



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Ingeniería Química

“Determinación de la cinética de fermentación láctica de hojas frescas de col (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*) en condiciones óptimas de temperatura, tiempo y concentración de NaCl”

Trabajo de titulación previo a
la obtención del título de
Ingeniero Químico

Autora:

María José Loja Vanegas.

C.I. 0105553317

Directora:

Mgst. Daniela Estefanía Zúñiga García

C.I. 0105275226

Cuenca-Ecuador

2019



RESUMEN

Desde hace mucho tiempo atrás se ha conocido los beneficios que aporta las hojas frescas de col (*Brassica Oleracea l. Var. Capitata l.*) fermentada a la salud de las personas que lo consumen, esto se ha demostrado en investigaciones recientes, denominando a éste producto un alimento probiótico. Es por ello que esta investigación está basada en optimizar los parámetros de operación como: la temperatura, el tiempo y la concentración de cloruro de sodio en la fermentación láctica de las hojas frescas de la col (*Brassica Oleracea l. Var. Capitata l.*), mediante el diseño experimental 2^k y evaluando el valor de pH para cada experimento, además de determinar su cinética de fermentación láctica natural en función de los azúcares consumidos en éstas condiciones, mediante el método integral y diferencial. Adicionalmente se realizó un recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) formadas. Se utilizaron técnicas instrumentales como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar los azúcares presentes, y no instrumentales como microbiología para determinar la cantidad de BAL, así como determinaciones de pH en las muestras. Los resultados obtenidos en esta investigación según el diseño experimental fueron los siguientes: una temperatura óptima de 25 °C, un tiempo de fermentación de 14 días y una concentración de NaCl del 3% p/p. De ello se obtuvo un orden de reacción para la glucosa de cero (método integral) y un pseudo orden 0.225 (método diferencial) y para la fructosa un orden dos en ambos casos, además se determinó las fases de crecimiento microbiano.

Palabras claves: Col. Chucrut. Fermentación láctica. Bacterias ácido lácticas. Optimización, cinética.



ABSTRACT

For a long time ago has known the benefits of fresh leaves of cabbage (*Brassica oleracea l. Var. Capitata l.*) fermented to the health of people who consume it, this has been demonstrated in recent research, calling to this product a food probiotic. That is why this research is based on optimizing the operation parameters such as: the temperature, time and the concentration of sodium chloride in the lactic fermentation of fresh leaves of cabbage (*Brassica oleracea l. Var. Capitata l.*), using the experimental design 2^k and evaluating the pH value for each experiment, in addition to determining its kinetics of lactic fermentation natural in function of the sugars consumed in these conditions, using the integral and differential method. Additionally a count was made of lactic acid bacteria (BAL) formed. Used instrumental techniques such as high-performance liquid chromatography performance (HPLC) to quantify sugars present and not instrumental as microbiology to determine the amount of BAL, as well as determinations of pH in the samples. The results obtained in this investigation according to the experimental design were the following: an optimum temperature of 25 °C, a time of fermentation of 14 days and a concentration of NaCl 3% w/w. It obtained an order of reaction to the glucose of zero (integral method) and a pseudo order 0.225 method (differential) and for the fructose an order two in both cases, in addition was determined phases of microbial growth.

Keywords: Cabbage. Sauerkraut. Lactic acid fermentation. Lactic acid bacteria. Optimization, kinetics



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTO.....	11
DEDICATORIA.....	12
INTRODUCCIÓN	13
CAPITULO 1. CONTENIDO TEÓRICO	15
1.1 COL BLANCA	15
1.1.1 Generalidades	15
1.1.2 Variedades	17
1.1.2.1 Según los cultivares.....	17
1.1.2.2 Por la duración del tiempo de cultivo.....	17
1.1.2.3 Por la forma de su cabeza.....	17
1.1.3 Clasificación taxonómica	18
1.1.4 Composición Química del Repollo	18
1.1.5 Importancia y usos de repollo	19
1.1.6 Procesamiento del repollo	20
1.2 FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS	20
1.2.1 Fermentación Láctica	21
1.2.2 Bacterias Ácido Lácticas	21
1.2.3 Clasificación de BAL.....	22
1.2.3.1 Según la fermentación de la lactosa	22
María José Loja Vanegas	4



1.2.3.2 Por su metabolismo de carbohidratos.....	22
1.2.3.3 Probióticos.....	23
1.2.4 Condiciones de operación para la fermentación láctica	23
1.2.4.1 Temperatura	23
1.2.4.2 Concentración de NaCl	23
1.2.4.3 Anaerobiosis.....	24
1.2.4.4 pH.....	24
1.2.4.5 Tiempo	24
CAPITULO 2. METODOLOGÍA.....	25
2.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	25
2.2 MATERIA PRIMA.....	26
2.2.1 Repollo (Brassica oleracea l. var. capitata l.).....	26
2.2.2 NaCl	26
2.3 ELABORACIÓN DE CHUCRUT.....	26
2.3.1 Recepción de la materia prima.....	26
2.3.2 Partido y descorazonado.....	26
2.3.3 Lavado y desinfectado.....	26
2.3.4 Picado.....	27
2.3.5 Salado.....	27
2.3.6 Prensado	27
2.3.7 Llenado y etiquetado	27
2.3.8 Almacenado.....	27
2.4 MÉTODO PARA OPTIMIZAR LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN EN LA FERMENTACIÓN LÁCTICA	27



2.4.1 Diseño Factorial 2^k	27
2.4.2 Determinación del pH	29
2.4.3 Determinación de la acidez titulable	29
2.4.4 Parámetros óptimos de operación	29
2.5. CINÉTICA QUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA	30
2.5.1 Determinación del consumo de la glucosa y de la fructosa	30
2.5.2. Determinación de los parámetros cinéticos.....	31
2.5.2.1. Método integral	31
2.5.2.2. Método diferencial	31
2.6. CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS E IDENTIFICACIÓN DE LAS FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	32
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
3.1 OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LA FERMENTACIÓN LÁCTICA.....	33
3.1.1 Parámetros Óptimos de Operación.....	34
3.2 CINÉTICA QUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA	35
3.2.1 Cuantificación de la glucosa y fructosa consumida	35
3.2.2 Parámetros Cinéticos.....	38
3.2.2.1 Método Integral	38
3.2.2.2 Método Diferencial	42
3.3 ECUACIÓN CINÉTICA.....	44
3.3.1 Fase de crecimiento microbiano.....	45
CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
4.1 CONCLUSIONES	46
4.2 RECOMENDACIONES	47
María José Loja Vanegas	6



Bibliografía.....	49
-------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Col (Brassica oleracea l. var. capitata l.)</i>	16
Figura 2. <i>Transformación de la glucosa en ácido láctico.</i>	21
Figura 3. <i>Esquema de la fermentación homoláctica y heteroláctica</i>	23
Figura 4. <i>Curva de calibración de la glucosa.</i>	30
Figura 5. <i>Curva de calibración de la fructosa.</i>	31
Figura 6. <i>Consumo de glucosa durante la fermentación</i>	35
Figura 7. <i>Consumo de fructosa durante la fermentación</i>	36
Figura 8. <i>Modelo por Saeman</i>	37
Figura 9. <i>Consumo de glucosa (cinco últimos datos)</i>	37
Figura 10. <i>Consumo de fructosa (cinco últimos datos)</i>	38
Figura 11. <i>Modelo cinético para orden cero. (Glucosa)</i>	39
Figura 12. <i>Modelo cinético para orden cero. (Fructosa)</i>	39
Figura 13. <i>Modelo cinético para primer orden. (Glucosa)</i>	40
Figura 14. <i>Modelo cinético para primer orden. (Fructosa)</i>	40
Figura 15. <i>Modelo cinético para segundo orden. (Glucosa)</i>	41
Figura 16. <i>Modelo cinético para segundo orden. (Fructosa)</i>	41
Figura 17. <i>Tangentes trazadas en la curva de concentración de la glucosa</i>	42
Figura 18. <i>Tangentes trazadas en la curva de concentración de la fructosa</i>	43
Figura 19. <i>Gráfico de $\ln(r_A \text{ Glucosa})$ Vs $\ln C_{\text{Glucosa}}$</i>	43
Figura 20. <i>Gráfico de $\ln(r_A \text{ Fructosa})$ Vs $\ln C_{\text{Fructosa}}$</i>	44
Figura 21. <i>Fases de crecimiento de BAL</i>	45



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Provincias del Ecuador en dónde se cultiva la col	17
Tabla 2. Clasificación taxonómica del repollo (<i>Brassica oleracea l. var capitata l.</i>)	18
Tabla 3. Composición química del repollo (<i>Brassica oleracea l. var. capitata l.</i>)	19
Tabla 4. Diseño experimental 2^k	28
Tabla 5. Matriz de diseño factorial completo 2^k de tres variables con dos niveles	28
Tabla 6. Matriz modelo del diseño factorial 2^3 para las variables temperatura, tiempo y %NaCl	33
Tabla 7. Valores de los coeficientes de los efectos de las variables	33
Tabla 8. Ecuación cinética de la fermentación láctica del repollo.....	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cinética Química	51
Anexo 2. Método integral	51
Anexo 3. Método diferencial.....	52
Anexo 4. Crecimiento microbiano	53
Anexo 5. Cromatografía	53
Anexo 6. Diseño factorial completo 2^k	54
Anexo 7. Aplicación del método integral para la glucosa.	55
Anexo 8. Aplicación del método integral para la fructosa.	55
Anexo 9. Resultados de análisis de BAL, realizados por el laboratorio “MSV”	56
Anexo 10. Descripción del equipo y condiciones utilizadas para el análisis de muestras en HPLC.....	56
Anexo 11. Resultados obtenidos en HPLC y curvas de cada una de las muestras entregadas en el laboratorio.	57
Anexo 12. pH y acidez del diseño experimental	63
Anexo 13. pH tomado en el líquido de gobierno del chucrut cada 12 horas	64
Anexo 14. Fotos durante el proceso de investigación	64



Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

Yo, María José Loja Vanegas en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Determinación de la cinética de fermentación láctica de hojas frescas de col (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) en condiciones óptimas de temperatura, tiempo y concentración de NaCl", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de Mayo del 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. J. Loja Vanegas", is written over a horizontal line.

María José Loja Vanegas

C.I. 0105553317



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, María José Loja Vanegas, autora del trabajo de titulación "Determinación de la cinética de fermentación láctica de hojas frescas de col (*Brassica oleracea* l. var. capitata l.) en condiciones óptimas de temperatura, tiempo y concentración de NaCl", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 17 de Mayo del 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. J. Loja Vanegas', written over a horizontal line.

María José Loja Vanegas.

C.I. 0105553317



AGRADECIMIENTO

Primeramente, le doy gracias a Dios por la vida que me da, luego a toda mi familia en especial a mi esposo, a mi papi y a mi ñaña por la inmensa paciencia y por todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado durante ésta larga travesía, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible alcanzar todos estos logros.

Gracias a mis docentes que de una u otra forma han estado ahí para apoyarme y ayudarme a lo largo de toda mi carrera universitaria.

Le agradezco a mi tutora por su ayuda, por el apoyo que me ha dado y por el empeño en esta tesis.

También les agradezco a mis compañeros que gracias a sus ocurrencias las jornadas de clases eran más livianas y llenas de felicidad.



DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi querido esposo que ha sido mi apoyo a lo largo de todo este trayecto, a mis hijos Ángeles y Daniel ya que ellos son mi motivación para seguir adelante día a día, a mi mami que, aunque ya no esté presente fue la persona que estuvo luchando junto a mí siempre, mi papito que siempre ha estado ahí cuando lo he necesitado, a mi hermana por ayudarme siempre y a toda mi familia que a día a día han estado a mi lado en todo este largo camino.



INTRODUCCIÓN

La fermentación de la col blanca llamada popularmente chucrut es muy consumido en varios países, principalmente en el continente europeo, debido al gran sabor que presenta y a sus múltiples propiedades que aporta a la salud humana (Garrido & Aparicio, 2016). Para dar paso a la fermentación se le adiciona cloruro de sodio, que inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables (García Zapata, 2015). Al llevarse a cabo la fermentación láctica para obtener el chucrut, crecen *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* spp, siendo éstos los responsables para considerar a un alimento como probiótico (Matsumoto & Sánchez, 2013). Al ser considerado un producto fermentado se lo engloba dentro del grupo de los encurtidos, ya que no existe una norma específica para éste alimento (Garrido, Alarcón, Toledano, Ordoñez, & Pérez, 2016).

En la actualidad se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas (BAL) al estar presentes en un producto genera componentes beneficiosos para la salud, como por ejemplo: la absorción de Ca, Fe, P y algunas vitaminas, mejoran el cerebro de los niños, ayudan en el proceso digestivo, fortalecen el sistema inmunológico, disminuyen infecciones del intestino y desechan toxinas (Matsumoto & Sánchez, 2013).

Por ello, se planteó elaborar chucrut a partir de hojas frescas de col (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*) a través de una fermentación láctica natural aprovechando las bacterias lácticas presentes en la misma, optimizando parámetros como: temperatura, tiempo y concentración de cloruro de sodio, empleando un diseño experimental factorial 2^k cuyo valor de respuesta fue el pH. Paralelamente se cuantificó la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) en el medio, la cinética de fermentación láctica mediante dos métodos: el integral y el diferencial, para

María José Loja Vanegas



determinar el orden y la velocidad de reacción. Finalmente, se concluyó cuál era el mejor método para la determinación de la cinética química y los mejores parámetros para llevar a cabo la elaboración de un producto probiótico que en este caso es el chucrut.

En el primer capítulo se presenta una breve conceptualización del repollo (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*) y de la fermentación láctica.

En el capítulo dos se plantea la metodología empleada, el diseño experimental utilizado y las técnicas empleadas para el desarrollo de este trabajo.

En el capítulo tres se hace un análisis más profundo de los parámetros óptimos para llevar a cabo la fermentación láctica y se determina su cinética química.

En capítulo cuatro en base de los resultados obtenidos, se recoge las conclusiones y recomendaciones que se derivan de la presente tesis.



CAPITULO 1. CONTENIDO TEÓRICO

1.1 COL BLANCA (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*)

1.1.1 Generalidades

La col blanca es un vegetal de la familia de las crucíferas, presenta una raíz gruesa, pulposa, de tallo pequeño sin ramificaciones, el fruto está formado por hojas imbricadas (Cevallos, 2012). Después de sembradas las semillas se empieza a cultivar entre los 85 y 105 días, se estima que en una hectárea se pueden cosechar de 30000 a 35000 plantas (Morocho, 2016).

