text{Ácido-aconítico} = \left[\frac{f \times v \times N}{w} \right] \times 100$

Donde; f: Factor del ácido aconítico (0.058)

v: Volumen titulado de NaOH

N: Normalidad (0.1 N)

w: Peso de la muestra (g)

Figura 20. Determinación de la acidez de la melaza



PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL PRODUCTO OBTENIDO

a) pH

Se homogenizó la muestra mediante agitación y se calibró el pHmetro de electrodo previamente con la solución buffer. En aproximadamente 50 ml de muestra contenida en un vaso de precipitación se determinó el pH, introduciendo los electrodos del potenciómetro en el vaso de precipitación con la muestra, y finalmente se leyó directamente el pH de la muestra.

b) Acidez titulable (% de ácido láctico)

Se determinó de acuerdo a la técnica oficial de AOAC (1999), por el método potenciométrico.

Figura 21. Determinación de la acidez

Ácido láctico



En aproximadamente 10 g de muestra en un matraz erlenmeyer se añadió 4 gotas de fenolftaleína, se tituló con NaOH 0.1 N o 0.01N hasta conseguir un color rosado persistente que desapareció lentamente, finalmente se lee el volumen de NaOH consumido.

Ecuación (2).

$$\% \text{Ácido-láctico} = \left[\frac{f \times v \times N}{w} \right] \times 100$$

Donde; f: Factor del ácido láctico (0.090)

v : Volumen titulado de NaOH (ml)

N: Normalidad (0.1 N)

w: Peso de la muestra (g)

Los valores promedios de las lecturas por duplicado en tres réplicas se indica en la Tabla 18- Anexo B, obtenidas de las Tablas 18-a Anexo B, por replica y 18-b Anexo B,. para cada tratamiento que requieren melaza sin filtrar, para los tratamientos que se requieren melaza filtrada los valores promedios se reportan en la Tabla 19 Anexo B, provenientes de la Tabla 19-a Anexo B, y 19-b Anexo B. Los porcentajes de acidez se reportan en las tablas de resultados para cada tratamiento en el Anexo C-1.

c) Densidad

La densidad de una sustancia es constante y se define como la masa presente por unidad de volumen. La densidad δ (Kg/m³) se determino con la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación (3).} \quad \delta = \left[\frac{m}{v} \right]$$

Donde:

m=peso de la muestra (gr)

v= volumen de la muestra (ml)

d) Rendimiento

Los porcentajes de rendimiento en producto R (g/ g), se determinaron mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Ecuación (4).} \quad R = \left[\frac{w_f}{w_i} \right] \times 100$$

Donde:

wf: peso final de la muestra (g/g);

wi: peso inicial de la muestra(g/g)

e) Índice de refracción

Es el numero dimensional que expresa la relación existente entre la velocidad de la luz en el medio más denso. Se llevó a cabo por medio del refractómetro de Abbé, basado en el concepto de ángulo límite.

f) Punto de ebullición

El punto de ebullición de un líquido puro se define como la temperatura a la cual la presión del líquido es exactamente igual a la presión de vapor.

En un tubo de ensayo se colocó 1 ml de sustancia líquida, en un termómetro y se introdujo todo en un baño maría. El comenzar el calentamiento se observó el desprendimiento de burbujas desde la boca del capilar debido a que el aire del interior alcanzado una mayor presión lo que obliga a salir al exterior. Al continuar calentando el líquido, de pronto se observó que las burbujas que se desprendían lentamente ahora lo hacen de manera acelerada, el líquido del interior del capilar se vaporizó y ejerció mayor presión obligandolo a salir al exterior, cuando cesó el burbujeo se leyó la temperatura del valor correspondiente.

g) Viscosidad

La viscosidad es una medida de la resistencia al flujo de un fluido aunque las moléculas de un fluido se encuentre en constante movimiento aleatorio, la velocidad neta en una dirección en particular es cero, a menos que alguna fuerza se aplique y cause el flujo del fluido.

Se preparó el ambiente termostático a 20°C, asegurando el viscosímetro tipo Cannon en el termostato, se añadió con la pipeta un volumen de 10 ml de agua, dejando 10 minutos para permitir que el agua alcance la temperatura del termostato. Con la ayuda de una pera se succionó el líquido por el brazo del capilar del viscosímetro hasta que la superficie este más arriba del menisco superior, entonces se permitió que el líquido baje por el tubo, y se registró el tiempo requerido para que el agua pase por el menisco inferior.

Se repitió la misma operación con la muestra a determinar la viscosidad.

$$\text{Ecuación (5).} \quad K = \left[\frac{\eta_a}{\rho_a} \right] \times t$$

Donde; n_a : viscosidad del agua a 20°C en (Pa.s)

ρ_a : densidad del agua a 20°C en (Kg/m³)

t: Tiempo registrado en la determinación(s)

K: constante del viscosímetro

$$\text{Ecuación (6).} \quad \eta_a = k * \rho_a * t$$

Donde; n_a : viscosidad del ácido 20°C en (Pa.s)

ρ_a : densidad del ácido a 20°C en (Kg/m³)

t= Tiempo registrado en la determinación(s)

K= constante del viscosímetro

2.5. HIPÓTESIS

Hipótesis nula

H₀: La concentración de la melaza y la pureza no influyen significativamente en la velocidad de fermentación y en la cantidad de ácido láctico producido.

H₀: La pureza de la melaza no influye significativamente en la velocidad de fermentación y en la cantidad de ácido láctico producido.

H₀: La concentración de la melaza no influye significativamente en la velocidad de fermentación y en la cantidad de ácido láctico producido.

Hipótesis alternativa

H₁: La concentración de la melaza y la pureza influyen significativamente en la velocidad de fermentación y en la cantidad de ácido láctico producido.

H₁: La pureza de la melaza influye significativamente en la velocidad de fermentación y en la cantidad de ácido láctico producido.

H₁: La concentración de la melaza influye significativamente en la velocidad de fermentación y en la cantidad de ácido láctico producido

2.6. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES

El señalamiento de las variables se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Señalamiento de variables.

Variables	
Independiente (MELAZA)	Dependiente(ÁCIDO LÁCTICO)
Factores de estudio	
Concentración 20% (p/v) 30% (p/v) 40% (p/v)	Rendimiento
Pureza Sin Filtrar Filtrada	Porcentaje de acidez

Estudios adicionales para el mejor tratamiento:

- Índice de refracción
- Punto de ebullición
- Viscosidad
- Densidad
- Velocidad de fermentación
- Costo del proceso de producción

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación tiene un enfoque constructivista con un criterio de juicio crítico y propositivo; es constructivista porque los conocimientos y la investigación es fruto de la revisión bibliográfica del autor, además permite abrir un campo de investigación.

Tiene juicio crítico porque refleja el nivel de conocimiento adquirido en los diferentes semestres que oferta la facultad y es propositivo porque se registra una solución al problema investigado.

3.2. MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN

Se basa en la modalidad bibliográfica ya que recolecta información en diferentes fuentes primarias y secundarias. Primarias en cuanto se refiere a recabar información directamente del objeto en estudio; secundarias en cuanto tiene que ver con libros, revistas, información en la web.

En la modalidad experimental se que recoge la información mediante datos que permiten determinar el grado de influencia que tienen las variables independientes sobre las variables dependientes y saber cuáles son las que afectan sobre los resultados.

3.3. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

En este caso se optó por realizar una investigación descriptiva porque desarrolla ampliamente criterios y contenido.

3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

La muestra de melaza en estudio fue provista del Ingenio Azucarero San Carlos ubicado en el sector Marcelino Maridueña con la ayuda del Ing. Eduardo Zambrano.

Para la ejecución experimental se utilizó 200, 300 y 400 g de melaza para la producción de ácido láctico.

La cepa del microorganismo (*Lactobacillus rhamnosus*) se adquirió en paquetes de cinco gramos, distribuido por agro lechero del cantón Mejía, perteneciente a la ciudad de Quito.

Para el presente estudio se emplearon dos variables independientes: la primera variable concentración (A) con tres niveles, y la segunda pureza (B) con dos niveles. En la Tabla 8 se describe las variables independientes, los factores y niveles de estudio.

Tabla 8. Factores y niveles de estudio.

Factor	Nivel	Descripción	
Concentración	A	a ₀	20% (p/v)
		a ₁	30% (p/v)
		a ₂	40% (p/v)
Pureza	B	b ₀	melaza sin filtrar
		b ₁	melaza filtrada

Para la evaluación de las variables dependientes se utilizó un diseño completamente al azar de arreglo factorial $A \times B$, resultando seis tratamientos con tres réplicas. El esquema de análisis de varianza se describe en la Tabla 9.

Tabla 9. Esquema de Análisis de Varianza (ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	
Total	$(a*b*r)-1$	17
Factor A	$a-1$	2
Factor B	$b-1$	1
Interacción A*B	$(a-1)(b-1)$	2
Error	$a * b * (r-1)$	12

De la combinación de los factores en estudio y los niveles indicados, se obtuvieron los siguientes tratamientos que se reportan en la Tabla 10.

Tabla 10. Tratamientos por combinación de factores y niveles con su descripción.

Nº	Tratamientos	Descripción
1	$a_0 b_0$	melaza : 20 % (p/v), sin filtrar
2	$a_1 b_0$	melaza : 30 % (p/v), sin filtrar
3	$a_2 b_0$	melaza : 40% (p/v), sin filtrar
4	$a_0 b_1$	melaza : 20% (p/v), filtrada
5	$a_1 b_1$	melaza : 30% (p/v), filtrada
6	$a_2 b_1$	melaza : 40% (p/v), filtrada

3.5. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

La operacionalización de variables independientes y dependientes se describe en Tabla 11 y Tabla 12.

3.5.1. VARIABLE INDEPENDIENTE: (MELAZA)

Tabla 11.- Operacionalización de las variables independientes.