Según (FAO, s.f.), se desarrolla mejor en climas fríos desde los 500 metros sobre el nivel del mar (msnm), en suelos limo arenosos, abonados con materia orgánica y bien drenados. Hay un sin número de variedades agrupándose por: su subvariedad botánica, su forma, su precocidad y su uso. El repollo está constituido por un pequeño tallo corto grueso, el mismo que soporta a las hojas que se encuentran desplegadas que constituyen un conjunto más o menos compacto. Las hojas que están en la parte interna son más pequeñas debido a que no pueden expandirse, no así las que están en la parte externa que son más grandes. Pueden adoptar diferentes formas, pero las más comunes son: redondas, ovaladas o cónicas. Presenta una superficie lisa o crespada, y su tamaño es variable, van desde los 20 a 30 cm de diámetro, pudiendo alcanzar hasta los 50 cm, tiene un color que varía entre verde, azul-verdoso y morado.



Figura 1. Col (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)
Fuente: (Umpierre, 2017)

Es proveniente de las costas del Mediterráneo y Europa Occidental, en las zonas litorales y costeras de Dinamarca, Inglaterra, Francia y Grecia crece de forma silvestre, se considera que fue cultivado hace 2500 a.C por los egipcios y luego por los griegos, ya que la consideraban una planta medicinal (Fuentes & Pérez, 2003).

En el Ecuador muchas personas cultivan la col hoy en día, como una opción para mejorar la situación económica del productor, en la región Sierra se cosecha 111160 toneladas en una superficie de 1786 hectáreas, dando un rendimiento de 62.2t/ha (Morocho, 2016), la localización de las principales plantaciones se pueden apreciar en la tabla 1.



Tabla 1. Provincias del Ecuador en dónde se cultiva la col

Provincias	Producción t/ha
Cotopaxi	25200
Pichincha	14652
Imbabura	6689
Azuay	698
Cañar	386
Chimborazo	190
Tungurahua	190

Fuente: (Gambo, 2010)

1.1.2 Variedades

1.1.2.1 Según los cultivares

Se divide en dos variedades botánicas de *Brassica oleracea L.*: *Brassica oleracea L. var. bullata* aquí están las coles o repollos de Milán que tienen hojas rizadas gruesas, y la *Brassica oleracea L. var. capitata* en ésta se encuentran las coles de hojas lisas con una tonalidad de color más baja que la anterior, es por ello que se la llama “col blanca” (González, 2010).

1.1.2.2 Por la duración del tiempo de cultivo

Se clasifica en dos variedades: las que maduran entre los 50 días son **las tempranas**, tienen cogollos cortos y no pueden almacenarse por lo que hay que consumirlas inmediatamente, en cambio **las tardías** maduran alrededor de los 80 días, poseen cogollos más grandes, son suministros en la época de invierno, se pueden almacenar dándoles un tratamiento previo como: escaldado, acidificado o cocido (Ramos, 2007).

1.1.2.3 Por la forma de su cabeza

Pueden ser redondos, chatos y cónicos, siendo los de cabeza redonda los que más se cultivan (Bolaños, 1998).



1.1.3 Clasificación taxonómica

Según los investigadores el repollo tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 2. *Clasificación taxonómica del repollo (Brassica oleracea l. var capitata l.)*

<i>Denominación</i>	<i>Nombre</i>
Clase	Magnoliopsida
Sub clase	Dillenidae
Orden	Caprales
Familia	Brassicaceae
Género	Brassica
Especie	Oleracea
Variedad	Capitata
N. Científico	Brassica oleracea var. capitata L.
N. Común	Repollo

Fuente: (Cruz, 2007)

1.1.4 Composición Química del Repollo (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*)

En la tabla 3 se puede apreciar los valores nutricionales por cada 100g de repollo comestible, destacándose su alto contenido en Calcio y en vitamina C, ya que en comparación con otros vegetales la cantidad que posee el repollo de ésta vitamina es muy elevado. (Jinde, 2014).



Tabla 3. Composición química del repollo (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*)

Denominación	Unidad	Cantidad
Humedad	%	92,15
Calorías	cal	25
Proteína	g	1,44
Extracto Etéreo	g	0,27
Ceniza	g	0,71
Carbohidratos	g	5,43
Fibra	g	2,3
Calcio	mg	47
Fósforo	mg	23
Hierro	mg	0,59
Caroteno	mg	0,18
Tiamina	mg	0,05
Riboflavina	mg	0,04
Niacina	mg	0,3
Vitamina C	mg	32,2

Fuente: (Jinde, 2014)

1.1.5 Importancia y usos de repollo

En todo el mundo la col tiene mucha importancia tanto económica como por sus propiedades nutricionales, en los últimos años se ha incrementado su demanda, debido a que las personas optan por una vida más saludable introduciendo en su dieta una mayor cantidad de hortalizas (Ramos, 2007).

Las hojas de la col pueden consumirse de diferentes formas ya sean frescas, cocinadas o fermentadas como es el caso del chucrut, este último producto proviene de Asia y es muy apetecido en muchos países, debido al alto contenido en vitamina C y hierro, además tiene glucosinolatos que se transforman en isotiocianatos los mismos que combaten el cáncer y también reduce el colesterol sanguíneo (Fuentes & Pérez, 2003).



Las hojas frescas del repollo se consumen en ensaladas, sopas o para acompañar otros alimentos. También lo podemos procesar, esto se lo lleva a cabo mediante una fermentación láctica natural al adicionarle cloruro de sodio a las hojas previamente picadas, esto es el denominado chucrut (FAO, s.f.).

1.1.6 Procesamiento del repollo

El chucrut es el producto que resulta de la fermentación láctica natural del repollo (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*), para su elaboración se cortan finamente las hojas frescas del repollo y se le adiciona cloruro de sodio para que comience la fermentación siendo las responsables de ello las bacterias ácido lácticas, las primeras BAL en desarrollarse son del tipo *Leuconostoc mesenteroides* que consumen los azúcares presentes por vía heterofermentativa, luego participan los *Lactobacillus plantarum*, descomponiendo los azúcares por vía homofermentativa, por lo general con la aparición de dicha bacteria se termina la fermentación en los vegetales (Matsumoto & Sánchez, 2013).

Algunos de los elementos más importantes en la elaboración del chucrut es la concentración de cloruro de sodio presente y la temperatura a la cual se desarrolle el proceso de fermentación ya que de esto depende el desarrollo y crecimiento de BAL (Thakur & Kabir, 2015).

1.2 FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS

La fermentación es uno de los métodos más utilizados para alargar la vida de los alimentos, el hombre lo ha venido utilizando desde hace miles de años como en: la elaboración de quesos, encurtidos, etc., es un proceso parcial o completamente anaerobio en donde las bacterias o levaduras descomponen azúcares, y las transforman en etanol, ácido láctico o butírico (Puerta, 2010).

Existe un gran consumo de productos alimenticios que se han producido mediante una fermentación natural, gracias a que aportan muchos beneficios a la salud (Gómez, 2017).

1.2.1 Fermentación Láctica

Se define como un proceso anaeróbico, en dónde las bacterias ácido lácticas descomponen los azúcares presentes en el alimento para producir principalmente ácido láctico. Este tipo de fermentación es muy utilizada para conservar los alimentos (Bailón, 2012).

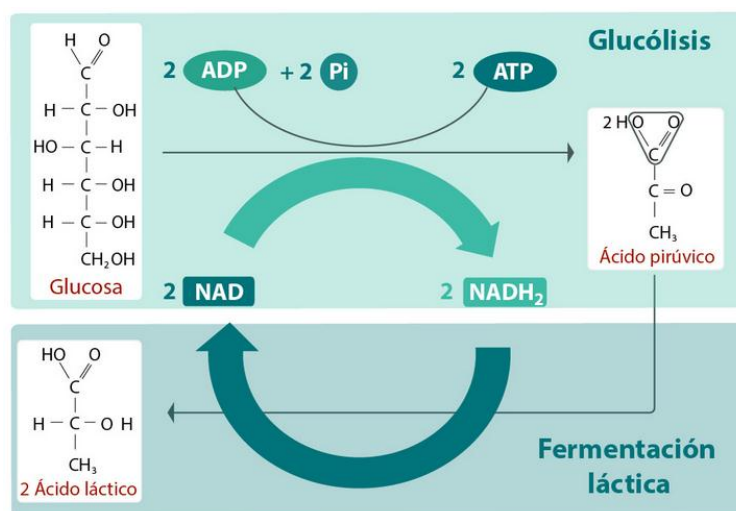


Figura 2. Transformación de la glucosa en ácido láctico.

Fuente: (UNAM, 2014)

1.2.2 Bacterias Ácido Lácticas

Son un importante grupo de microorganismos “Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación” (Ramírez, Ulloa, González, Ulloa, & Romero, 2011).

Este tipo de bacterias ayudan a conservar varios alimentos gracias a la fermentación aumentando así su valor nutricional, además mejoran el sabor, olor, textura del producto. Se dice

María José Loja Vanegas



que gran parte de los probióticos pertenecen a estas bacterias (Ramírez, Ulloa, González, Ulloa, & Romero, 2011).

1.2.3 Clasificación de BAL

1.2.3.1 Según la fermentación de la lactosa

- Homofermentativas: a este grupo pertenecen el *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, los mismos que descomponen la glucosa para transformarla a más del 85% de ácido láctico, además están presentes *Lactobacillus* (Parra, 2010).
- Heterofermentativas: además de generar el 50% de ácido láctico, produce también CO_2 y etanol o ácido acético, aquí se encuentran el *Lactococcus*, *Lactobacillos*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Parra, 2010).

1.2.3.2 Por su metabolismo de carbohidratos

- Homolácticas: “*Lactobacillus acidophilus*, *helveticus*, *delbrueckii* subsp *delbrueckii*, *debrueckii* subsp *lactis*, *delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *lactis*, *thermophilus*” (Parra, 2010).
- Heterolácticas: se encuentran los *Lactobacillus* como: “*plantarum*, *ramnosus*, *coryneformis*, *curvatus*, *casei*, *paracasei*, *brevis*, *buchneri*, *fermentun*, *kéfir*, *reuteri*, *leuconostoc*” (Parra, 2010).

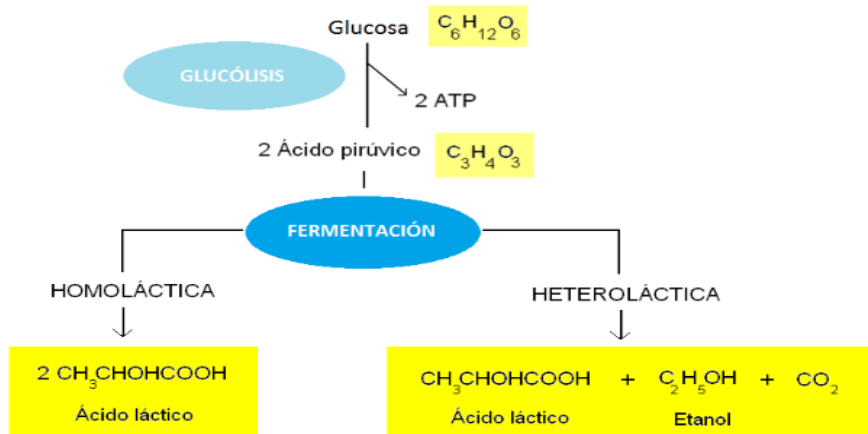


Figura 3. Esquema de la fermentación homoláctica y heteroláctica
Fuente: (Maljovich, 2001)

1.2.3.3 Probióticos

Son microorganismos vivos que se adicionan a distintos productos, para mejorar la salud intestinal y para fortalecer el sistema inmunitario, entre ellos se encuentra el lactobacillus que se origina debido a la fermentación láctica (Guarner, y otros, 2011).

1.2.4 Condiciones de operación para la fermentación láctica

1.2.4.1 Temperatura

De la temperatura con la que se trabaje, va a depender el desarrollo de BAL y el tiempo que durará la fermentación. Se recomienda trabajar a temperaturas entre 20 y 25 °C (Garrido, Alarcón, Toledano, Ordoñez, & Pérez, 2016)

1.2.4.2 Concentración de NaCl

En el chucrut se le adiciona el cloruro de sodio directamente a las hojas frescas de col y se presiona o prensa, esto hace que elimine una cantidad de agua presente en ellas y prepara el medio para el crecimiento de BAL, es necesario agregarle del 2 al 3% de sal, gracias a esto inhibe microorganismos indeseables (Garrido, Alarcón, Toledano, Ordoñez, & Pérez, 2016)



1.2.4.3 Anaerobiosis

Para que la fermentación láctica sea eficaz, se debe desarrollar en ausencia de oxígeno, procurando aplicar algún método que deje salir el CO₂ que se origina durante el proceso (Garrido, Alarcón, Toledano, Ordoñez, & Pérez, 2016).

1.2.4.4 pH

Debido a que el chucrut es un producto ácido se debe cuidar el valor de pH alcanzado, para que se puedan desarrollar adecuadamente las BAL en la fermentación láctica (Bailón, 2012).

Algunas clases de BAL pueden desarrollarse en pH como 3.2 y otras en rangos de hasta 9.6, pero gran parte de dichas bacterias crecen naturalmente en valores de pH de 4 y 4.5 en dónde es difícil que bacterias de otra clase sobrevivan (Ramírez, Ulloa, González, Ulloa, & Romero, 2011).

El chucrut finaliza cuando alcanza rangos de pH entre 3.1 y 3.7 (Pundir & Jain, 2010)

1.2.4.5 Tiempo

Para que se de la fermentación láctica del chucrut es necesario un tiempo aproximado de 14 a 21 días (Garrido, Alarcón, Toledano, Ordoñez, & Pérez, 2016).



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

Esta investigación es de carácter experimental, ya que se considera evaluar una materia prima que no ha sido estudiada completamente en la región, para determinar las condiciones óptimas de trabajo y una cinética química. Se optimizó los parámetros de temperatura, tiempo y concentración de NaCl, con la finalidad de mejorar la fermentación láctica, obteniendo un alimento probiótico de la mejor calidad con un sabor, olor y textura más agradable. Para ello se emplean diferentes mecanismos cómo: diseño experimental para obtener los valores adecuados de los parámetros para la parte experimental, se aplica el método integral y diferencial para encontrar la cinética química, para la determinación de azúcares presentes en la muestra se utiliza la técnica de HPLC, el método Mossel se emplea para la cuantificación de BAL, adicionalmente se midió el pH como variable de respuesta, y se determinó la acidez titulable.

2.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

La fase experimental de esta investigación se realizó en los siguientes laboratorios: Laboratorio de Alimentos, Laboratorio de Ingeniería de Reactores y Catálisis pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca y en el laboratorio MSV de análisis de alimentos.

La elaboración del chucrut y la optimización de los parámetros de operación se ejecutó en el Laboratorio Tecnológico (Universidad de Cuenca), las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo en el Laboratorio “MSV” que se encuentra acreditado (externo a la Universidad de Cuenca) y la determinación de azúcares se llevó a cabo en el equipo HPLC que se encuentra en el laboratorio de Ingeniería de Reactores y Catálisis.



2.2 MATERIA PRIMA

2.2.1 Repollo (Brassica oleracea l. var. capitata l.)

El repollo que se empleó como base de este estudio proviene de la parroquia de San Joaquín perteneciente al cantón Cuenca de la provincia del Azuay, la misma se encuentra ubicada a 7 Km de éste cantón.

Se seleccionó este lugar debido a que aquí se cultiva este tipo de hortalizas durante todo el año, y nos servirá para obtener una materia prima fresca y en óptimas condiciones para su procesamiento.

2.2.2 NaCl

Para la elaboración del chucrut se empleó sal marina de grano fino, en distintas concentraciones la misma que se le agregó al repollo picado.

2.3 ELABORACIÓN DE CHUCRUT

2.3.1 Recepción de la materia prima

En la recepción se verifica que la col presente un buen color, textura y que tenga un correcto estado de madurez.

2.3.2 Partido y descorazonado

Con la ayuda de un cuchillo se procede a partir la col para retirar el tronco leñoso que presenta este vegetal.

2.3.3 Lavado y desinfectado

Se lava una a una las hojas del repollo, posteriormente se desinfecta colocándolas por unos pocos segundos en un recipiente que contiene una solución de 20 litros de agua y 10 ml de cloro comercial, pasado este tiempo se realiza otro lavado con agua potable.



2.3.4 Picado

Una vez limpias las hojas se cortan en delgadas tiras de aproximadamente 0.5 cm de ancho.

2.3.5 Salado

Cuando se tenga las coles finamente picadas, se adiciona el 3% p/p de cloruro de sodio.

2.3.6 Prensado

Se procede a prensar la col con el fin de que libere cierta cantidad de agua, y comience la fermentación.

2.3.7 Llenado y etiquetado

Una vez amasada la col, se coloca en frascos preferiblemente de vidrio previamente esterilizados, sin dejar espacio de cabeza, y acondicionado de tal forma que pueda liberar el CO₂ generado durante la fermentación, luego se etiqueta el producto.

2.3.8 Almacenado

Este alimento se almacena a 25°C, durante 14 días, que es el tiempo necesario para que se complete el proceso de fermentación, de acuerdo a la fase experimental determinada en este escrito.

2.4 MÉTODO PARA OPTIMIZAR LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN EN LA FERMENTACIÓN LÁCTICA

2.4.1 Diseño Factorial 2^k

Se aplica el diseño factorial 2^k (*ver Anexo 6*) para conseguir las condiciones óptimas de operación en la fermentación láctica, con tres variables (temperatura, tiempo y concentración de NaCl p/p) y dos niveles (máximo y mínimo), cómo se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** *Diseño experimental 2^k*

Factor	Variable	Niveles	
		Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Temperatura (°C)	X ₁	18	25
Tiempo (días)	X ₂	14	21
NaCl (%)	X ₃	2	3

Fuente: Autor

Debido a ensayos realizados previamente y a la revisión de literatura se ajustaron los dominios experimentales mostrados en la tabla 4, para poder determinar los niveles más convenientes para el proceso, restableciendo los límites.

A partir de dichas condiciones para el diseño experimental, se realizaron ocho experimentos, cómo se muestra en la siguiente matriz.

Tabla 5. *Matriz de diseño factorial completo 2^k de tres variables con dos niveles*

Experimento	X₁	X₂	X₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
I	0	0	0

Fuente: (Ferré, 2004)

Se deben hacer los experimentos en orden aleatorio, para impedir que el efecto de un factor se confunda con el de otro, y evitar que en los valores de los efectos se introduzcan sesgos (Ferré, 2004).



2.4.2 Determinación del pH

Para determinar el pH se recoge una muestra de 50 ml de líquido de gobierno del chucrut en un vaso de precipitación y se mide con el pH-metro. La medición del pH para cada muestra se la realiza por duplicado.

2.4.3 Determinación de la acidez titulable

Para medir la acidez titulable se toma una muestra 20 ml de líquido de gobierno del chucrut en un vaso de precipitación, se le agrega tres gotas de fenolftaleína y con una bureta cargada con NaOH 0.25 N se titula la muestra, una vez obtenido el valor de NaOH consumido se procede a realizar los respectivos cálculos, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Acidez (ácido láctico)} = ((V_1 \times N \times \text{Meq})/V_2) * 100 \quad [\text{Ec.1}]$$

En donde:

V_1 = Volumen de solución de NaOH 0.25 N gastado en la titulación de la muestra, en ml.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

V_2 = Volumen de la muestra, en ml.

Meq = 0.009 ácido láctico.

Las pruebas se realizan por duplicado.

2.4.4 Parámetros óptimos de operación

La temperatura, tiempo y concentración de NaCl, son los parámetros óptimos determinados en estos ensayos que resultaron una fermentación láctica con un valor adecuado de pH para el buen desarrollo de BAL.

2.5. CINÉTICA QUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA

2.5.1 Determinación del consumo de la glucosa y de la fructosa

En el desarrollo de la fermentación láctica se evaluó el consumo de glucosa y fructosa en condiciones óptimas de fermentación (tiempo, temperatura, y concentración de NaCl) en un intervalo de doce horas, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca JASCO, modelo CO-4061, con “loop” de inyección de 10ul, las muestras que se recogieron fueron de 5 ml de líquido de gobierno de chucrut cada una, y se las colocó en recipientes estériles, conservándose a una temperatura de 25 °C, inmediatamente se traslada hasta el laboratorio de Ingeniería de Reactores y Catálisis para su respectivo análisis.

Previo a los análisis de las muestras se realizó una curva de calibración, la misma que fue proporcionada por el laboratorio.

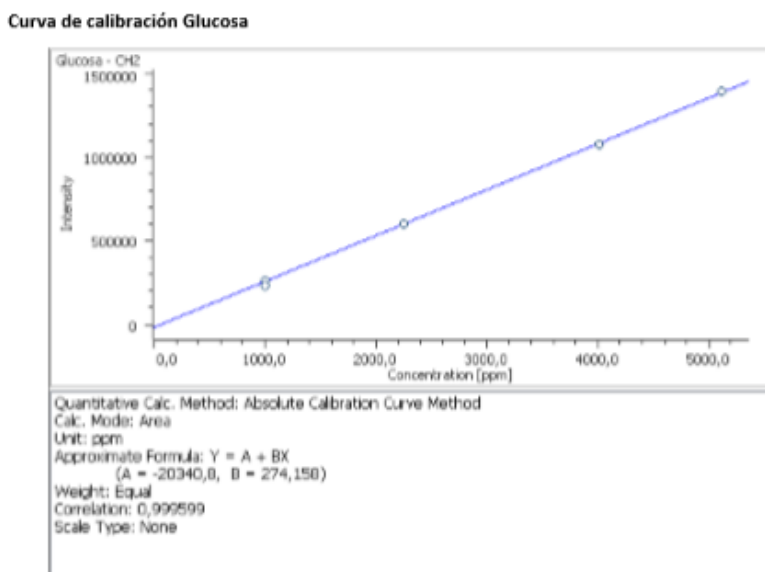
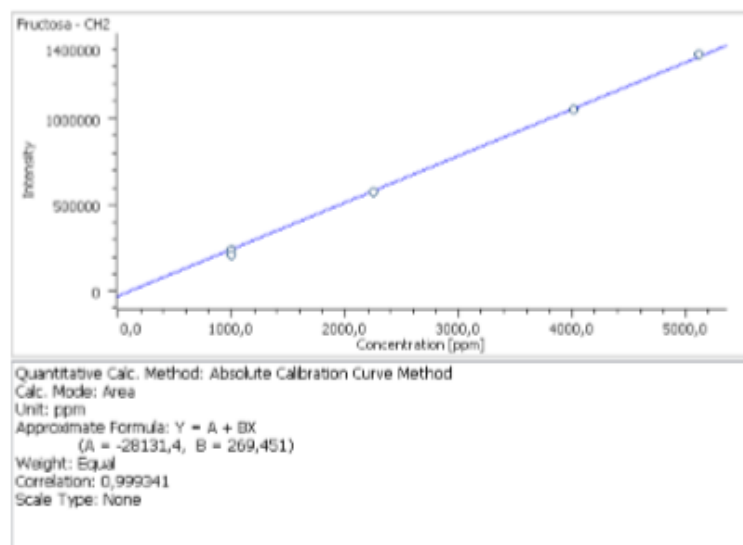


Figura 4. Curva de calibración de la glucosa.

Fuente: Laboratorio de Ingeniería de Reactores y Catálisis (Universidad de Cuenca).

Curva de calibración fructosa

**Figura 5.** Curva de calibración de la fructosa.

Fuente: Laboratorio de Ingeniería de Reactores y Catálisis (Universidad de Cuenca).

2.5.2. Determinación de los parámetros cinéticos

En condiciones óptimas de operación tales como: temperatura, pH y concentración de NaCl, se determinó los parámetros cinéticos que rigen la fermentación láctica, mediante el método integral (*ver Anexo 2*) y el diferencial (*ver Anexo 3*).

2.5.2.1. Método integral

Mediante el uso de las de las fórmulas expuestas en el *Anexo 2*, se realizó los respectivos cálculos, partiendo de los valores obtenidos de consumo de glucosa, para posteriormente graficarse y dependiendo de su correlación determinar el orden de reacción y la cinética de fermentación que tienen, se repite lo mismo para el caso de la fructosa.

2.5.2.2. Método diferencial

Se procede a graficar la curva de concentración de glucosa consumida con respecto al tiempo de fermentación, en diferentes puntos de la misma se trazaron seis pendientes que van a ser las



velocidades de reacción. Con los nuevos datos obtenidos se procede a realizar otra gráfica del logaritmo natural de la concentración Vs el logaritmo natural de la velocidad de reacción y conseguir la ecuación de la recta, cuya pendiente nos dará el orden de reacción, mediante el corte con el eje de las ordenadas se obtendrá el valor de la constante y por último la cinética de fermentación, se realiza lo mismo para el caso de la fructosa.

2.6. CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS E IDENTIFICACIÓN DE LAS FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Para el análisis de bacterias ácido lácticas se recogieron 50 ml de líquido de gobierno de chucrut y se colocó en un frasco estéril para transportarlo de inmediato al laboratorio de alimentos “MSV”, el cuál utilizó el método MOSSEL para la cuantificación de las bacterias ácido lácticas.

Una vez con los resultados obtenidos, se traza una gráfica para determinar las fases de crecimiento de BAL (*ver Anexo 4*).



CAPÍTULO 3: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LA FERMENTACIÓN LÁCTICA

En la fermentación láctica del chucrut se ha determinado las siguientes condiciones óptimas de operación: temperatura (X_1), tiempo (X_2) y % NaCl (X_3). Estas variables fueron seleccionadas debido a que son las más importantes en la fermentación láctica y en el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Se tomó en cuenta el parámetro pH como variable de respuesta debido a que de éste depende la formación y el desarrollo de BAL, y por ende la fermentación.

Tabla 6. Matriz modelo del diseño factorial 2^3 para las variables temperatura, tiempo y %NaCl

Experimento	b0	Temperatura	Tiempo	Conc. NaCl	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$	pH
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	3,55
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	3,42
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	3,25
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3,42
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	3,29
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	3,67
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	3,2
8	1	1	1	1	1	1	1	1	3,67

Fuente: Autor

Tabla 7. Valores de los coeficientes de los efectos de las variables

Coeficientes de las Variables del Diseño Experimental								
Coefficiente	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_{123}
Valor	3,43375	0,11125	-0,04875	0,02375	0,04875	0,10125	0,02625	-0,02625

Fuente: Autor

Aplicando la siguiente ecuación polinomial:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad [\text{Ec. 2}]$$

Se tiene:

$$y = 3,43375 + 0,11125X_1 - 0,04875X_2 + 0,02375X_3 + 0,04875X_1X_2 + 0,10125X_1X_3 + 0,02625X_2X_3 - 0,02625X_1X_2X_3$$



Efectos principales: Los efectos b_1 , b_2 y b_3 miden cómo afecta cada factor a la respuesta. La variable que provoca mayor cambio en la respuesta es variar la temperatura de 18 °C a 25 °C, al aumentar la concentración de NaCl del 2 al 3% también mejora el valor de pH buscado, aunque su efecto va a ser menor que el de la temperatura, finalmente el tiempo de fermentación tiene un comportamiento antagónico ($b_2 = -0,04875$), es importante indicar que el valor de pH se mantiene constante entre los días 14 y 21, en todos los experimentos.

Efectos secundarios: las interacciones de las variables X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 presentan un comportamiento sinérgico, siendo el valor de b_{13} (0,10125) el de mayor efecto, es decir al aumentar la temperatura y la concentración de cloruro de sodio afectan de forma positiva la respuesta.

Efectos terciarios: En éste caso se puede apreciar el grado de dependencia de las tres variables juntas $b_{123} = -0,02625$, presenta un comportamiento antagónico. Debido a que se trata de una interacción de orden superior su comportamiento es complejo explicar, sin embargo, se puede indicar que, al aumentar la temperatura y la concentración de cloruro de sodio, el valor de la respuesta es favorable no así con el tiempo de fermentación que no influye sobre la misma.

3.1.1 Parámetros Óptimos de Operación

Al analizar los efectos principales y secundarios, determinamos el pH óptimo para mejorar la fermentación láctica, las mejores variables fueron: temperatura 25°C, concentración de 3% de NaCl y un tiempo de fermentación de 14 días.

Luego las mejores condiciones experimentales corresponden al experimento número seis de la tabla 6.



Una vez reproducido el nuevo experimento con los parámetros antes mencionados, se procede a cuantificar la cantidad de glucosa y fructosa consumida y el número de microorganismos (BAL).

3.2 CINÉTICA QUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA

Para obtener la cinética química de la fermentación láctica se realiza a partir del consumo de glucosa y fructosa del medio, se aplica el método integral y diferencial para la determinación de los parámetros cinéticos.

3.2.1 Cuantificación de la glucosa y fructosa consumida

Para la determinación de glucosa y fructosa que se consumieron durante la fermentación se realizó por HPLC, se entregaron once muestras, y se obtuvieron los siguientes resultados que se pueden apreciar en la figura 9 y 10 respectivamente.