Conceptualización	Categoría	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
La melaza de la caña de azúcar son las mieles incristalizables, que contiene agua, azúcares, carbohidratos, compuestos nitrogenados y vitaminas, la misma que sirve como sustrato para procesos de fermentación.	Azúcar	Grados Brix	¿Los grados brix indican la cantidad de sólidos solubles presentes en una solución azucarada?	Determinación de °Brix Balanza y Brixómetro (0 a 32 ⁰ Brix)
	Sustrato	HPLC	¿El HPLC es una técnica empleada eficazmente para saber la concentración del sustrato?	Cromatografía líquida de alta precisión.
	Fermentación	Porcentaje de acidez	¿El porcentaje de ácido presente en una muestra indican la eficiencia de la fermentación?	Determinación de acidez pH-metro y bureta

Elaborado por: Verónica Barrera (2011)

3.5.2. VARIABLE DEPENDIENTE: (ÁCIDO LÁCTICO)

Tabla 12.- Operacionalización de las variables dependientes.

Conceptualización	Categoría	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas e Instrumentos
El ácido láctico es un compuesto destacado por su aplicación en la industria alimentaria, debido a sus propiedades como acidulante y conservante	Ácido Industria alimenticia Acidulante, conservante	pH, acidez Alimentos Tiempo de vida útil	¿El pH y la acidez son indicadores de la calidad del ácido láctico? ¿Los ácidos regulan el pH de los alimentos? ¿Los acidulantes son conservadores eficientes de alimentos? ¿Se requiere en alimentos el uso de ácidos?	Determinación de pH, acidez y costo del producto obtenido.

Elaborado por: Verónica Barrera (2011)

3.6 PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION

La representación tabular en Excel fue utilizada para procesar la información.

El análisis de datos se realizó con la ayuda del paquete estadístico Excel, trabajando con un 95% de confianza, análisis de ANOVA y prueba de Tukey.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS DILUCIONES DE MELAZA.

(MATERIA PRIMA O SUSTRATO)

Las diluciones de melaza presentaron un promedio de 5.3-5.7 en pH, el % de ácido aconítico en un 0.012% y los sólidos totales de 20-32 °Brix.

PRODUCTO

(Ácido Láctico)

4.2.- CINÉTICA DE FERMENTACIÓN.

Las cinéticas de formación de producto se pueden verificar con el incremento del porcentaje de acidez alcanzado durante el tiempo de fermentación. (Gráficos 1-2) del Anexo C-2. El porcentaje de acidez en función del tiempo para el tratamiento a_0b_0 (melaza: 20%(p/v), sin filtrar). Gráfico 1 del Anexo C-2 alcanza valores de 0.4 % de ácido láctico.

Se tiene un mayor porcentaje de acidez 2.74 por ciento en el tratamiento a_0b_1 (melaza: 20%(p/v), filtrada), aun cuando este sustrato tenga la misma concentración del tratamiento a_0b_0 lo que difiere es el grado de pureza.

Los gráfico 3-4 del Anexo. C-2, indican que el porcentaje de acidez es mayor al utilizar en el proceso melaza a una concentración del 30%(p/v) y filtrada.

El porcentaje de acidez en función del tiempo para el tratamiento a_1b_0 (melaza 30%(p/v), sin filtrar) es de 0.5 porciento de ácido láctico.

A diferencia del tratamiento a₁b₁ (melaza: 30% (p/v), filtrada) que utiliza la melaza filtrada el porcentaje de acidez alcanza valores de 2.87 por ciento. Considerándose como un medio adecuado para el desarrollo del *Lactobacillus*. El porcentaje de acidez es menor a mayores concentraciones de azúcar aún cuando en el proceso se utilice melaza filtrada o sin filtrar.

Corresponde al tratamiento a₂b₀ (melaza: 40% (p/v) sin filtrar), un 0.34 por ciento de acidez este valor indica que la producción de ácido es mínima (Gráfico 5) del Anexo C-2. Así como un 0.74 por ciento de acidez para el tratamiento a₂b₁ (melaza: 40%(p/v) filtrada). A mayores concentraciones de melaza como el 40% el microorganismo se inhibe por lo que no se recomienda trabajar. (Gráfico 6) del Anexo C-2.

La producción de ácido láctico en función del tiempo es descrito por las ecuaciones polinómicas de regresión las cuales presentaron coeficientes de correlación muy próximos a la unidad para los tratamientos a₁b₁ (melaza: 30% (p/v), filtrada) y a₁b₀ (melaza: 30% (p/v), sin filtrar) partiendo con un 0.20% de ácido láctico.

$$\% \text{ de ácido láctico} = -7\text{E-}06t^3 + 0,000t^2 - 0,014t + 0,073 \quad (R^2 = 0,971; a_0b_0)$$

$$\% \text{ de ácido láctico} = -4\text{E-}05t^3 + 0,003t^2 - 0,047t + 0,202 \quad (R^2 = 0,993; a_0b_1)$$

$$\% \text{ de ácido láctico} = -4\text{E-}06t^3 + 0,000t^2 + 0,000t + 0,057 \quad (R^2 = 0,980; a_1b_0)$$

$$\% \text{ de ácido láctico} = -4\text{E-}05t^3 + 0,003t^2 - 0,047t + 0,202 \quad (R^2 = 0,993; a_1b_1)$$

$$\% \text{ de ácido láctico} = -4\text{E-}06t^3 + 0,000t^2 - 0,004t + 0,044 \quad (R^2 = 0,968; a_2b_0)$$

$$\% \text{ de ácido láctico} = -1\text{E-}05t^3 + 0,001t^2 - 0,019t + 0,117 \quad (R^2 = 0,970; a_2b_1)$$

4.3. ESTUDIOS ADICIONALES PARA EL ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO

Se obtuvo un ácido de 2,87% de acidez usando diluciones de melaza: 30% (p/v), filtrada. Con las siguientes características; índice de refracción 1.378, punto de ebullición 108.5°C, viscosidad 0.024 Pa.s, densidad 1114.83 (Kg/m³), pH 4.5.

4.3.1 ANÁLISIS DE COSTOS

En la Tabla 35. Anexo F se reporta el estudio económico de los materiales directos e indirectos, éste se basa en la producción de una empresa que generalmente obtiene 1 litro de ácido láctico por parada, entre los materiales directos tenemos, la melaza, el microorganismo, y los materiales indirectos, (envases y etiquetas). El costo obtenido para producir esta cantidad es de 3.88 USD, hay que rescatar que el precio de la melaza es bajo y se tiene acceso en los ingenios azucareros de la Región Costa Ecuatoriana.

Se estudio el costo por hora de los equipos y utensilios (Tabla 36. Anexo F) que se involucran en el procesamiento , un año normal de 250 días de trabajo, involucrando también la vida útil de los equipos (10 años) y utensilios (5 años), el resultado final fue 0,59 USD.

El costo de los suministros por hora es de 3.48 USD. Las horas hombre o costo del personal es de 13.50 USD; considerando un obrero con un sueldo básico unificado de 270 USD durante las 8 horas de trabajo por día.

Finalmente se realizó el estudio de la inversión (Tabla 37. Anexo F), para ello se involucró lo analizado anteriormente, se suman el análisis económico de los materiales directos e indirectos, de los equipos y utensilios, de los suministros y las horas hombre, la suma total es de 21.45 USD para 1 litro de producción, como el producto se expenderá en envases de 50 ml el costo será de 1.07 USD y más el 20% de utilidades 1.29 USD.

4.3.2 COMPARACIÓN A LAS DOS HORAS DE FERMENTACIÓN DE TODOS LOS TRATAMIENTOS.

Los porcentajes de acidez alcanzados a las 2 y 48 horas de fermentación de las diluciones de melaza utilizada a sus diferentes concentraciones y a sus respectivos grados de pureza en tres replicas reportados en las Tablas 26 y 27. Anexo D.

El análisis de varianza a las dos horas de fermentación establece la diferencia significativa tanto en efectos principales como en la interacción (Tabla 28. Anexo E), diferenciando el valor F de Fisher calculado 28,99 con el obtenido en tablas 4,10; al 95% de significancia, con 10 grados de libertad del error; Fisher calculado es mayor al de tablas en consecuencia los tratamientos difieren significativamente entre sí. El mismo resultado se da a las 48 y 72 horas de fermentación. Tablas 29 -30 y 31-32. Anexo E.

4.3.3 DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO EN FUNCIÓN AL % DE ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDO.

Entre las muestras de sustratos a diferentes concentraciones de melaza y grado de pureza, estadísticamente la variación de la acidez titulable (%) es significativa ($p \leq 0,05$). El contenido de ácido láctico va de 0,32 a 2.86% . Para su estudio, se estableció como datos experimentales los valores de porcentaje de ácido láctico producido a las 72 horas de fermentación para todos los tratamientos. Obteniendo el mejor tratamiento a_1b_1 con un porcentaje de ácido láctico de 2,865 el que corresponde a_1b_1 : melaza al 30% (p/v) con filtración, porque su diferencia es significativa a los demás tratamientos. Reportado en la tabla 31 y 32 del Anexo E.

4.3.4 DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO EN FUNCIÓN AL pH

Mediante el análisis de varianza realizado a la variable respuesta pH indica que existe influencia significativa de los factores concentración y grado de pureza a un nivel de confianza del 95%, (Tabla 33 del Anexo E). La prueba de

diferenciación Tukey (Tabla 34) del Anexo E, establece el menor valor promedio de pH para el factor concentración con 4,88 a 30% (p/v) y para el factor pureza es 4,9 filtrada. Indicando que el tratamiento a₁b₁: melaza 30% (p/v) con filtración, es el mejor. Los valores de pH iniciales y finales de los sustratos en fermentación a diferentes concentraciones y grados de pureza se reportan en la Tabla 16 del Anexo B.

4.4. VERIFICACIÓN DE LAS HIPOTESIS

Luego del análisis estadístico se llegó a establecer que:

“La concentración de la melaza y la pureza **sí** influyen significativamente en la velocidad de fermentación y en la cantidad de ácido láctico producido”.