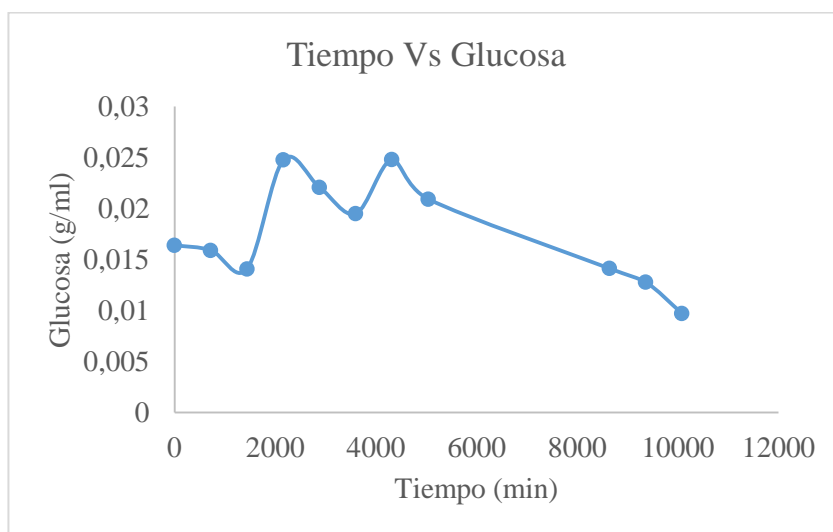


Figura 6. Consumo de glucosa durante la fermentación
Fuente: Autor

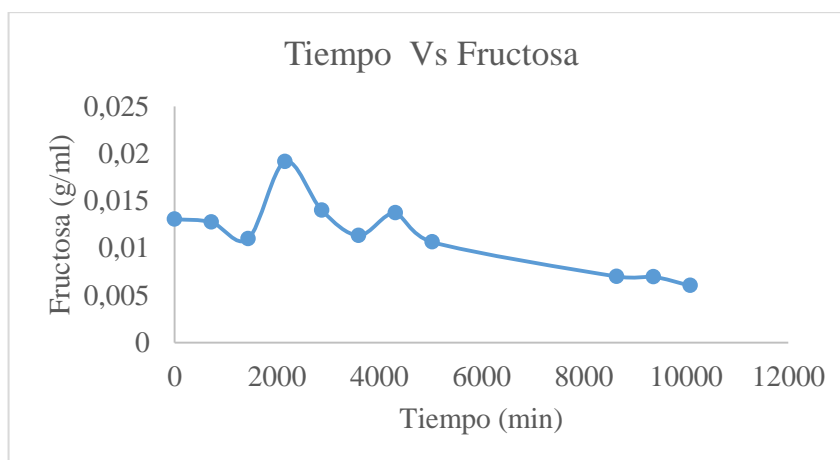


Figura 7. Consumo de fructosa durante la fermentación
Fuente: Autor

De acuerdo a las gráficas se puede observar que existen 3 fases identificadas, donde se puede evidenciar lo siguiente:

Concentración de glucosa: se observa el descenso de glucosa en las tres primeras muestras, la muestra número cuatro incrementa el valor de glucosa y desciende en las dos siguientes. A partir de la muestra siete empieza el descenso de esta azúcar.

Concentración de fructosa: para ésta azúcar ocurre lo mismo que en el caso de la glucosa, se aprecia el descenso de la fructosa en las tres primeras muestras, la muestra número cuatro incrementa el valor de fructosa y desciende en las dos siguientes. En la muestra siete comienza el descenso de esta azúcar.

Este fenómeno puede deberse a que uno de los constituyentes de la col es la fibra (2.3 %), fibra rica en celulosa, lo que puede generar la hidrólisis de la celulosa convirtiéndose en glucosa, que de manera general formaría la transformación de polímeros en monómeros y luego en productos de descomposición según la relación:

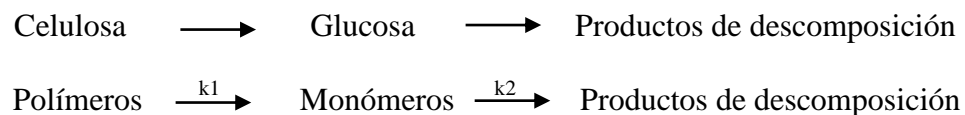


Figura 8. Modelo por Saeman

Fuente: (Alvarez, Maciel Filho, Plaza Tovar, & Wolf Maciel, 2015)

Mientras se está generando glucosa a través de celulosa, también se está consumiendo la glucosa como fuente de carbohidratos, a partir de la muestra siete los valores de glucosa y fructosa disminuyen, para los cálculos posteriores se analizaron los últimos cinco datos.

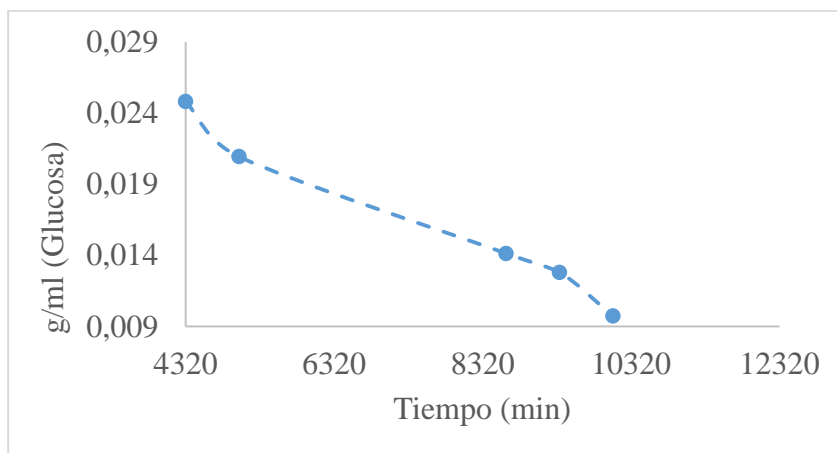


Figura 9. Consumo de glucosa (cinco últimos datos)

Fuente: Autor

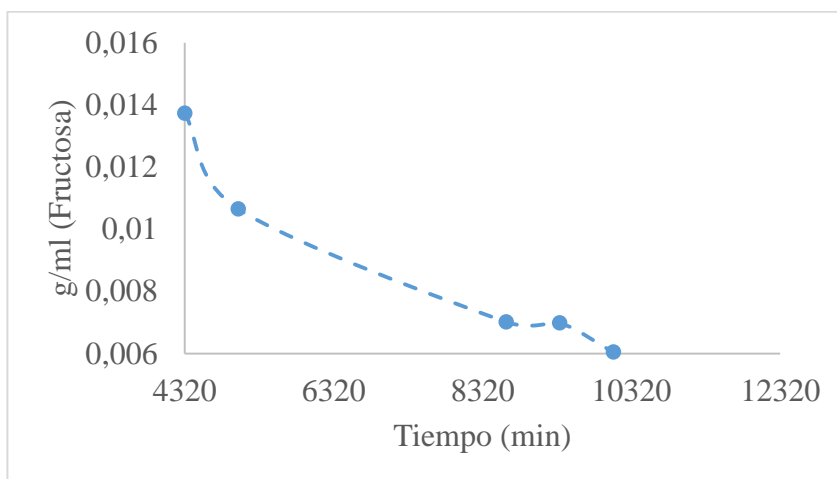


Figura 10. Consumo de fructosa (cinco últimos datos)
Fuente: Autor

3.2.2 Parámetros Cinéticos

3.2.2.1 Método Integral

De los datos de la concentración de la glucosa consumida durante la fermentación, se procedió a determinar el orden de la reacción, se aplicaron los respectivos cálculos matemáticos y se trazó la gráfica respectiva para cada orden, del mayor valor de correlación dependerá el orden de reacción, se realizó lo mismo para la fructosa.

En la figura 11 y 12 se muestra el modelo cinético para orden cero a partir de la concentración de la glucosa y fructosa consumida, respectivamente.

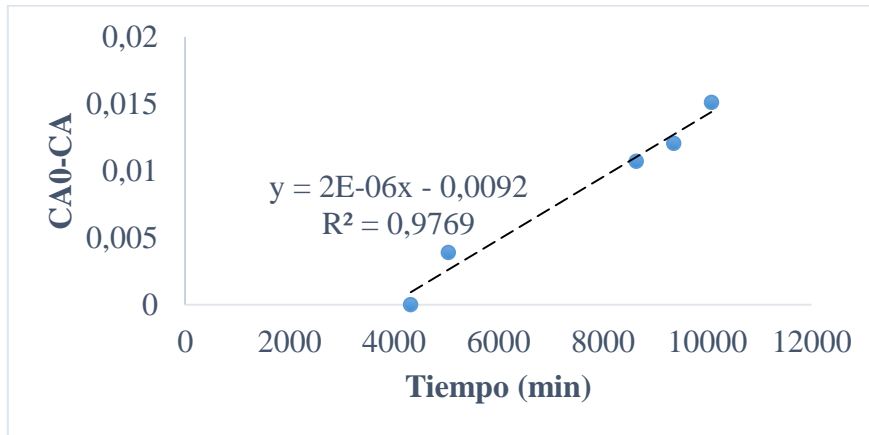


Figura 11. Modelo cinético para orden cero. (Glucosa)
Fuente: Autor

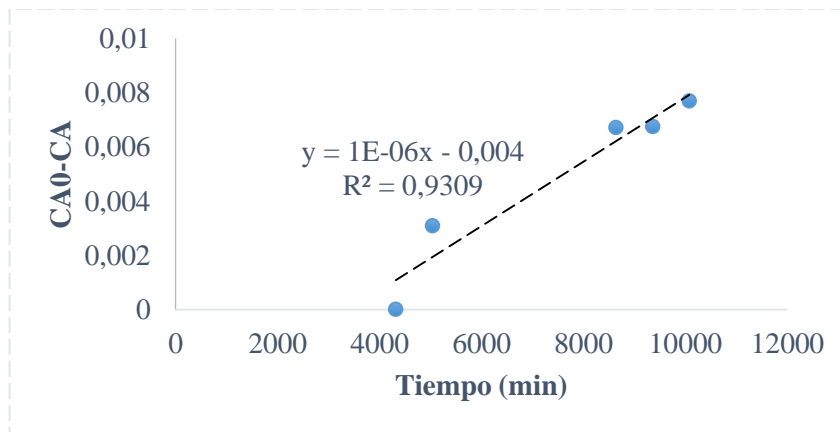


Figura 12. Modelo cinético para orden cero. (Fructosa)
Fuente: Autor

En la figura 13 y 14 se muestra el modelo cinético para primer orden, a partir de la concentración de la glucosa y fructosa respectivamente.

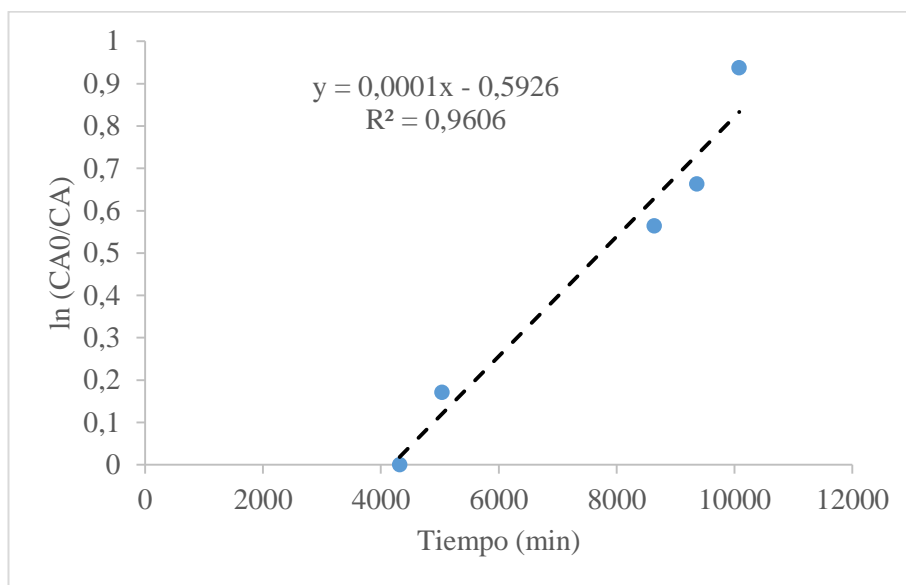


Figura 13. Modelo cinético para primer orden. (Glucosa)
Fuente: Autor

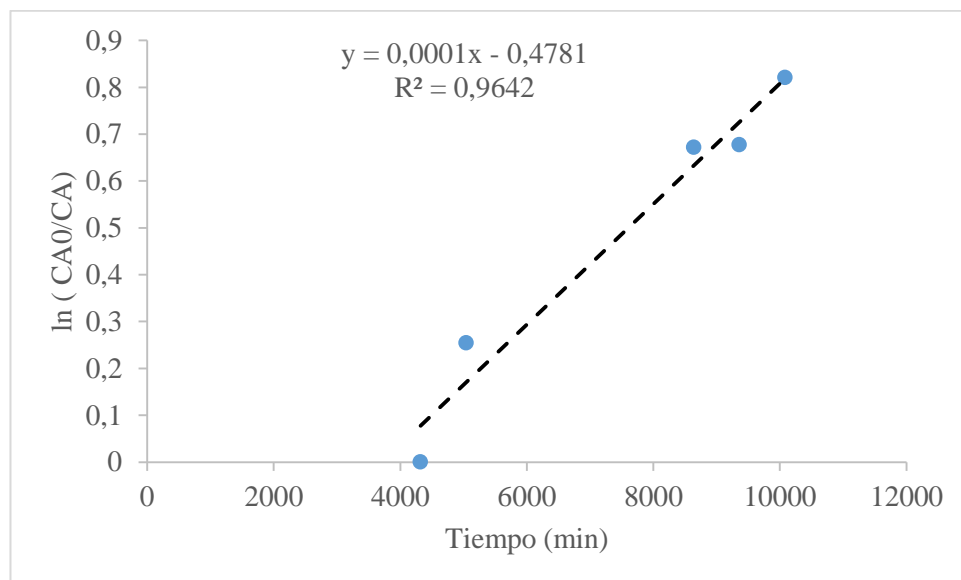


Figura 14. Modelo cinético para primer orden. (Fructosa)
Fuente: Autor

En la figura 15 y 16 se muestra el modelo cinético para segundo orden, a partir de la concentración de la glucosa y fructosa respectivamente.