Como los tratamientos difieren entre sí, se compararon a las **48** horas de fermentación (Tabla 27. Anexo D), se rechazó la hipótesis nula (Tabla 29. Anexo E) y de esta manera se procedió a determinar la diferencia mínima significativa mediante la prueba de Tukey.

Esta prueba señaló que el mejor tratamiento es: a₁b₁ (melaza: 30% (p/v), filtrada) presentando un porcentaje de ácido láctico de 2.87%; el tratamiento que lo sigue es a₀b₁ (melaza: 20% (p/v), filtrada) con un porcentaje de ácido láctico de 2,72 % (Tabla 30. Anexo E).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se determinó que 30% (p/v) fue la concentración adecuada de melaza de caña la cual debe ser filtrada para utilizarla como medio de fermentación determinada en base al porcentaje de ácido láctico obtenido alcanzando los valores más altos en porcentaje de acidez (2,87%) y valores más bajos de pH (4.5); que corresponden al tratamiento: a1b1 (melaza (30% (p/v), filtrada).

La melaza de caña requiere un pre-tratamiento adecuado para ser utilizada como sustrato de fermentación en procesos biotecnológicos, debido a las impurezas presentes por ser un producto agro industrial, es así que los tratamientos en los cuales no se filtró la melaza, tienen valores de porcentaje de acidez entre 0,32 a 0,51 %; es decir cambian significativamente a los tratamientos en los cuales se filtra la melaza alcanzando valores de acidez desde 0,71 a 2,87%.

Al comparar estadísticamente el incremento de la acidez a las 48 horas de fermentación al 20 y 30% (p/v) de melaza previamente filtrada, se observó que no hay diferencia significativa entre estas dos concentraciones por lo que la producción de ácido láctico al 20% no difiere a la obtenida en la concentración del 30%. A mayores concentraciones como al 40% difieren significativamente de la concentración del 20 y 30% (p/v) por lo que no se recomienda trabajar a concentraciones muy altas.

Se comprobó que el microorganismo se adapta al medio y asimila los azúcares produciendo ácido láctico hasta las 48 horas de fermentación a 43°C de temperatura. Con el transcurso del tiempo. Los microorganismos requieren nutrientes, deteniéndose la producción de ácido láctico es mas se determinó una disminución a las 72 horas de fermentación.

Finalmente se concluyó que al comparar los resultados del ácido láctico comercial de características: índice de refracción 1.4414, punto de ebullición 125-140°C, viscosidad 0.04033 y densidad de 1249 (Kg/m³), con el ácido láctico obtenido, de características: índice de refracción 1.378, punto de ebullición 108.5°C, viscosidad 0.024 Pa.s, densidad de 1114.83 (Kg/m³), pH de 4.5 y un 2,87% de acidez, la melaza sería una buena alternativa de aprovechamiento de residuos agroindustriales.

RECOMENDACIONES

-Evaluar diferentes técnicas de clarificación y floculación para retirar la mayor cantidad de sólidos suspendidos y proporcionar un medio de fermentación menos turbio.

-Utilizar técnicas más exactas como la cromatografía líquida de alta resolución HPLC para la determinación del contenido de azúcares totales presentes en la melaza de caña, y la verificación del ácido producido.

-Evaluar la capacidad reproductora de distintas variedades de microorganismos en este tipo de sustratos de fermentación comprobando el crecimiento a diferentes pH, temperaturas, mayor cantidad de inóculo, y tiempos de fermentación.

-Evaluar la velocidad de fermentación y concentración del ácido obtenido con adición de más fuentes de nitrógeno como urea, fosfato y sulfato de amonio a la melaza de caña; ya que gracias a éste nutriente el microorganismo se adapta y crece aun cuando luego deba llegar a la fase estacionaria y comenzar a morir sin alcanzar un porcentaje de acidez mayor.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos informativos

Título: " Desarrollo de una tecnología para la producción de ácido láctico a partir de la melaza”30% (p/v) con filtración.

Institución ejecutora: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Laboratorio Biotecnología.

Beneficiarios: Población involucrada.

Ubicación: Ambato – Ecuador

Tiempo estimado para la ejecución: 4 meses

Equipo Técnico Responsable: Egda. Verónica Barrera, Ing. María Teresa Pacheco.

Costos: \$855

6.2. Antecedentes de la propuesta

El ácido láctico es uno de los primeros ácidos orgánicos conocidos, industrialmente se fabrica o puede obtenerse como producto metabólico de la fermentación controlada de cualquier medio que contenga carbohidratos, como azúcar de las melazas, de la glucosa del maíz o de la lactosa del suero de la leche, y por la acción de diversos microorganismos.

Para la producción biotecnológica de ácido láctico se han utilizado diferentes sustratos puros, tales como glucosa, lactosa, almidón y celulosa, sin embargo, estos sustratos son económicamente desfavorables, no sólo porque los sustratos puros son costosos y requieren la adición de fuentes nitrogenadas complejas para producir ácido láctico en un tiempo razonable, sino también porque se requiere de un pretratamiento de los polisacáridos naturales para su posible fermentación.

El ácido láctico es ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, médica, farmacéutica y cosmética, como materia prima para síntesis orgánica, como purgante en forma de lactato de calcio o lactato de magnesio, como removedor de sales de calcio, en el curtido de pieles, en la producción de plásticos biodegradables, agroquímicos

6.3. Justificación

Esta investigación es de gran interés porque promueve el estudio de nuevas fuentes de sustratos utilizados para la producción de ácido láctico como es la melaza, que corresponde a un producto residuo del proceso de elaboración de azúcar, para la sustitución total o parcial de la materia prima generalmente utilizada.

Por la escasa investigación sobre el uso de la melaza (miel de desecho obtenida de la caña de azúcar al producir el azúcar refinado) en procesos

biotecnológicos se justifica la aplicación de métodos experimentales de Ingeniería en Alimentos para producción de ácido láctico.

Es factible porque existe acceso a información, en revistas técnicas e internet, hay también varios recursos biotecnológicos en los laboratorios y docentes dispuestos a transmitir sus conocimientos.

El perfil tiene utilidad teórica porque posee información bibliográfica que podrá servir como fuente de consulta para posteriores estudios.

La investigación es factible porque existe acceso a información, en revistas técnicas, libros e internet, además el estudio anterior será de inspiración para desarrollar la presente propuesta, hay también varios recursos tecnológicos en los laboratorios de Biotecnología que se los puede usar.

Esta investigación servirá como una propuesta a ser aplicada a una empresa, ya que se trabajará sobre la parte tecnológica aplicada para la producción de ácido láctico a partir de la melaza, la cual será la base del estudio a realizarse.

6.4. Objetivos

Objetivo general

- Desarrollar una tecnología aprovechando la melaza como materia prima fermentescible para la producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Objetivos específicos

- Estimar el mejor proceso de separación de ácido láctico.
- Demostrar la influencia de los métodos de purificación sobre la producción de ácido láctico.

6.5. Análisis de factibilidad

Con el objetivo de saber cuál será el impacto económico que provocaría el producir ácido láctico con una cierta cantidad de melaza se realizó el estudio económico, involucrando en ello, la materia prima, los equipos y utensilios, los suministros y el sueldo de los trabajadores.

La investigación previa demuestra que existe un tratamiento que se asemeja en el incremento del porcentaje de acidez al porcentaje de acidez del ácido, la misma que se toma como mejor tratamiento, que se basa en trabajar con melaza a una concentración del 30% p/v y debe ser filtrada y respectivamente con el 10% de cultivo.

El análisis económico se realiza con el fin de saber que tan rentable resulta hacerlo si el producto será accesible y además para saber si competirá en el mercado como producto novedoso de valor económico regulado. Hay que recalcar que el precio deberá ser rentable para la empresa, produciendo ganancias y no pérdidas.

Para determinar el costo de producción, se consideró 1 litro por parada, de allí se sacó el valor de los suministros y el valor de los equipos y utensilios por hora, las horas hombre se obtienen de acuerdo a un sueldo básico de 270 USD, en total el costo de producción es de 21.45USD . Teniendo en cuenta el 20% de utilidades, el precio por cada litro que se va a vender será de 25.74 USD/ lt. Como el producto se expenderá en envases de 50 ml el costo será de 1.07 USD, más el 20% de utilidades el precio final del producto podría ser de 1.29 USD.