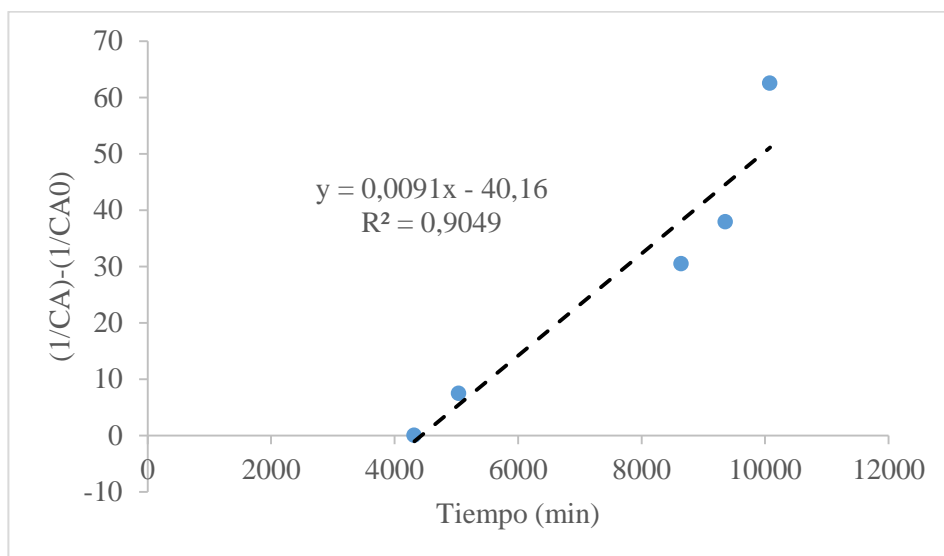


Figura 15. Modelo cinético para segundo orden. (Glucosa)
Fuente: Autor

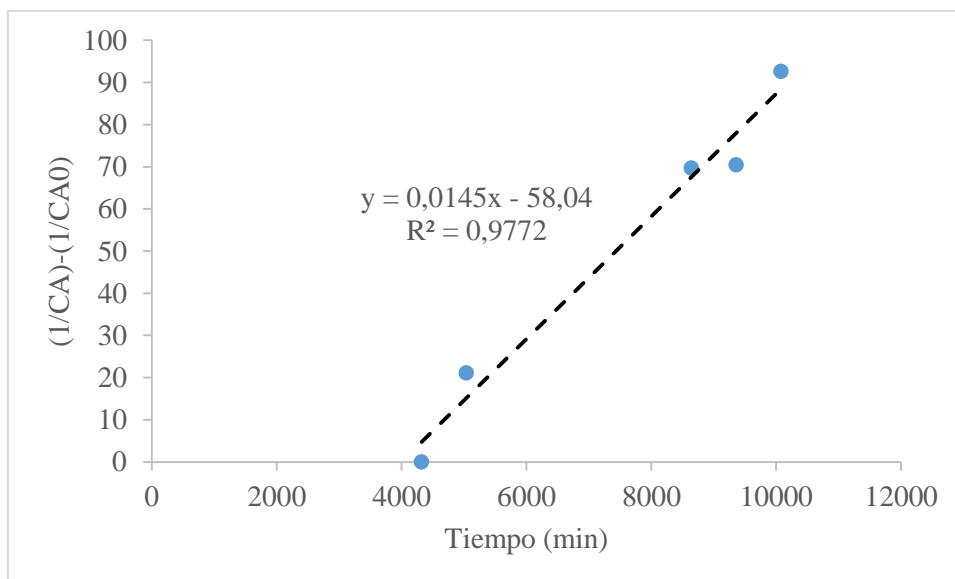


Figura 16. Modelo cinético para segundo orden. (Fructosa)
Fuente: Autor

Según la mejor linealidad que se obtuvo cómo se puede apreciar en la figura 11 para la glucosa, se puede decir que la reacción es de orden cero con una constante cinética de $k=2 \times 10^{-6}$

g/ml*min en cambio para la fructosa, la mejor linealidad se la observó en la figura 16, teniendo así una reacción de segundo orden con una constante cinética de 0.0145 ml/g*min.

3.2.2.2 Método Diferencial

En los gráficos del consumo de glucosa y fructosa de las figuras 9 y 10 se trazaron las tangentes en diferentes intervalos de tiempo, mediante las cuales se pudo obtener las distintas pendientes las mismas que darán la velocidad de consumo.

En las figuras 17 y 18 se observa las tangentes trazadas en distintos intervalos de tiempo en las curvas de glucosa y fructosa respectivamente.

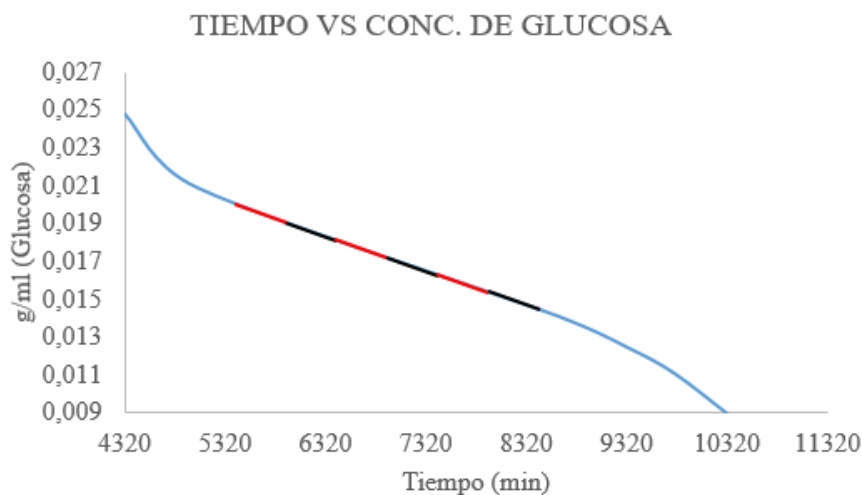


Figura 17. Tangentes trazadas en la curva de concentración de la glucosa
Fuente: Autor

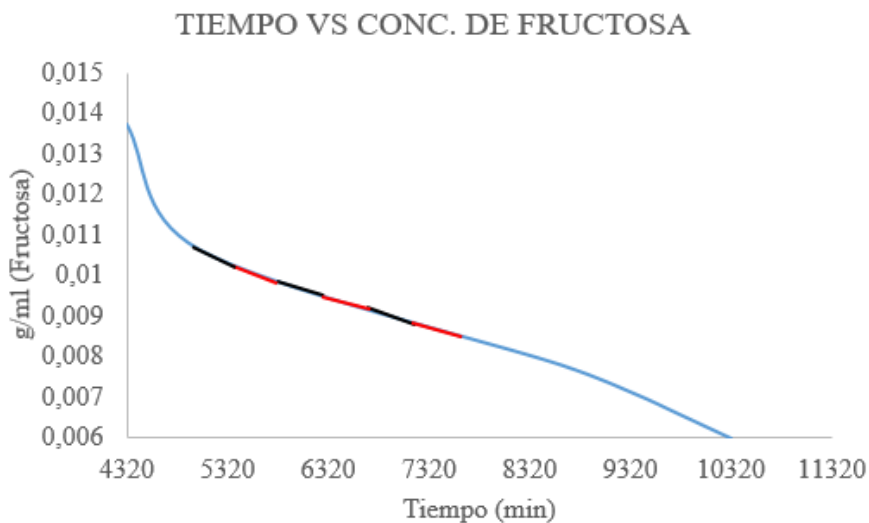


Figura 18. Tangentes trazadas en la curva de concentración de la fructosa
Fuente: Autor

En la figura 19 se puede apreciar el gráfico del logaritmo natural de la concentración de la glucosa Vs el logaritmo natural de la velocidad de consumo de la glucosa

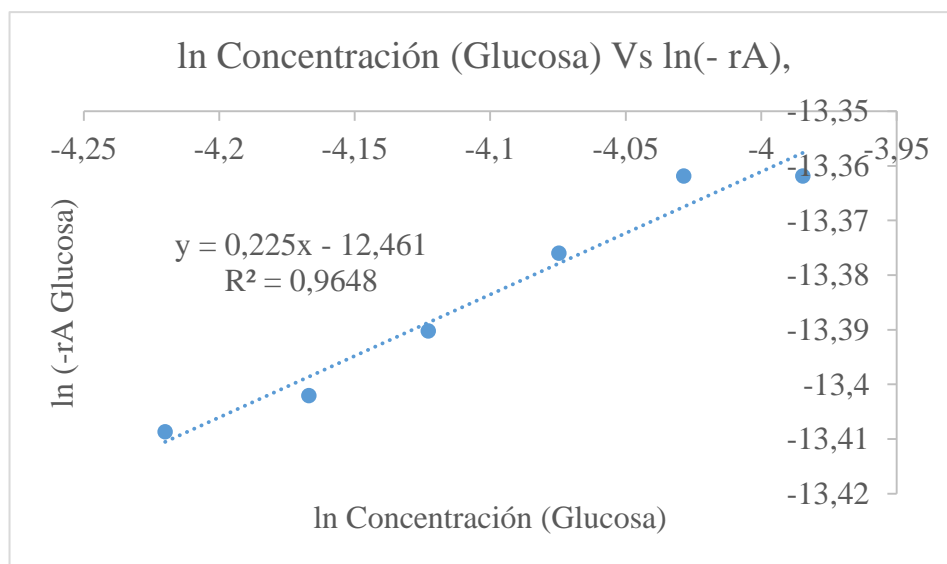


Figura 19. Gráfico de ln(r_A Glucosa) Vs ln C_{Glucosa}
Fuente: Autor



En la figura 20 se puede apreciar el gráfico del logaritmo natural de la concentración de la fructosa Vs el logaritmo natural de la velocidad de consumo de la fructosa,

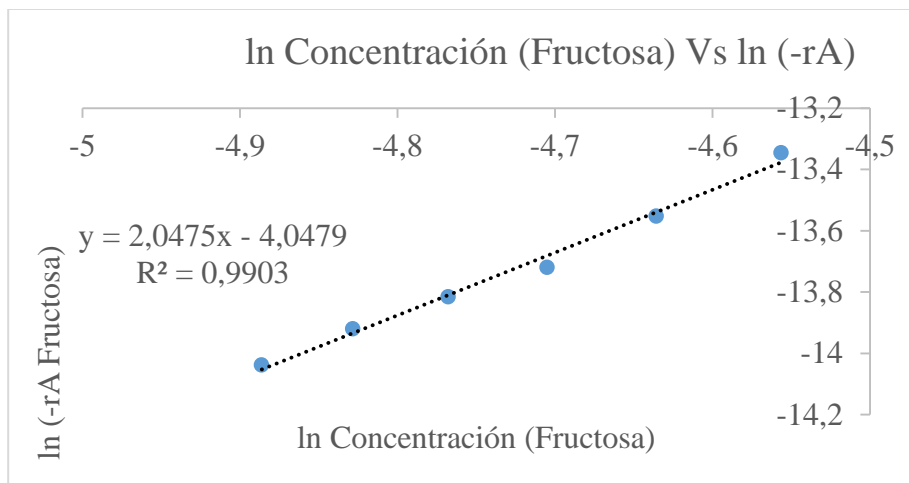


Figura 20. Gráfico de $\ln(r_A \text{ Fructosa})$ Vs $\ln C_{\text{Fructosa}}$
Fuente: Autor

De los resultados que se obtuvieron en éste método se puede indicar que el orden de reacción para la glucosa es de 0.225, con una constante cinética de $3.9 \times 10^{-6} \text{ g}^{0.775}/\text{ml}^{0.775} \cdot \text{min}$, en cambio la fructosa presentó un segundo orden con una constante cinética de $0.01745 \text{ ml}^{1.05}/\text{g}^{1.05} \cdot \text{min}$.

3.3 ECUACIÓN CINÉTICA

En la siguiente tabla 8 se muestran las ecuaciones cinéticas obtenidas a partir de la glucosa y fructosa.

Tabla 8. Ecuación cinética de la fermentación láctica del repollo

	Método Integral	Método Diferencial
Glucosa	$r_{C_6H_{12}O_6} = 2 \times 10^{-6} \text{ g/ml} \cdot \text{min}$	$r_{C_6H_{12}O_6} = 3.9 \times 10^{-6} \text{ g}^{0.775}/\text{ml}^{0.775} \cdot \text{min}$ $C_{C_6H_{12}O_6}^{0.225}$
Fructosa	$r_{C_6H_{12}O_6} = 0.0145 \text{ ml/g} \cdot \text{min}$	$r_{C_6H_{12}O_6} = 0.01745 \text{ ml}^{1.05}/\text{g}^{1.05} \cdot \text{min}$ $C_{C_6H_{12}O_6}^{2.05}$

Fuente: Autor

3.3.1 Fase de crecimiento microbiano

A partir de los datos que se obtuvieron por el método Mossel para la determinación de BAL en UFC/ ml, se traza la respectiva gráfica cómo se aprecia en la figura 21, en donde se observan las diferentes fases del crecimiento de bacterias ácido lácticas hasta llegar a la muerte de las mismas.

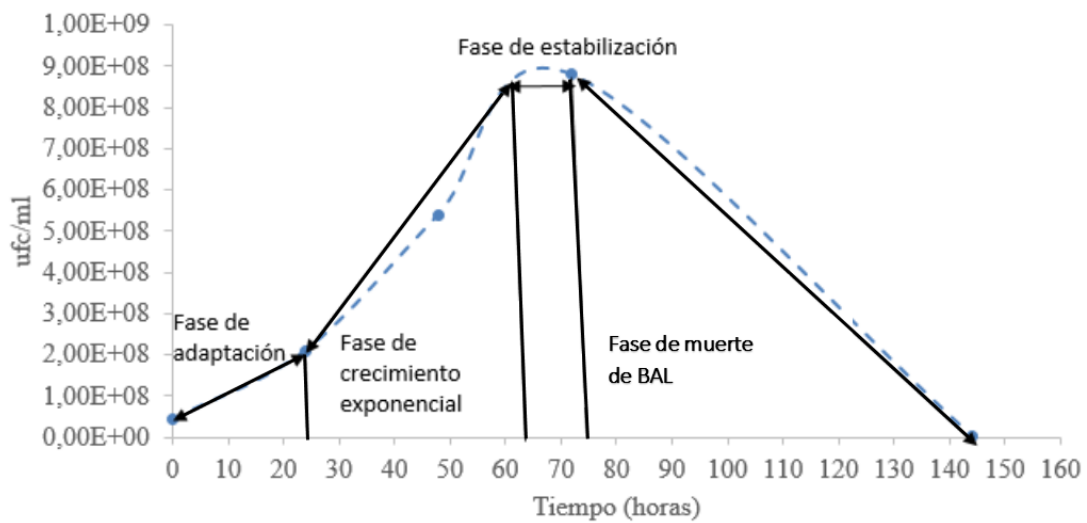


Figura 21. Fases de crecimiento de BAL

Fuente: Autor



CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

El repollo (*Brassica oleracea l. var. capitata l.*) al ser transformado en un producto fermentado, es ideal para incluirlo dentro de nuestra alimentación ya que además de nutrir tiene componentes que producen un impacto positivo en la salud como son los probióticos, que son principalmente bacterias ácido lácticas, éstos microorganismos permanecen vivos tanto en el producto como en el intestino de la persona que lo consume durante un determinado tiempo, con el fin de lograr beneficios evidenciados en múltiples investigaciones.

En este trabajo, al aplicar el diseño factorial 2^3 , facilitó encontrar las condiciones óptimas de temperatura, tiempo y concentración de NaCl para la fermentación láctica en el chucrut, se evidenció que al aumentar la temperatura y la concentración de NaCl se obtenía un pH de 3,67, se escogió dicho valor porque se encuentra dentro del rango adecuado de pH para que se desarrollen las BAL: *Lactobacillus* siendo necesario para que se de la fermentación láctica, en cuánto al tiempo se puede evidenciar que no es tan relevante en éste caso, porque la fermentación se la realizó en un período de 14 días y no de 21 como dice la bibliografía, se determinó que la temperatura óptima de trabajo fue de 25°C y con una concentración del 3% de NaCl.