6.6. Fundamentación

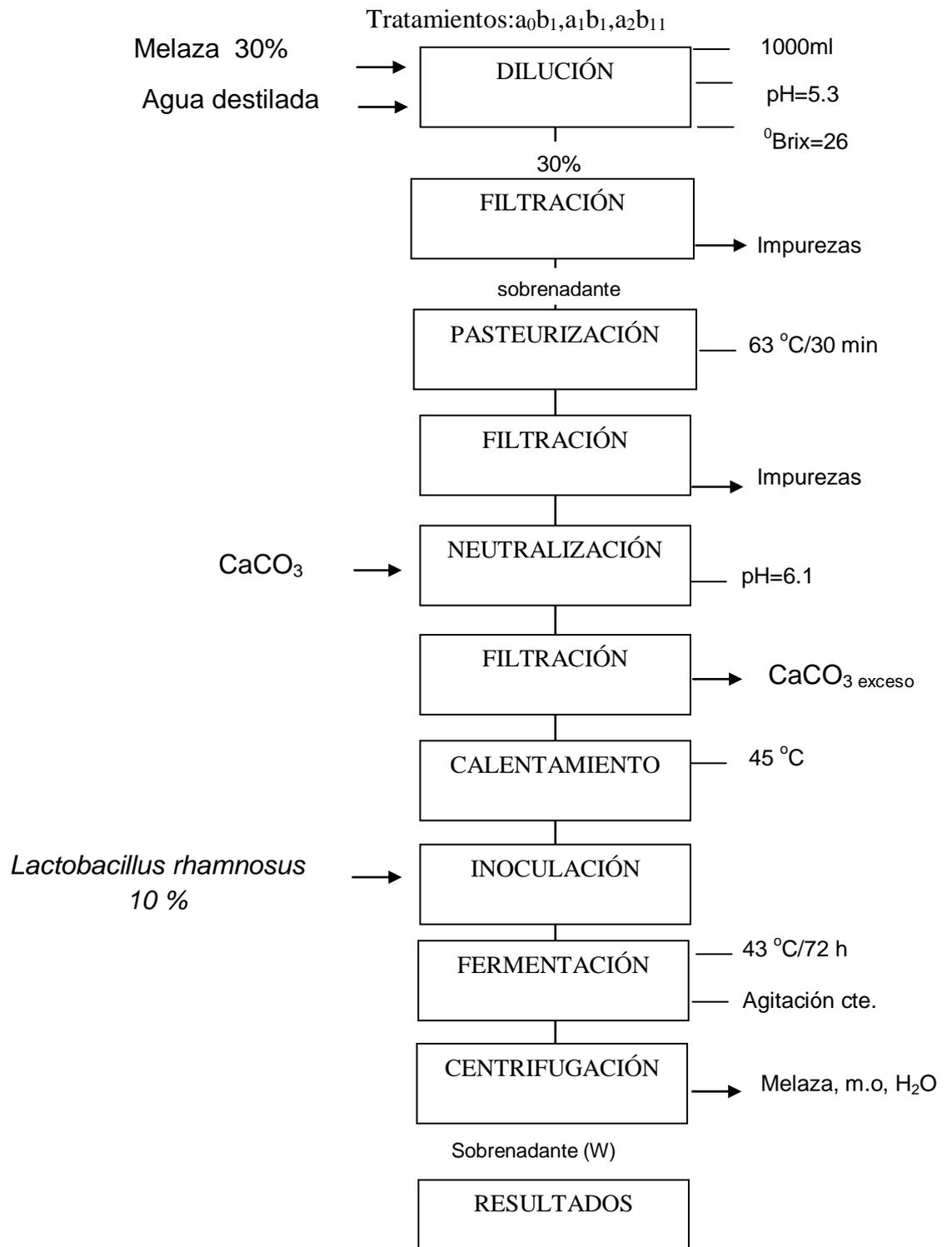
La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos.

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

Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico son cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*

La melaza (miel final), representa una alternativa para la producción biotecnológica de ácido láctico, principalmente por su alto contenido en azúcares, así como por su bajo costo. Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en hidratos de carbono además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. Su contenido de agua es bajo.

**DIAGRAMA DE FLUJO.- PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO
MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAZA.**



Tratamientos:

a₀ b₁: melaza 20 % (p/v), filtrada.

a₁ b₁: melaza 30 % (p/v), filtrada.

a₂ b₁: melaza 40% (p/v), filtrada.

6.7. Metodología

Tabla 38. Modelo Operativo (Plan de acción)

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto	Tiempo
1. Formular la propuesta	Utilizar residuos agroindustriales como materia prima de bajo costo en procesos biotecnológicos para la obtención de ácido láctico.	Revisión bibliográfica.	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$95,00	30 días
2. Desarrollo preliminar de la propuesta	Analizar la factibilidad de la propuesta.	Análisis económico.	Investigador	Humanos Económicos	\$60	10 días
3. Implementación de la propuesta	Ejecución de la propuesta.	Producción de ácido láctico	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$200,00	45 días
4. Evaluación de la propuesta	Verificar los puntos de control en el proceso y comprobar el cumplimiento de los parámetros planteados en la propuesta.	Verificación de incremento de acidez y comprobación de datos experimentales	Investigador	Humanos Técnicos Económicos	\$500,00	30 días

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Total: \$ 855.00

6.8. Administración

Tabla 39. Administración de la Propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
<p>Las condiciones y parámetros que se deben seguir para el desarrollo del microorganismo dando así un incremento de la acidez y disminución del pH en el ácido obtenido.</p>	<p>Se conoce que se está utilizando los desechos agroindustriales en la producción de nuevos productos por medio de la fermentación con la ayuda de diferentes microorganismos</p>	<p>Conocer más acerca de los procesos de fermentación. Analizar el proceso de producción. Aportar a la población con una nueva investigación.</p>	<p>Controlar en cada etapa del proceso. Realizar el control y la evaluación del proceso fermentativo. Determinar el porcentaje de acidez que se puede llegar a alcanzar.</p>	<p>Investigador: Verónica Barrera</p>

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

6.9 Previsión de la evaluación

Tabla 40. Previsión de la Evaluación

Preguntas básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	Las personas de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
¿Por qué evaluar?	Porque se debe garantizar la veracidad del proceso de producción y de todos sus parámetros de control.
¿Para qué evaluar?	Para corregir los errores, si existieran en algún lugar del proceso o dentro de las formulaciones respectivas. Para establecer el mejor tratamiento, desarrollando entonces un proceso de producción de ácido láctico.
¿Qué evaluar?	La tecnología utilizada Materias primas Porcentaje de acidez alcanzado Composición química del producto terminado
¿Quién evalúa?	El investigador El director de investigación
¿Cuándo evaluar?	Antes y durante el proceso de fermentación y también durante el tiempo de almacenamiento.
¿Cómo evaluar?	Se evaluará mediante titulaciones con Hidróxido de Sodio 0.1 N. Otros análisis con instrumentos de análisis apropiados a ese fin.
¿Con qué evaluar?	Con los manuales instructivos de cada equipo de análisis. Normas establecidas.

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

BIBLIOGRAFÍA

LIBROS Y REVISTAS:

ADAMBERG, K. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Microbiology*.85: 171-183.

AKERBERG,C., and G. Zacchi. 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technol.* 75:119-126.

Ariza,B. y Gonzales,L. 1997. Producción de una proteína unicelular a partir de levaduras y melaza de caña como sustrato. Tesis de pregrado Bacteriología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Bacteriología. Bogota. Colombia. 22-27 p.

BULUT, S., M. Elibol, and D. Ozer. 2004. Effect of different carbon sources on L(+) –lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* 21:33-37.

CASTRO, G. B. Aprovechamiento biotecnológico de la melaza de caña de azúcar para la Producción de ácido láctico. U.A.M. Mante – UAT. Cd. Mante, Tam..Dpto.de Ciencia y Tecnología, U.A.M. Reynosa-Aztlán –UAT. Reynosa, Tam.

CARBALLO,F . 2000. Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia.España.20-31p

DATTA, R., and J. FRANK.1995. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:221-231.

DAUTANT SEMPRUM FRANCISCO.1985. Estudio sobre la Producción de Acido Láctico a partir de un proceso de Fermentación de Melaza. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Monterrey, N.L.

ERAZO, 1981, Tesis de Grado “Obtención de Alcohol Etílico a partir de Melaza” Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

GIL-HORÁN RICARDO .2008, Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación IUNAM, Facultad de Química, 2Consultores independientes. Tecnol Ciencia Ed. (IMIQ) vol. 23 núm. 2.

HONIG,P. 1974. Principios de Tecnología Azucarera, Segunda Edición. Compañía Editorial Continental. Mexico.23-54p

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (ICONTEC) . 1994. Industria Alimentarias e Industrias de bebidas. Melaza de Caña NTC.587.Bogota Colombia

JORGENSEN, A. 1990. Microbiología de las fermentaciones industriales. Séptima Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 22-25 p

LEESON, S. y SUMMERS,J.2000. Nutrición Aviar Comercial. Editorial Le’Print Club Express Ltda. Bogota, Colombia 43-45 p.

MALAKAR,P;Martens,D;Zwietering,M.1999.Modeling the interaction between *Lactobacillus curvatus* and *Enterobacter cloacae*. II. Mixel cultures end Shelf life predictions. International Journal of Food Microbiology.51:67-69

McCabe Warren L, Smith Julian C. y Harriott Meter. Operaciones unitarias en Ingeniería Química. 4ª ed. México: Editorial McGraw-Hill, 2000. 1114 pp.

NAVEENA, B., M. Altaf, K. Bhadrappa, S. Madhavendra, and G. Reddy. 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 Biochem. 40:681-690.

SCHAFFER,B.2004. Examination of the growth of probiotic culture combinations by the isoperibolic batch calorimetry. Thermochemica Acta. 415: 123-126.

SERNA COCK LILIANA .2005. Producción de Acido Láctico por una mezcla de *Lactococcus Lactis* y *Streptococcus Salivarius* en Fermentación en Discontinuo. Revista Colombiana de Biotecnología.vol.VII, numero 001. Universidad Nacional de Bogotá pp.32-38

SERNA COCK LILIANA. 2007.Producción Económica de Ácido Láctico Utilizando Residuos de Cosecha y Jugos de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, A.A 237, Palmira, Colombia. (Enero-Marzo 2007).

SHAKER MULT-Tier Environmental, INNOVA 4900, new Brunswick scientific co. inc. edition, New Jersey USA

SPENCER Meade. “Manual de Azucar de Caña”.Pag.311.

TEAGUARO, 2005, Perfil del Proyecto de Investigación “El empleo de Melaza para la Obtención de Alcohol Etilico. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

TEJAYADI, S., and M. Cheryan. 1995. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:242-248.

WANG,Y.2003. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneous with *bifidobacteria*. Food Microbiology.20:333-338

YOUNG-JUNG, W., K. Jin-Nam, Y. Jong-Sun, and R. Hwa-Won. 2004. Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. Enzyme Microb. Technol. 35:568-573.