La cinética de fermentación que se obtiene es de mucha relevancia, ya que gracias a ésta podemos establecer relaciones de ecuaciones para modelar dicho proceso, obteniendo así los parámetros necesarios para dar un seguimiento a la fermentación mediante el consumo de glucosa y fructosa, en este trabajo se obtuvo un orden cero para la glucosa en el método integral y un pseudo-orden de 0.225 en el diferencial, en cambio para la fructosa se obtuvo un segundo orden en los dos métodos.



En cuánto al consumo de azúcares se lo realizó por el método de HPLC que es muy confiable, aquí se puede apreciar que existe un aumento y disminución tanto de la glucosa como de la fructosa, presentando una forma cíclica hasta que llega a un punto en el cual se estabiliza y comienza a descender normalmente, esto se debe a que la fermentación se realiza a partir de biomasa, y cuando las bacterias comienzan a consumir azúcares la materia prima al necesitar energía reacciona transformando la celulosa que tiene de reserva en azúcares, debido a esto la concentración de glucosa y fructosa en ciertos períodos de tiempo presentaba rangos altos y bajos, llegando un instante en el que ya no puede producir más azúcares la materia prima, y es ahí dónde el consumo tanto de glucosa cómo de fructosa empieza a descender de una forma correcta.

En los datos obtenidos se puede apreciar que el mayor crecimiento de BAL ocurre entre las 63 y 74 horas de haber transcurrido la fermentación obteniendo un nivel alto de estos microorganismos, luego de transcurrido éste período comienza a disminuir su crecimiento debido a que ya se ha consumido la mayor cantidad de azúcares presentes en el medio en el que se encuentran éstas .

4.2 RECOMENDACIONES

Para una mejor visión del tipo de BAL presentes en la fermentación se recomienda realizar una caracterización de las mismas, en las diferentes fases de crecimiento de dichas bacterias.

Se puede realizar un estudio del crecimiento microbiano que presenta en la fermentación, tomando más datos en períodos cortos de tiempo.



Se recomienda utilizar el método diferencial cuando se cuenten con suficientes puntos, ya que en esta investigación se descartaron algunos por un comportamiento diferente a la curva normal.

Además se puede realizar un nuevo diseño experimental con otras variables, como por ejemplo con la acidez titulable durante la fermentación, modelar la cinética química a través de la generación de producto, o reducir el rango del dominio experimental utilizado en ésta investigación.



Bibliografía

- A., B. C., & C., O. I. (2003). file:///E:/investigación/169817981002.pdf. Obtenido de file:///
- A., S., C., B., C., M., & I., O. (2003). file:///E:/investigaci%C3%B3n/169817981002.pdf. Obtenido de file//
- Alvarez, P. A., Maciel Filho, R., Plaza Tovar, L., & Wolf Maciel, M. R. (2015). https://www.researchgate.net/publication/284895460_Kinetics_of_the_acid_hydrolysis_of_sugarcane_bagasse_using_different_milling_size_high_solid_load_and_low_pretreatment_temperature.
- Bailón, R. C. (2012). https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/IF_MAYO_2012/IF_BAILON%20NEYRA_FIPA.pdf.
- Bolaños, A. (1998). https://books.google.com.ec/books?id=vBS_GwIrE1MC&pg=PA254&dq=clasificaci%C3%B3n+del+repollo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjIuP2CqdXgAhUquVkkHYXDrEQ6AEIMjAC#v=onepage&q=clasificaci%C3%B3n%20del%20repollo&f=false.
- Calderón, J. F. (2017). <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6598/1/6121940-2017-2-IQ.pdf>. Obtenido de <http://>
- Cayré, M. E., Castro, M. P., & Garro, O. A. (2002). <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/08-Exactas/E-067.pdf>. Obtenido de <http://>
- Cevallos, W. P. (2012). <http://dspace.espoche.edu.ec/bitstream/123456789/1836/1/13T0737%20%20.pdf>.
- Cruz, R. D. (2007). <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5213/T-1146.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Dafne, Lizeth, & Yosimar. (s.f.). http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/cfmc/Quimica_Organica_III/Fermentacion_alcoholica.pdf.
- Del Campo López, E. M. (Septiembre de 2015). <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/33941/secme-18740.pdf?sequence=1>.
- FAO. (s.f.). <http://www.fao.org/3/a-au174s.pdf>.
- Ferré, J. (2004). <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/doecast.pdf>. Obtenido de <http://>
- Fornaris, G. J. (2014). <http://136.145.11.14/eea/wp-content/uploads/sites/17/2016/04/2.-REPOLLO-CARACTERISTICAS-DE-LA-PLANTA-v.-2014.pdf>.
- Fuentes, F., & Pérez, J. (2003). <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/hortalizas/Guia%20Repollo%202003.pdf>. Obtenido de <http://>
- Gambo, M. F. (2010). <http://dspace.espoche.edu.ec/bitstream/123456789/647/1/13T0670%20.pdf>.



- García Zapata, L. (Septiembre de 2015).
http://tauja.ujen.es/bitstream/10953.1/2553/1/TFG_Garc%20C3%ADa%20Zapata%2C%20Laura.pdf.
- Garrido, E. F., Alarcón, S. A., Toledano, M. A., Ordoñez, J. M., & Pérez, J. (Junio de 2016).
<https://docplayer.es/80516378-Elaboracion-de-col-fermentada-chucrut-1-introduccion-2-proceso-de-elaboracion-3-legislacion-4-experimentacion.html>. Obtenido de <https://>
- Gómez, A. H. (2017). file:///E:/investigación/Hurtado_ga.pdf. Obtenido de <http://>
- González, e. E. (2010). <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2010/fag643e/doc/fag643e.pdf>.
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., . . . Lemair, T. (Octubre de 2011).
<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>.
- Jinde, A. (2014). <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8440/1/AL%20541.pdf>.
- Levenspiel, O. (1986). Ingeniería de las Reacciones Químicas. México: REVERTÉ, S. A.
- López, M. F. (2010). <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/647/1/13T0670%20.pdf>.
 Obtenido de <http://>
- Maljovich, M. A. (2001). https://bteduc.com/guias_es/73_Fermentacion_lactica_chucrut.pdf.
 Obtenido de <http://>
- Matsumoto, K. S., & Sánchez, F. P. (2013).
<http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/fermentaciones.pdf> pagina25. Obtenido de <http://>
- Morocho, S. M. (2016). <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5134/1/13T0828.pdf>.
- Navarro, C. E. (Julio de 2011). http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/52/TDE-2011-10-11T14:43:45Z-1924/Publico/navarro_ocando_carlos_navarro.pdf.
- Oporto, L., & Puma, J. J. (2017).
<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/2516/Nuopchl.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Obtenido de <http://>
- Parra, R. A. (Enero de 2010). <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.
- PEDERSON, C. S., & ALBURY, M. N. (1969).
<file:///C:/Users/MARAJO~1/AppData/Local/Temp/bulletin824.pdf>. Obtenido de <file://>
- Puerta, G. I. (2010). <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0402.pdf>.
- Pundir, R. K., & Jain, P. (2010). [https://idosi.org/wjdfs/wjdfs5\(2\)/19.pdf](https://idosi.org/wjdfs/wjdfs5(2)/19.pdf).
- Ramírez, J. C., Ulloa, P. R., González, M. Y., Ulloa, J. A., & Romero, F. A. (Junio de 2011).
file:///E:/investigación/Bacterias_lacticas_Importancia_en_alimen.pdf. Obtenido de <file://>
- Ramos, M. A. (2007).
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1394/T16446%20RAMOS%20SANTOS,%20MARCO%20ANTONIO%20MONOGR.pdf?sequence=1>.
- Sayago, J., & López, F. (1989). <file:///E:/investigación/475-1958-1-PB.pdf>.
- Thakur, P. K., & Kabir, J. (Marzo de 2015).
<http://www.cropandweed.com/archives/2015/vol11issue1/7.pdf>.
- Umpierre, C. (11 de Diciembre de 2017). <https://www.informeagricola.com/repollo-y-sus-beneficios-a-la-salud/>.
- UNAM. (2014).
<https://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad2/fermentacion/lactica>.



- Vargas Rodriguez, Y. M., & Obaya Valdivia, A. E. (2005).
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/METODOSORDENDEREACCION_19882.pdf.
- Yagües, V. G. (24 de Octubre de 2008).
<https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf>. Obtenido de <http://>

ANEXOS

Anexo 1. Cinética Química

Comprende el estudio de la velocidad de las reacciones químicas teniendo en cuenta los factores que la influyen, es importante para poder pronosticar la rapidez de transformación de los reactivos en productos, siendo indispensable tener datos experimentales de concentración de los reactantes en función del tiempo para determinar el orden de reacción (Vargas Rodriguez & Obaya Valdivia, 2005).

Anexo 2. Método integral

Este es uno de los métodos más empleados, se basa en trazar líneas rectas a partir de las ecuaciones integradas de la concentración de productos o reactantes con respecto al tiempo, al final se efectúa una regresión lineal, en la que el orden de reacción vendrá dado para la gráfica con mayor correlación (Vargas Rodriguez & Obaya Valdivia, 2005).

Expresiones integradas de orden cero, primer orden y segundo orden

Orden de reacción	Ecuación Integrada
Orden cero	$C_{A0}-C_A= kt$
Primer orden	$\ln(C_{A0}/C_A)=kt$
Segundo orden	$(1/C_A)-(1/C_{A0})=kt$

Fuente: (Del Campo López, 2015)



Anexo 3. Método diferencial

Este método se basa en calcular las pendientes, en diferentes concentraciones de reactante en función del tiempo, se trazan tangentes a la curva en distintos intervalos de tiempo, y se calculan para cada tangente una pendiente que corresponde a la velocidad de reacción. Para buscar la velocidad que represente los datos se ensaya una forma particular de la ecuación $-r_A = kC_A^n$, graficando la velocidad de reacción vs la concentración, sin embargo, se puede probar una ecuación cinética de orden n, tomando logaritmos naturales para proceder a graficar.

$$-r_A = k \cdot C_A^n$$

$$\ln(-r_A) = \ln k + n \ln C_A$$

$$y = b + mx$$

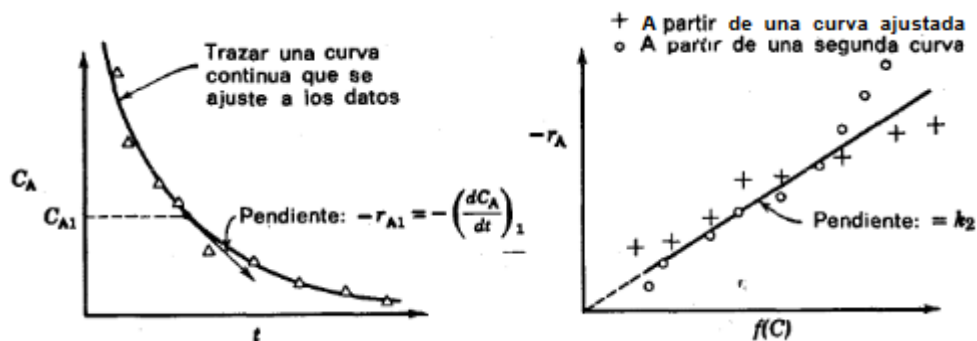
En dónde:

$-r_A$ = Velocidad de reacción

k = Constante cinética

C_A = Concentración de reactivos

n = Orden de reacción



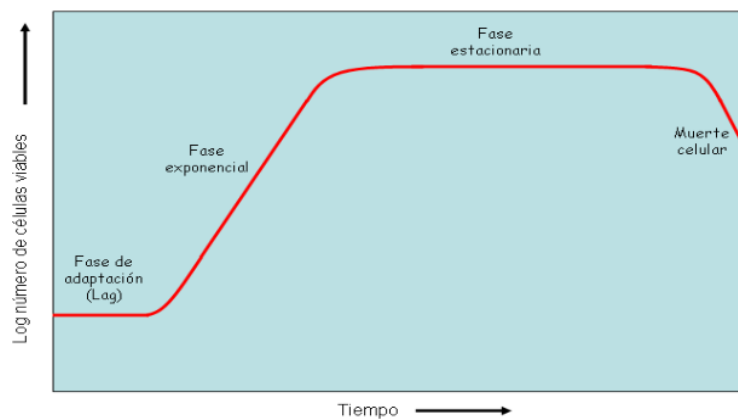
Fuente: (Levenspiel, 1986)

Este método se debe realizar con la mayor exactitud sobre todo en la representación de la curva de concentración vs tiempo, un pequeño cambio generaría un gran sesgo en las velocidades instantáneas, se recomienda que las tangentes sean trazadas a mano y se grafique por varias personas para una buena referencia.



Anexo 4. Crecimiento microbiano

Es el aumento de la cantidad de células cuando se multiplican los microorganismos, ya sea, por gemación o fisión binaria. El número de células crece por unidad de tiempo de una población microbiana. En la curva del crecimiento microbiano se pueden apreciar cuatro fases cómo se muestra en la siguiente figura (Navarro, 2011).

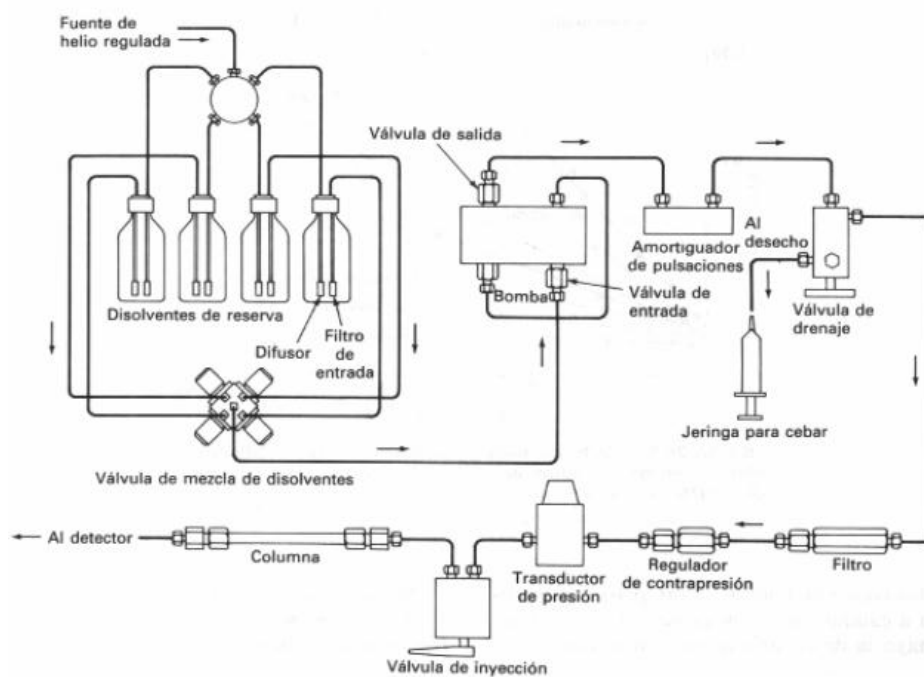


Fuente: (Navarro, 2011)

Anexo 5. Cromatografía

Este es un método de separación, que pone en contacto una fase estacionaria y otra móvil, en la móvil se coloca una muestra que es trasladada por toda la columna que contiene a la fase estacionaria. En el momento que se han seleccionado los componentes de la muestra se dispersan en bandas en la fase móvil, debido a las diferentes propiedades físicas y/o químicas de los elementos de la muestra surge primero el componente menos ligado, y al final el que está más fuertemente retenido (Yagües, 2008).

Cromatografía líquida de alta performance (HPLC): En esta técnica la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es otro líquido inmiscible o un sólido, al introducir la muestra cada analito recorrerá la columna con distinta rapidez, y al final cada elemento eluirá en un lapso distinto (Oporto & Puma, 2017). En la siguiente figura se puede apreciar el esquema de un cromatógrafo líquido.



Fuente: (Yagües, 2008)

Anexo 6. Diseño factorial completo 2^k

Este tipo de diseño es muy útil debido a su simplicidad, es el diseño con menor número de experimentos en el que podemos estudiar los efectos y la interacción de k factores en un proceso, en esta investigación $k=3$, no se necesita un software especializado para construir o analizar los resultados el diseño factorial 2^k . En esta investigación para el Cada factor se estudia a dos niveles y sus experimentos resultan de las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles



de los otros factores. La siguiente tabla muestra la matriz para dos niveles y tres factores (Ferré, 2004)

Experimento	b_0	b_1	b_2	b_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1

Fuente: (Ferré, 2004)

Los experimentos se evalúan para poder ajustar una ecuación polinomial (Ferré, 2004).

Anexo 7. Aplicación del método integral para la glucosa.

Tiempo Min	Concentración de Glucosa g/ml	Orden Cero $C_{A0} - C_A$	Primer Orden $\ln (C_{A0} / C_A)$	Segundo Orden $(1/ C_A) - (1/ C_{A0})$
4320	0,0248147	0	0	0
5040	0,02092678	0,00388792	0,17040654	7,48696637
8640	0,01412598	0,01068872	0,56342056	30,4928547
9360	0,01278674	0,01202796	0,66302752	37,9073226
10080	0,00972334	0,01509136	0,93690704	62,5466247

Anexo 8. Aplicación del método integral para la fructosa.

Tiempo Min	Concentración de Fructosa g/ml	Orden Cero $C_{A0} - C_A$	Primer Orden $\ln (C_{A0} / C_A)$	Segundo Orden $(1/ C_A) - (1/ C_{A0})$
4320	0,01373274	0	0	0
5040	0,01064958	0,00308316	0,25426231	21,0817367
8640	0,0070156	0,00671714	0,67164652	69,7208034
9360	0,00697788	0,00675486	0,67703762	70,4913224



10080

0,00604332

0,00768942

0,82082923

92,6532791

Anexo 9. Resultados de análisis de BAL, realizados por el laboratorio “MSV” .

Parámetro	Método	Unidad	Resultado	Tiempo
Bacterias ácido lácticas	Mossel	UFC/ml	4,30E+07	0
Bacterias ácido lácticas	Mossel	UFC/ml	2,10E+08	24
Bacterias ácido lácticas	Mossel	UFC/ml	5,40E+08	48
Bacterias ácido lácticas	Mossel	UFC/ml	8,80E+08	72
Bacterias ácido lácticas	Mossel	UFC/ml	4,00E+06	144

Anexo 10. Descripción del equipo y condiciones utilizadas para el análisis de muestras en HPLC.

- **Equipo:** Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca JASCO, modelo CO-4061, con “loop” de inyección de 10 ul.
- Bomba cuaternaria JASCO PU 4180
- Detector IR-4030
- Fase estacionaria
Columna Nucleogel sugra 810 Ca.
Tipo fase reversa
Longitud:300mm
Diámetro de partícula: 9 um
Diámetro interno: 7.8 mm
- **Temperatura;** 85°C
- **Fase móvil**
Fase móvil 100% A condiciones isocráticas



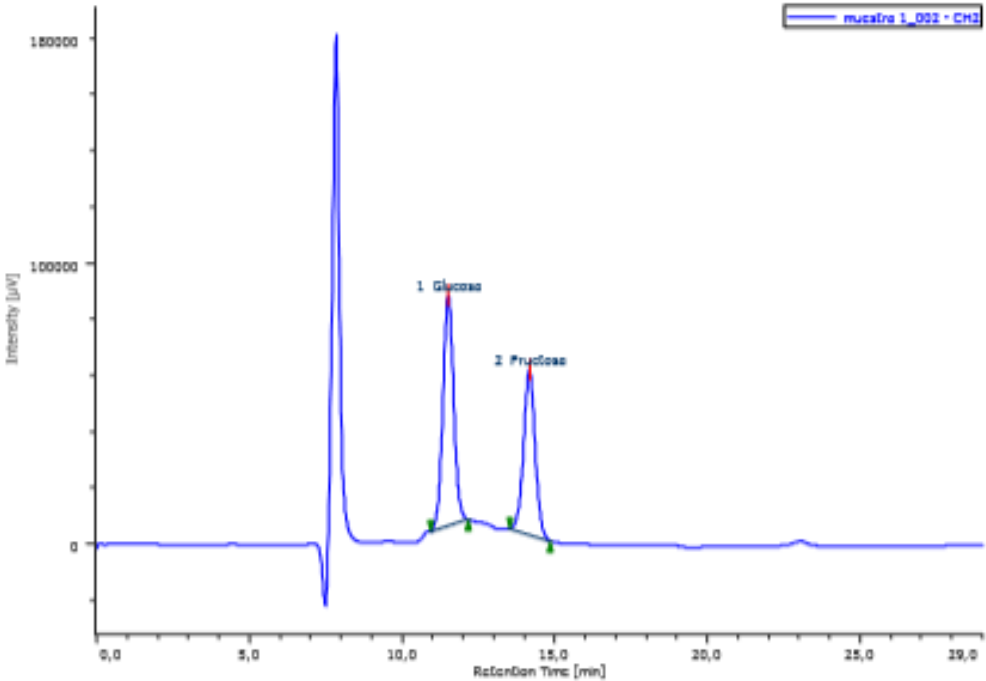
Anexo II. Resultados obtenidos en HPLC y curvas de cada una de las muestras entregadas en el laboratorio.

Muestra	Glucosa (mg/l)	Fructosa (mg/l)	Ácido Láctico (mg/l)
1	16405,48	13076,42	N/A
2	15906,02	12747,34	N/A
3	14090,68	10985,28	1723,78
4	24767	19156,165	3859,86
5	22078,6	14010,56	5298,82
6	19500,1	11354,6	6960,8
7	24814,7	13732,74	6961,26
8	20926,78	10649,58	8790,9
9	14125,98	7015,6	9990,96
10	12786,74	6977,88	10170,68
11	9723,34	6043,32	10540,06