INTERNET

www.monografias.melaza.com

www.es.wikilingue.com

www.wikipedis.

www.quiminet.com

www.USAID RED Produccion Uso de Melaza

www.es.wikipedia.org

ANEXOS

ANEXO A

PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS MUESTRAS DE MELAZA

Tabla 13

DATOS EXPERIMENTALES

Valores obtenidos de las propiedades físicas de las diferentes muestras de melaza. (Peso de melaza/volumen de agua)

Propiedades físicas de las diluciones de melaza	Concentración 20% (p/v)	Concentración 30% (p/v)	Concentración 40% (p/v)
Solido Solubles (°Brix)	20	26	32
ml gastados de NaOH (ml)	0.02	0.03	0.03

Tabla 14

DATOS EXPERIMENTALES

Valores de pH de las diferentes muestras de melaza.
(Peso de melaza/volumen de agua)

Propiedades físicas de las diluciones de melaza	Concentración 20% (p/v)	Concentración 30% (p/v)	Concentración 40% (p/v)
pH	5.7	5.4	5.3

Tabla 15

DATOS EXPERIMENTALES

Porcentaje de ácido aconítico de las diferentes muestras de melaza.
(Peso de melaza/volumen de agua)

Propiedades físicas de las diluciones de melaza	Concentración 20%	Concentración 30%	Concentración 40%
pH	5.7	5.4	5.3
Solido Solubles (°Brix)	20	26	32
% de ácido aconítico	0.012	0.012	0.012

ANEXO B

PROPIEDADES FISICO QUIMICAS DEL PRODUCTO OBTENIDO (ácido láctico)

Tabla 16

DATOS EXPERIMENTALES

Valores de pH iniciales y finales de las diluciones de melaza utilizada a diferentes concentraciones y grados de pureza en tres réplicas.

Tratamientos: a₀b₀, a₀b₁, a₁b₀, a₁b₁, a₂b₀, a₂b₁.

Tratamientos	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		XpH	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
a ₀ b ₀	6,1	5,5	6,3	5,3	6,2	5,5	6,2	5,4
a ₀ b ₁	6	4,8	6,2	4,9	6	4,6	6,1	4,8
a ₁ b ₀	6	5,3	6,1	5,3	6	5,2	6,0	5,3
a ₁ b ₁	6	4,5	6,1	4,7	6	4,3	6,0	4,5
a ₂ b ₀	6,1	5,6	6,2	5,5	6,2	5,5	6,2	5,5
a ₂ b ₁	6,1	5,4	6,1	5,5	6	5,4	6,1	5,4

Tratamientos

a₀ b; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

a₀ b₁; melaza: 20% (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30% (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 17

DATOS EXPERIMENTALES

Valores de los °Brix iniciales y finales de las diluciones de melaza utilizada a diferentes concentraciones y grados de pureza en tres réplicas.

Tratamientos: a₀b₀, a₀b₁, a₁b₀, a₁b₁, a₂b₀, a₂b₁.

Tratamientos	Réplica 1 °Brix		Réplica 2 °Brix		Réplica 3 °Brix		X °Brix	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
a ₀ b ₀	20	17	20	16	20	17	20	17
a ₀ b ₁	20	16	20	17	20	16	20	16
a ₁ b ₀	26	20	26	20	26	19	26	20
a ₁ b ₁	26	18	26	18	26	17	26	18
a ₂ b ₀	32	29	32	29	32	28	32	29
a ₂ b ₁	32	28	32	29	32	29	32	29

Tratamientos

a₀ b; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

a₀ b₁; melaza: 20% (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30% (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 18

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de las tres replicas para NaOH 0.1N gastados en la titulación de los sustratos durante el tiempo de fermentación. Tratamientos:

(a₀b₀, a₁b₀, a₂b₀)

Tiempo(Horas)	Concentración 20%, sin filtrar	Concentración 30%, sin filtrar	Concentración 40%, sin filtrar
2	0,3	0,6	0,3
6	0,6	0,9	0,6
24	0,9	2,4	1,1
28	1,0	2,6	1,6
34	2,5	3,5	2,8
48	4,9	5,6	3,9
50	4,6	5,2	3,9
56	4,6	5,1	3,7
72	4,6	5,1	3,6

Tratamientos

a₀ b₀; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

Tabla 18-a

DATOS EXPERIMENTALES

Valores NaOH 0.1N gastados en la titulación por duplicado en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento: (a₀b₀, a₁b₀, a₂b₀)

Tiempo (Horas)	Réplica1					
	Concentración 20%, sin filtrar		Concentración 30%, sin filtrar		Concentración 40%, sin filtrar	
2	0.3	0.3	0.5	0.6	0.4	0.3
6	0.5	0.5	0.9	0.8	0.6	0.6
24	0.9	0.8	2.3	2.5	1.2	1.1
28	1.0	1.0	2.5	2.6	1.7	1.9
34	2.5	2.6	3.3	3.5	2.7	2.8
48	5.0	4.9	5.7	5.5	3.9	3.9
50	4.6	4.5	5.3	5.1	3.9	3.9
56	4.6	4.6	5.1	5.1	3.8	3.6
72	4.6	4.5	5.1	5.1	3.6	3.6

Tratamientos

a₀ b₀; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

Tabla 18-a

DATOS EXPERIMENTALES

Valores NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento: (a₀b₀, a₁b₀, a₂b₀)

Tiempo (Horas)	Réplica 2					
	Concentración 20%, sin filtrar		Concentración 30%, sin filtrar		Concentración 40%, sin filtrar	
2	0.2	0.3	0.6	0.6	0.3	0.3
6	0.7	0.6	0.9	0.9	0.7	0.6
24	1.0	0.9	2.4	2.5	1.2	1.2
28	1.1	1.0	2.7	2.6	1.5	1.6
34	2.4	2.5	3.6	3.5	2.9	2.8
48	4.8	4.6	5.7	5.6	3.9	3.8
50	4.6	4.6	5.1	5.2	3.7	3.8
56	4.5	4.6	5.1	5.1	3.6	3.6
72	4.6	4.5	5.1	5.1	3.6	3.6

Tratamientos

a₀ b₀; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

Tabla 18-a

DATOS EXPERIMENTALES

Valores NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza por duplicado durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento: (a₀b₀, a₁b₀, a₂b₀)

Tiempo (Horas)	Réplica 3					
	Concentración 20%, sin filtrar		Concentración 30%, sin filtrar		Concentración 40%, sin filtrar	
2	0.4	0.3	0.7	0.6	0.3	0.3
6	0.5	0.5	1.0	1.1	0.5	0.6
24	0.8	0.8	2.5	2.5	0.9	1.0
28	1.0	1.1	2.9	2.9	1.3	1.4
34	2.6	2.6	3.8	3.9	2.7	2.8
48	5.0	4.9	5.6	5.7	3.8	3.9
50	4.8	4.7	5.2	5.2	3.9	3.9
56	4.7	4.7	5.1	5.1	3.8	3.6
72	4.7	4.7	5.1	5.1	3.6	3.5

Tratamientos

a₀ b₀; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

Tabla 18-b

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento; a₀b₀

PROMEDIOS				Promedio de réplicas
Tiempo (Horas)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
2	0,3	0,3	0,4	0,3
6	0,5	0,7	0,5	0,6
24	0,9	1,0	0,8	0,9
28	1,0	1,1	1,1	1,0
34	2,6	2,5	2,6	2,5
48	5,0	4,7	5,0	4,9
50	4,6	4,6	4,8	4,6
56	4,6	4,6	4,7	4,6
72	4,6	4,6	4,7	4,6

Tratamiento; a₀b₀ melaza: 20 % (p/v), sin filtrar

Tabla 18-b

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento; a₁b₀

PROMEDIOS				Promedio de réplicas
Tiempo (Horas)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
2	0,6	0,6	0,6	0,6
6	0,9	0,9	0,9	0,9
24	2,4	2,5	2,4	2,4
28	2,6	2,7	2,6	2,6
34	3,4	3,6	3,5	3,5
48	5,6	5,7	5,6	5,6
50	5,2	5,2	5,2	5,2
56	5,1	5,1	5,1	5,1
72	5,1	5,1	5,1	5,1

Tratamiento; a₁b₀ melaza: 30 % (p/v), sin filtrar

Tabla 18-b

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento; a₁b₀

PROMEDIOS				Promedio de réplicas
Tiempo (Horas)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
2	0,4	0,3	0,3	0,3
6	0,6	0,7	0,6	0,6
24	1,2	1,2	1,0	1,1
28	1,8	1,6	1,4	1,6
34	2,8	2,9	2,8	2,8
48	3,9	3,9	3,9	3,9
50	3,9	3,8	3,9	3,9
56	3,7	3,6	3,7	3,7
72	3,6	3,6	3,6	3,6

Tratamiento; a₂b₀ melaza: 40 % (p/v), sin filtrar

Tabla 19

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de las tres replicas para NaOH 0.1N gastados en la titulación de los sustratos durante el tiempo de fermentación. Tratamiento: (a₀b₁, a₁b₁, a₂b₁)

Tiempo (Horas)	Concentración 20%, sin filtrar	Concentración 30%, sin filtrar	Concentración 40%, sin filtrar
2	0,7	0,8	0,5
6	1,3	1,3	1,0
24	8,7	8,4	2,3
28	11,5	11,5	2,8
34	16,2	15,8	3,3
48	29,9	30,6	8,3
50	31,5	32,0	8,2
56	31,1	31,9	8,1
72	30,9	31,8	7,9

Tratamientos

a₀ b₁; melaza: 20 % (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30 % (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 19-a

DATOS EXPERIMENTALES

Valores NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza por duplicado durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento: (a₀b₁, a₁b₁, a₂b₁)

Tiempo (Horas)	Réplica 1					
	Concentración 20%, sin filtrar		Concentración 30%, sin filtrar		Concentración 40%, sin filtrar	
2	0.7	0.9	0.7	0.8	0.5	0.5
6	1.3	1.5	1.0	1.2	0.9	1.0
24	8.4	8.1	8.3	8.1	2.1	2.3
28	10.9	11.2	11.3	11.5	2.6	2.8
34	16.2	15.9	15.6	15.7	3.2	3.3
48	29.9	28.7	30.1	30.3	8.5	8.3
50	30.8	31.2	31.8	31.9	8.1	8.1
56	31.0	31.1	31.7	31.8	8.1	8.1
72	31.1	30.9	31.8	31.8	7.8	8.0

Tratamientos

a₀ b₁; melaza: 20 % (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30% (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 19-a
DATOS EXPERIMENTALES

Valores NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza por duplicado durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento: (a₀b₁, a₁b₁, a₂b₁)

Tiempo (Horas)	Réplica 2					
	Concentración 20%, sin filtrar		Concentración 30%, sin filtrar		Concentración 40%, sin filtrar	
2	0.7	0.8	0.9	0.8	0.4	0.5
6	1.6	1.3	1.7	1.5	1.1	0.9
24	9.4	9.2	8.6	8.4	2.6	2.3
28	11.6	11.4	11.7	11.6	2.9	2.8
34	16.4	16.2	16.3	15.9	3.1	3.0
48	30.2	30.1	31.6	31.5	7.9	8.1
50	32.2	32.1	32.1	31.9	8.0	8.0
56	31.1	31.1	31.8	31.9	8.0	8.0
72	31.1	30.9	31.8	31.8	7.8	8.0

Tratamientos

a₀ b₁; melaza: 20 % (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30 % (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 19-a

DATOS EXPERIMENTALES

Valores NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza por duplicado durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento: (a₀b₁, a₁b₁, a₂b₁)

Tiempo (Horas)	Réplica 3					
	Concentración 20%, sin filtrar		Concentración 30%, sin filtrar		Concentración 40%, sin filtrar	
2	0.7	0.6	0.6	0.8	0.6	0.5
6	1.1	1.2	1.3	1.3	0.9	1.1
24	8.7	8.6	8.5	8.7	2.3	2.2
28	11.9	11.7	11.6	11.5	2.7	2.7
34	16.1	16.3	15.7	15.8	3.5	3.4
48	30.2	30.3	29.9	30.1	8.6	8.5
50	31.2	31.3	32.2	31.9	8.4	8.4
56	31.2	31.1	32.2	32.1	8.3	8.3
72	31.1	30.0	31.9	31.9	7.8	8.0

Tratamientos

a₀ b₁; melaza: 20 % (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30 % (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 19-b

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento; a₀b₁

PROMEDIOS				Promedio de réplicas
Tiempo (Horas)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
2	0,8	0,8	0,7	0,7
6	1,4	1,5	1,2	1,3
24	8,3	9,3	8,7	8,7
28	11,1	11,5	11,8	11,5
34	16,1	16,3	16,2	16,2
48	29,3	30,2	30,3	29,9
50	31,0	32,2	31,3	31,5
56	31,1	31,1	31,2	31,1
72	31,0	31,0	30,6	30,9

Tratamiento; a₀b₁: melaza: 30 % (p/v), filtrada

Tabla 19-b

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento; a₁b₁

PROMEDIOS				Promedio de réplicas
Tiempo (Horas)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
2	0,8	0,9	0,7	0,8
6	1,1	1,6	1,3	1,3
24	8,2	8,5	8,6	8,4
28	11,4	11,7	11,6	11,5
34	15,7	16,1	15,8	15,8
48	30,2	31,6	30,0	30,6
50	31,9	32,0	32,1	32,0
56	31,8	31,9	32,2	31,9
72	31,8	31,8	31,9	31,8

Tratamiento; a₁b₁: melaza: 30 % (p/v), filtrada

Tabla 19-b

DATOS EXPERIMENTALES

Valores promedios de NaOH 0.1N gastados en la titulación en muestras de melaza durante el tiempo de fermentación.

Tratamiento; a₂b₁

PROMEDIOS				Promedio de réplicas
Tiempo (Horas)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
2	0,5	0,5	0,6	0,5
6	1,0	1,0	1,0	1,0
24	2,2	2,5	2,3	2,3
28	2,7	2,9	2,7	2,8
34	3,3	3,1	3,5	3,3
48	8,4	8,0	8,6	8,3
50	8,1	8,0	8,4	8,2
56	8,1	8,0	8,3	8,1
72	7,9	7,9	7,9	7,9

Tratamiento; a₂b₁: melaza: 40 % (p/v), filtrada

ANEXO C-1

PORCENTAJE DE ACIDEZ DE LAS MUESTRAS EN FERMENTACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Tabla 20

RESULTADOS EXPERIMENTALES

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE ACIDEZ EN FUNCIÓN DEL
TIEMPO**

TRATAMIENTO: a₀b₀				
Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
(Horas)	% de acidez	% de acidez	% de acidez	% de acidez
2	0,027	0,0225	0,0315	0,027
6	0,045	0,0585	0,045	0,0495
24	0,0765	0,0855	0,072	0,078
28	0,09	0,0945	0,0945	0,093
34	0,2295	0,2205	0,234	0,228
48	0,4455	0,423	0,4455	0,438
50	0,4095	0,414	0,4275	0,417
56	0,414	0,4095	0,423	0,4155
72	0,4095	0,4095	0,423	0,414

Tratamiento: a₀ b₀, melaza: 20 % (p/v), sin filtrar

Tabla 21

RESULTADOS EXPERIMENTALES

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE ACIDEZ EN FUNCIÓN DEL
TIEMPO**

TRATAMIENTO: a₁b₀				
Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
(Horas)	% de acidez	% de acidez	% de acidez	% de acidez
2	0,0495	0,054	0,0585	0,054
6	0,0765	0,081	0,0945	0,084
24	0,216	0,2205	0,225	0,2205
28	0,2295	0,2385	0,261	0,243
34	0,306	0,3195	0,3465	0,324
48	0,504	0,5085	0,5085	0,507
50	0,468	0,4635	0,468	0,4665
56	0,459	0,459	0,459	0,459
72	0,459	0,459	0,459	0,459

Tratamiento: a₁ b₀, melaza: 30 % (p/v), sin filtrar

Tabla 22

RESULTADOS EXPERIMENTALES

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE ACIDEZ EN FUNCIÓN DEL
TIEMPO**

TRATAMIENTO :a₂b₀				
Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
(Horas)	% de acidez	% de acidez	% de acidez	% de acidez
2	0,0315	0,027	0,027	0,0285
6	0,054	0,0585	0,0495	0,054
24	0,1035	0,108	0,0855	0,099
28	0,162	0,1395	0,1215	0,141
34	0,2475	0,2565	0,2475	0,2505
48	0,351	0,3465	0,3465	0,348
50	0,351	0,3375	0,351	0,3465
56	0,333	0,324	0,333	0,33
72	0,324	0,324	0,3195	0,3225

Tratamiento: a₂ b₀; melaza: 40 % (p/v), sin filtrar

Tabla 23

RESULTADOS EXPERIMENTALES

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE ACIDEZ EN FUNCIÓN DEL
TIEMPO**

TRATAMIENTO: a₀b₁				
Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
(Horas)	% de acidez	% de acidez	% de acidez	% de acidez
2	0,072	0,0675	0,0585	0,066
6	0,126	0,1305	0,1035	0,12
24	0,7425	0,837	0,7785	0,786
28	0,9945	1,035	1,062	1,0305
34	1,4445	1,467	1,458	1,4565
48	2,637	2,7135	2,7225	2,691
50	2,79	2,8935	2,8125	2,832
56	2,7945	2,799	2,8035	2,799
72	2,79	2,79	2,7495	2,7765

Tratamiento: a₀ b₁; melaza: 20 % (p/v), filtrada.

Tabla 24

RESULTADOS EXPERIMENTALES

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE ACIDEZ EN FUNCIÓN DEL
TIEMPO**

TRATAMIENTO: a₁b₁				
Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
(Horas)	% de acidez	% de acidez	% de acidez	% de acidez
2	0,0675	0,0765	0,063	0,069
6	0,099	0,144	0,117	0,12
24	0,738	0,765	0,774	0,759
28	1,026	1,0485	1,0395	1,038
34	1,4085	1,449	1,4175	1,425
48	2,718	2,8395	2,7	2,7525
50	2,8665	2,88	2,8845	2,877
56	2,8575	2,8665	2,8935	2,8725
72	2,862	2,862	2,871	2,865

Tratamiento: a₁ b₁; melaza: 30 % (p/v), filtrada.

Tabla 25

RESULTADOS EXPERIMENTALES

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE ACIDEZ EN FUNCIÓN DEL
TIEMPO**

TRATAMIENTO: a₂b₁				
Tiempo	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
(Horas)	% de acidez	% de acidez	% de acidez	Promedio
2	0,045	0,0405	0,0495	0,045
6	0,0855	0,09	0,09	0,0885
24	0,198	0,2205	0,2025	0,207
28	0,243	0,2565	0,243	0,2475
34	0,2925	0,2745	0,3105	0,2925
48	0,756	0,72	0,7695	0,7485
50	0,729	0,72	0,756	0,735
56	0,729	0,72	0,747	0,732
72	0,711	0,711	0,711	0,711

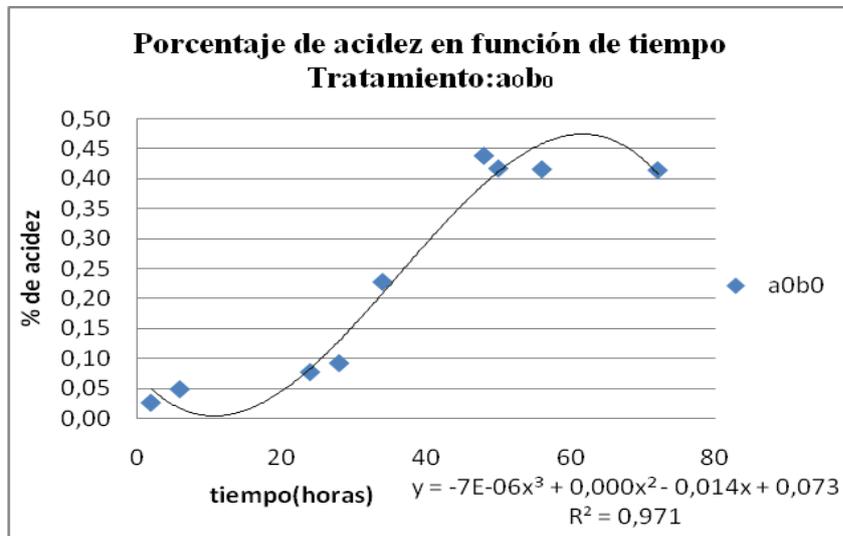
Tratamiento: a₂ b₁; melaza: 40 % (p/v), filtrada.