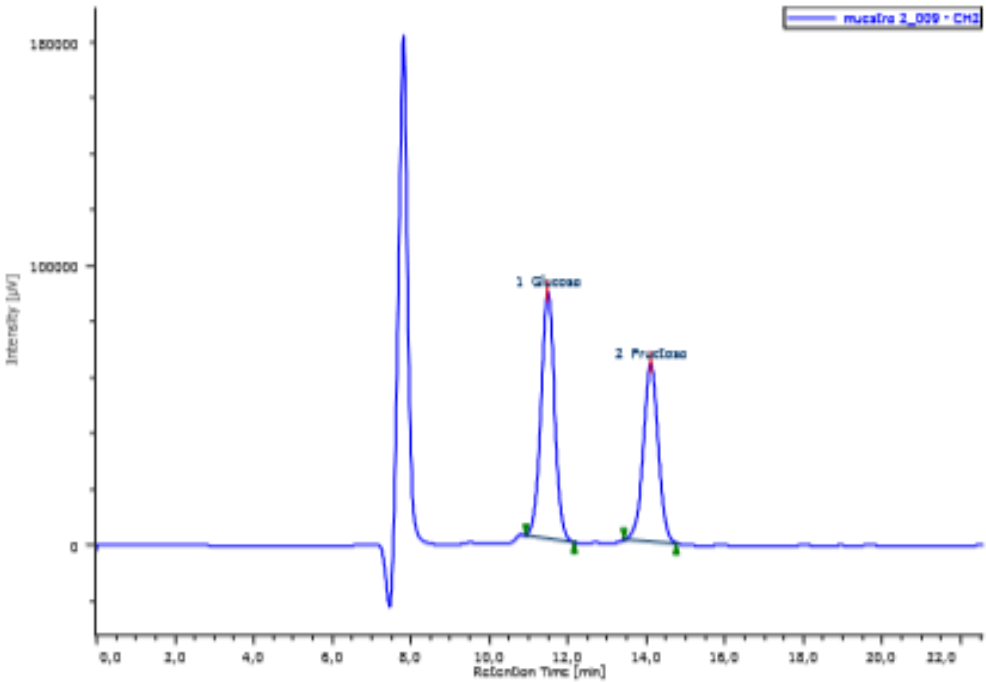


CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS

MUESTRA 1

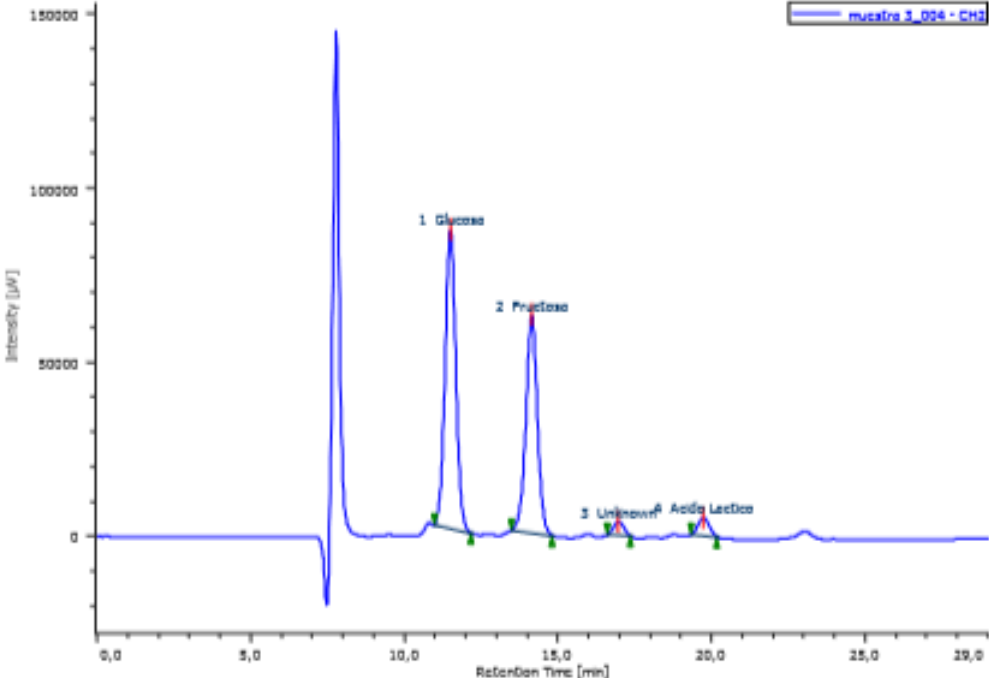


MUESTRA 2

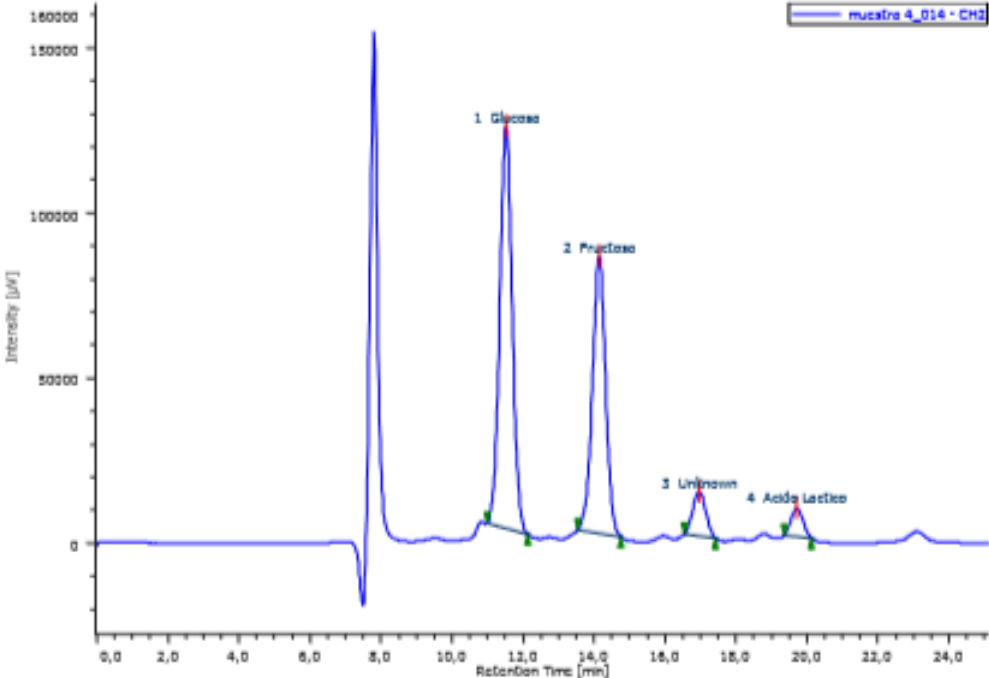




MUESTRA 3

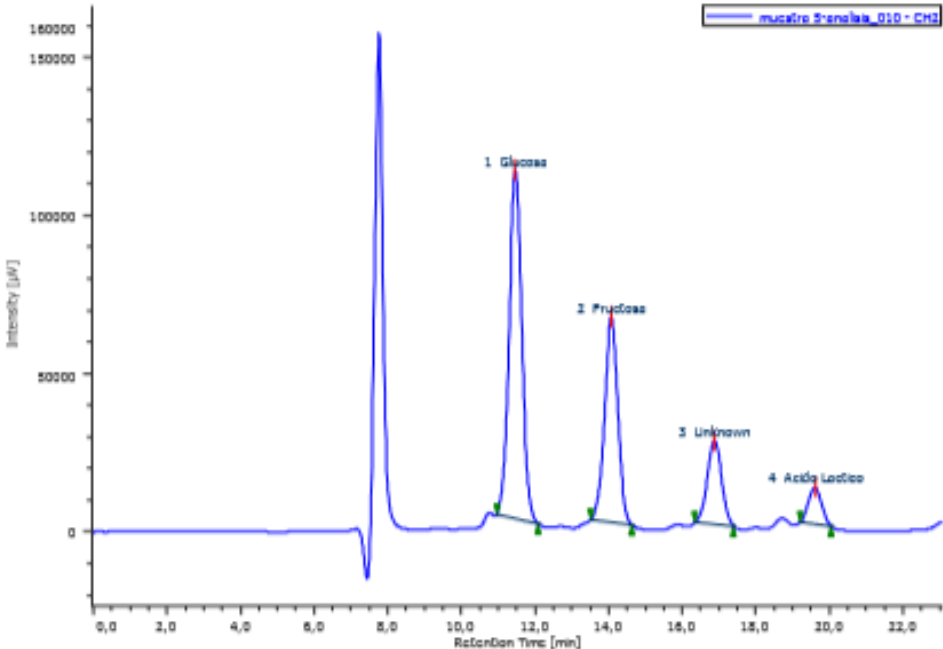


MUESTRA 4

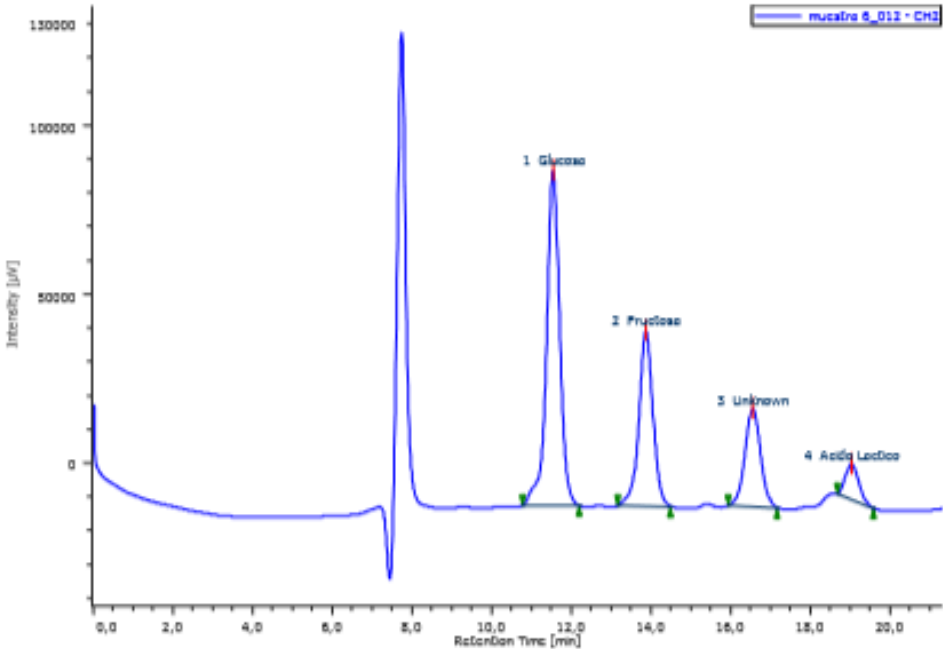




MUESTRA 5

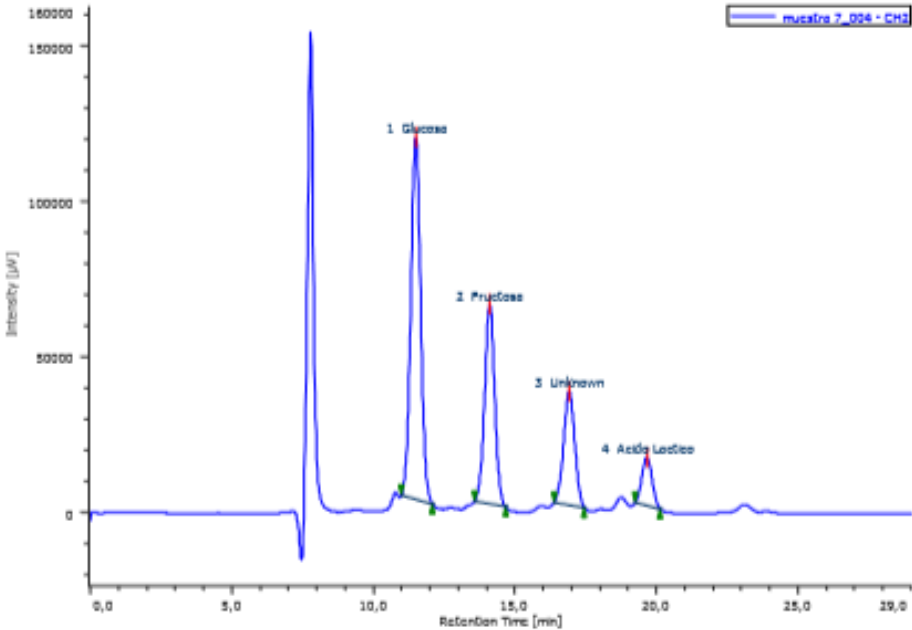


MUESTRA 6

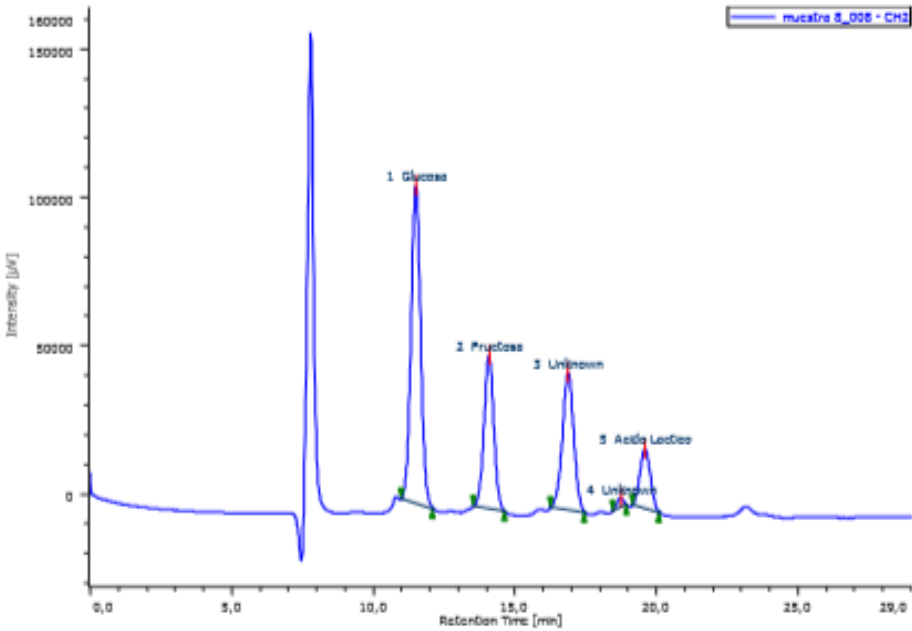




MUESTRA 7

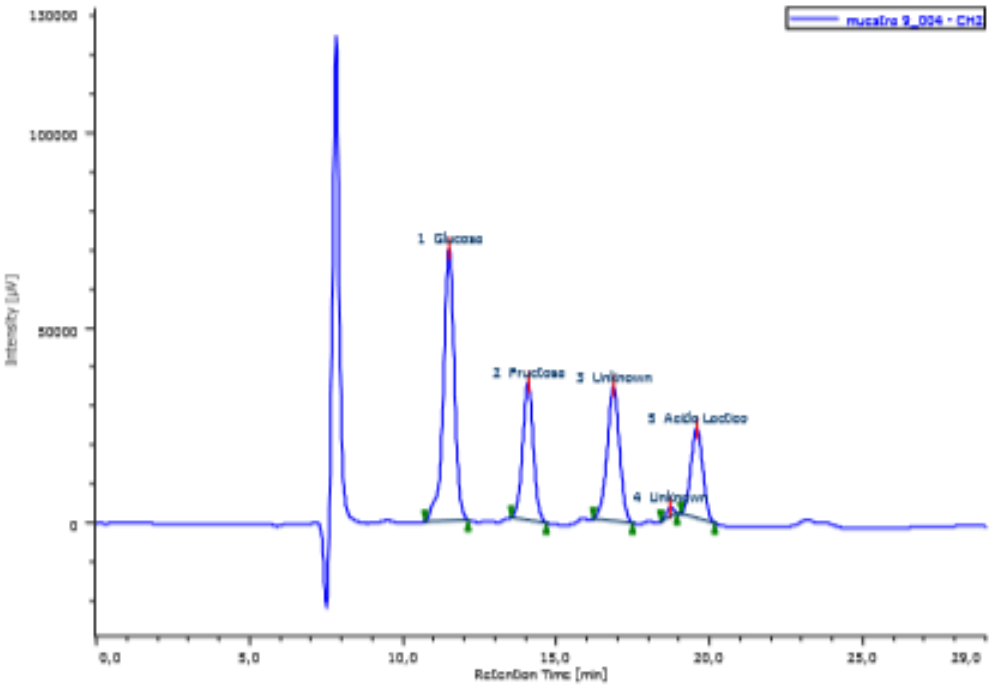


MUESTRA 8

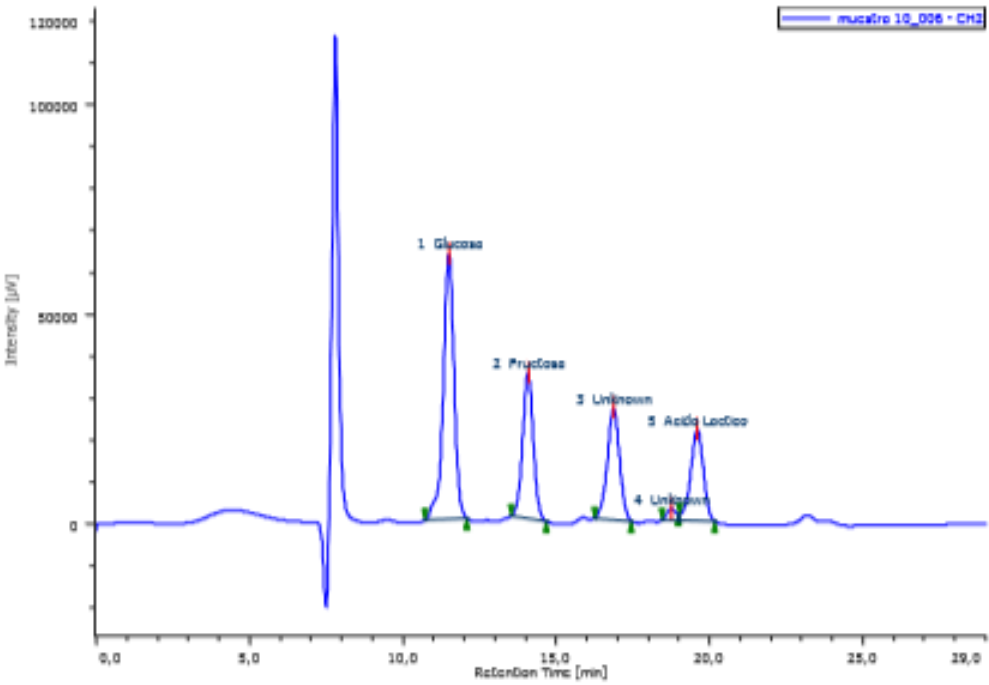


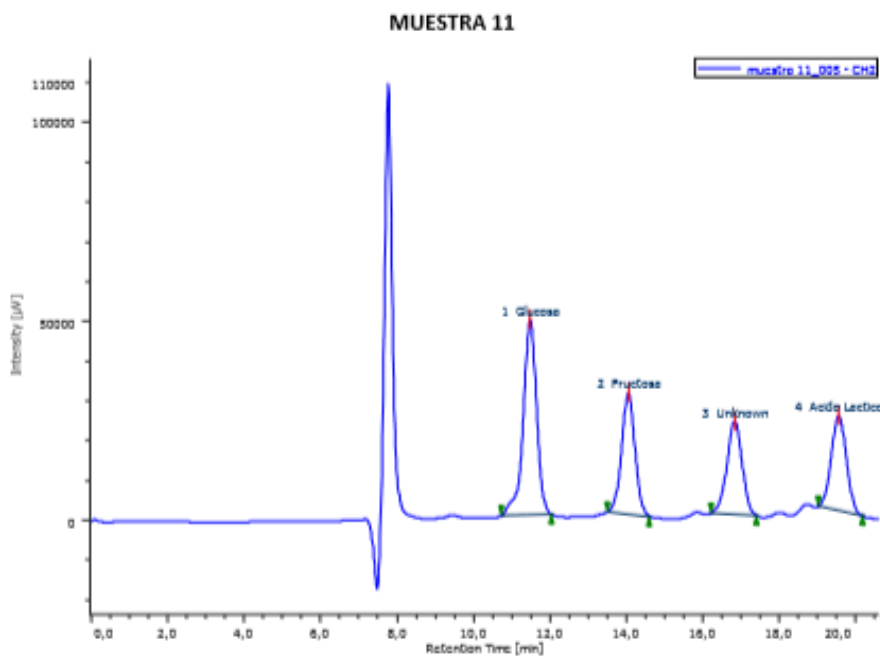


MUESTRA 9



MUESTRA 10





Anexo 12. pH y acidez del diseño experimental

Experimento	pH	% acidez
1	3,55	1,65375
2	3,42	2,025
3	3,25	1,845
4	3,42	1,9575
5	3,29	1,9125
6	3,67	1,6875
7	3,2	1,98
8	3,67	1,665

Anexo 13. pH tomado en el líquido de gobierno del chucrut cada 12 horas

Tiempo (horas)	Ph
0	5.72
12	5.6
24	5.51
36	5.42
48	5.3
60	5.1
72	4.04
84	3.94
96	3.72
108	3.52
168	3.48
180	3.42
192	3.4
204	3.4
216	3.4

Anexo 14. Fotos durante el proceso de investigación

Hojas frescas de repollo picadas



Adicionado NaCl 3% p/p





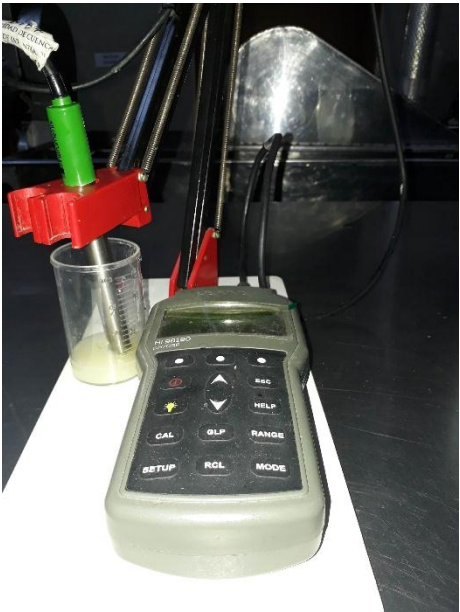
Chucrut envasado



Chucrut T=25°C



Medición de pH



Determinación de la acidez titulable



Color anaranjado del viraje



Toma de muestras para los análisis