ANEXO C-2

GRÁFICOS DE PORCENTAJE DE LA ACIDEZ EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Gráfico. 1. Porcentaje de acidez en función del tiempo.

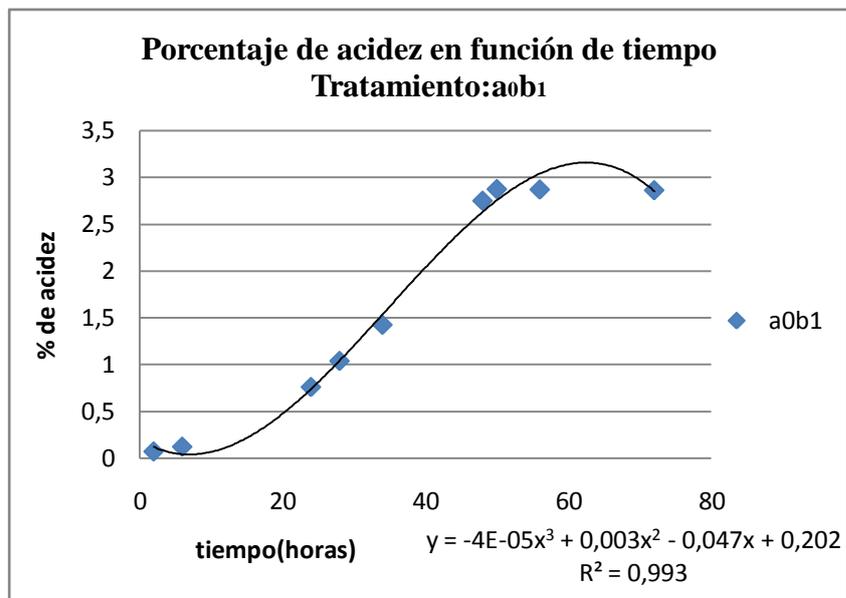
Tratamientos: a₀b₀



Tratamiento; a₀b₀: melaza (20%(p/v), sin filtrar)

Gráfico.2. Porcentaje de acidez en función del tiempo.

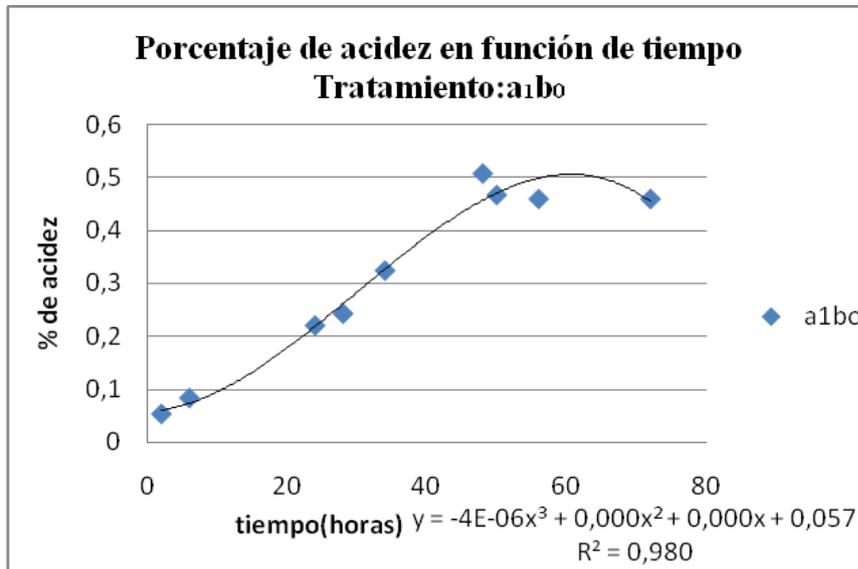
Tratamientos: a₀b₁



Tratamiento; a₀b₁: melaza (20%(p/v), filtrada)

Gráfico 3. Porcentaje de acidez en función del tiempo.

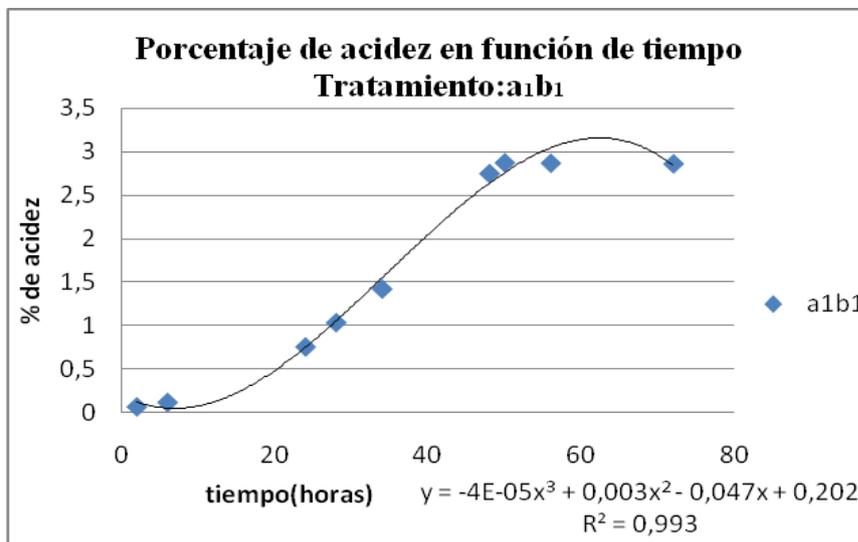
Tratamiento: a₁b₀ y a₁b₁.



Tratamiento; a₁b₀: melaza (30%(p/v), sin filtrar)

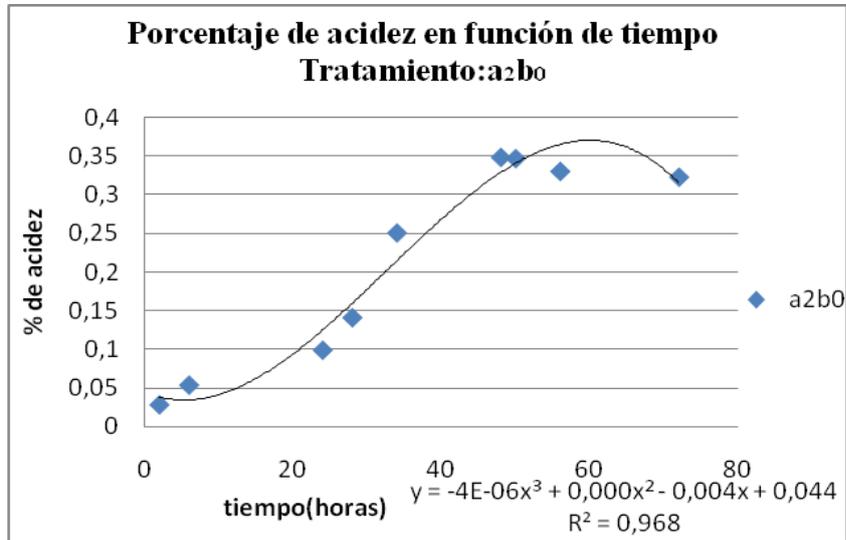
Gráfico 4. Porcentaje de acidez en función del tiempo.

Tratamiento: a₁b₁.



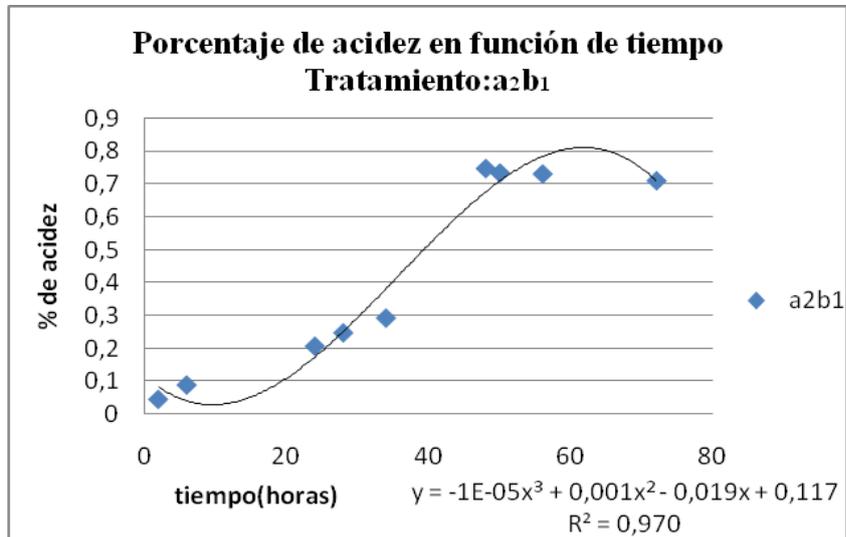
Tratamiento; a₁b₁: melaza (30%(p/v), filtrada).

Gráfico. 5. Porcentaje de acidez en función del tiempo.
Tratamiento: a₂b₀



Tratamiento: a₂b₀ melaza (40%(p/v), sin filtrar)

Gráfico. 6. Porcentaje de acidez en función del tiempo.
Tratamiento: a₂b₁



Tratamiento: a₂b₁ melaza (40%(p/v), filtrada).

ANEXO D

VELOCIDAD DE FERMENTACIÓN

Tabla 26

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Porcentajes de acidez alcanzados a las dos horas de fermentación de las diluciones de melaza utilizada, a diferentes concentraciones (20,30 y 40 (p/v)) y grados de pureza, en tres réplicas.

Tratamientos: a₀b₀, a₀b₁, a₁b₀, a₁b₁, a₂b₀, a₂b₁

2 horas				
Tratamientos	Réplica1	Réplica 2	Réplica3	Promedio
a ₀ b ₀	0,027	0,0225	0,0315	0,03
a ₀ b ₁	0,072	0,0675	0,0585	0,07
a ₁ b ₀	0,0495	0,054	0,0585	0,05
a ₁ b ₁	0,0675	0,0765	0,063	0,07
a ₂ b ₀	0,0315	0,027	0,027	0,03
a ₂ b ₁	0,045	0,0405	0,0495	0,05

Tratamientos

a₀ b₀; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

a₀ b₁; melaza: 20% (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30% (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 27

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Porcentajes de acidez alcanzados a las cuarenta y ocho horas de fermentación de las diluciones de melaza en tres réplicas.

Tratamientos: a₀b₀, a₀b₁, a₁b₀, a₁b₁, a₂b₀, a₂b₁

48 horas				
Tratamientos	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
a ₀ b ₀	0,4455	0,423	0,4455	0,44
a ₀ b ₁	2,637	2,7135	2,7225	2,69
a ₁ b ₀	0,504	0,5085	0,5085	0,51
a ₁ b ₁	2,718	2,8395	2,7	2,75
a ₂ b ₀	0,351	0,3465	0,3465	0,35
a ₂ b ₁	0,756	0,72	0,7695	0,75

Tratamientos

a₀ b₀; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar.

a₀ b₁; melaza: 20% (p/v), filtrada.

a₁ b₁; melaza: 30% (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

ANEXO E

ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO PARA SELECCIONAR EL MEJOR TRATAMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Tabla 28

RESULTADOS ESTADISTICOS

Tabla estadística ANOVA del porcentaje de acidez a las dos horas de fermentación.

Tratamientos: a₀b₀, a₀b₁, a₁b₀, a₁b₁, a₂b₀, a₂b₁.

ANOVA	SC	GL	CM	RV	Ftabla
A	0,23	2,00	0,12	28,99*	4,10
B	0,31	1,00	0,31	77,24*	4,96
AB	0,07	2,00	0,03	8,43*	4,10
R	0,00	2,00	0,00	0,03	4,10
Error	0,04	10,00	0,00		
Total	0,64	17,00			

*Significativo

Tratamientos:

a₀ b₀; melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.

a₁ b₀; melaza: 30 % (p/v), sin filtrar.

a₂ b₀; melaza: 40% (p/v), sin filtrar

a₀ b₁; melaza: 20% (p/v), filtrada

a₁ b₁; melaza: 30% (p/v), filtrada.

a₂ b₁; melaza: 40% (p/v), filtrada.

Tabla 29

RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Análisis de varianza de los porcentajes de acidez a las cuarenta y ocho horas de fermentación.

Tratamientos: a₀b₀, a₀b₁, a₁b₀, a₁b₁, a₂b₀, a₂b₁.

ANOVA	SC	GL	CM	Fcal	Ftabla
A	544,85	2	272,42	1381,90**	4,10
B	1481,49	1	1481,49	7514,97**	4,96
AB	421,96	2	210,98	1070,22**	4,10
R	0,20	2	0,10	0,51	4,10
Error	1,97	10	0,19		
Total	2450,48	17			

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

** Altamente Significativo.

Fcalculado > Ftablas; rechazo la hipótesis nula

Tabla 30

RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Prueba de diferenciación Tukey de los porcentajes de acidez a las cuarenta y ocho horas de fermentación verificación del mejor tratamiento.

Factor Combinación		Promedios	Grupos Homogéneos
a ₁ b ₁	melaza: 30% (p/v), filtrada	30.58	a
a ₀ b ₁	melaza: 20% (p/v), filtrada	29.90	ab
a ₂ b ₁	melaza: 40% (p/v), filtrada	8.31	b
a ₁ b ₀	melaza: 30 % (p/v), sin filtrar	5.63	b
a ₀ b ₀	melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.	4.86	b
a ₂ b ₀	melaza: 40% (p/v), sin filtrar	3.86	b

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Mejor tratamiento: a₁b₁ (melaza: 30% (p/v), filtrada)

Tabla 31**RESULTADOS ESTADÍSTICOS**

Análisis de varianza de los porcentajes de acidez a las setenta y dos horas de fermentación.

Tratamientos: a_0b_0 , a_0b_1 , a_1b_0 , a_1b_1 , a_2b_0 , a_2b_1 .

ANOVA	SC	GL	CM	F cal	Ftabla
A	612,15	2	306,07	20217,86* *	4,10
B	1641,64	1	1641,64	108438,9* *	4,96
AB	491,90	2	245,95	16246,43* *	4,10
R	0,0069	2	0,0034	0,22	4,10
Error	0,15	10	0,015		
Total	2745,86	17			

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

** Altamente Significativo.

Fcalculado \square Ftablas; rechazo la hipótesis nula

Tabla 32**RESULTADOS ESTADÍSTICOS**

Prueba de diferenciación Tukey de los porcentajes de acidez a las setenta y dos horas de fermentación; verificación del mejor tratamiento.

Factor Combinación		Promedios	Grupos Homogéneos
a_1b_1	melaza: 30% (p/v), filtrada	31.83	a
a_0b_1	melaza: 20% (p/v), filtrada	30.85	ab
a_2b_1	melaza: 40% (p/v), filtrada	7.90	b
a_1b_0	melaza: 30 % (p/v), sin filtrar	5.10	b
a_0b_0	melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.	4.60	b
a_2b_0	melaza: 40% (p/v), sin filtrar	3.58	b

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Mejor tratamiento: a_1b_1 (melaza: 30% (p/v), filtrada)

Tabla 33**RESULTADOS ESTADÍSTICOS**

Análisis de varianza de los valores de pH a las setenta y dos horas de fermentación.

Tratamientos: a_0b_0 , a_0b_1 , a_1b_0 , a_1b_1 , a_2b_0 , a_2b_1 .

ANOVA	SC	GL	CM	Fcal	Ftabla
A	1,10777778	2	0,55	44,12*	4,10
B	1,17555556	1	1,18	93,63*	4,96
AB	0,38777778	2	0,19	15,44*	4,10
R	0,04777778	2	0,02	1,90	4,10
Error	0,12555556	10	0,01		
Total	2,84444444	17			

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

*Significativo

Tabla 34**RESULTADOS ESTADÍSTICOS**

Prueba de diferenciación Tukey de los porcentajes de acidez a las setenta y dos horas de fermentación; verificación del mejor tratamiento.

Factor Combinación		Promedios	Grupos Homogéneos
a_1b_1	melaza: 30% (p/v), filtrada	4.5	a
a_0b_1	melaza: 20% (p/v), filtrada	4.76	ab
a_2b_1	melaza: 40% (p/v), filtrada	5.26	b
a_1b_0	melaza: 30 % (p/v), sin filtrar	5.43	b
a_0b_0	melaza: 20 % (p/v), sin filtrar.	5.43	b
a_2b_0	melaza: 40% (p/v), sin filtrar	5.53	b

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Mejor tratamiento: a_1b_1 (melaza: 30% (p/v), filtrada)

ANEXO F

ANÁLISIS DE COSTOS

Tabla 35

Materiales directos e indirectos para la producción de un litro de ácido láctico de 2.87% de acidez.

Cantidad	Descripción	Precio unitario	Precio total
3Kg	Melaza	0,05	0,15
0,3gr	<i>Lactobacillus</i>	0,6	0,18
1onza	Carbonato de calcio	0,35	0,35
4 unidades	Papel filtro	0,2	0,8
20 unidades	Frascos 50ml	0,07	1,4
20 unidades	Etiquetas	0,05	1
Suma total			3,88

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Costo de suministros

Servicio	Unidad	Consumo	Valor Unitario (\$)	Valor Total (\$)
Agua	m ³	0,02	0,01	0,0002
Luz	Kw-h	7,54	0,13	0,9802
Gas	Kg	14	2,5	2,5
			TOTAL (\$)	3,4804

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Costo del personal

Hombres	Sueldo	Costo Día (\$)	Costo Hora (\$)	Horas utilizadas	Total (\$)
1	270	13,5	1,6875	8	13,5
				TOTAL(\$)	13,5

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Tabla 36

Costo por hora del proceso aplicado asumiendo una producción de un litro de ácido láctico de 2.87% de acidez

Equipo	Costo (\$)	Vida Útil (años)	Costo Anual	Costo Día	Costo Hora	Horas de uso	Costo uso (\$)
Balanza analítica	320	10	32	0,128	0,016	1	0,016
Fermentador	180	10	18	0,072	0,009	24	0,216
Cocina industrial	120	10	12	0,048	0,006	2	0,012
Mini congelador	230	10	23	0,092	0,0115	24	0,276
Mesa	30	5	6	0,024	0,003	8	0,024
Centrífuga	720	10	72	0,288	0,036	1	0,036
Litreros	10	5	2	0,008	0,001	0,5	0,0005
Embudos	2	5	0,4	0,0016	0,0002	2	0,0004
Bureta	12	5	2,4	0,0096	0,0012	0,5	0,0006
Baldes	3	5	0,6	0,0024	0,0003	0,5	0,00015
pH metro	60	5	12	0,048	0,006	0,5	0,003
Utensilios de vidrio	40	5	8	0,032	0,004	1	0,004
						TOTAL(\$)	0,589

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

Tabla 37

**Estudio de la inversión para la producción de un litro de ácido
láctico de 2.87% de acidez**

Capital de Trabajo	Monto (\$)
1. Materiales Directos e Indirectos	3,88
2. Equipos y Utensilios	0,589
3. Suministros	3,4804
4. Personal	13,5
TOTAL (\$)	21,45
TOTAL (\$) + 20% (utilidades)	25.74

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)

CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN	1 lt
Costo unitario (50 ml)	\$ 1,07
PRECIO DE VENTA (costo unitario + 20% utilidad)	\$ 1,29

Elaborado por: Verónica Barrera, (2011)