

Leji 142

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



FERMENTACION LACTICA PARA LA CONSERVACION
DE ALIMENTOS FERMENTADOS

ENSILAJE DE *Manihot esculenta* ENRIQUECIDA
CON *Aspergillus niger*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN POZO DE LA TIJERA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Para conservar el producto húmedo de la harina de yuca cocida (*Manihot esculenta*), así como el producto húmedo derivado del crecimiento de *Aspergillus niger* en esta, según el método de cultivo en medio sólido de Raimbault (1980), se desarrolló un procedimiento de fermentación láctica por medio de una cepa de *Lactobacillus* sp.

La cepa fue previamente aislada y seleccionada a partir de diferentes fuentes de alimentos fermentados tradicionales en México y de vegetales frescos fermentados y se inocularó a diferentes concentraciones de harina (g/l) diluída en agua y suplementada con diferentes fuentes de nitrógeno y minerales.

Se utilizó un diseño tipo Box Wilson simplificado para la identificación de variables críticas que resultaron ser: la adición de Ca(OH)_2 para fijar el pH inicial a 6.5, la presencia de celulosa e inóculo de *Lactobacillus* sp.

La cinética de producción de ácido láctico pareció seguir el modelo de Monod. Sin embargo, se encontraron discrepancias de este modelo con los datos experimentales a niveles cercanos a 450 g/l de sustrato.

Se obtuvieron indicaciones para aplicar una ecuación de cinética de fermentación láctica a las distintas concentraciones de sustrato.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

II. GENERALIDADES

- 1) Fermentación láctica
- 2) Fermentaciones lácticas tradicionales
- 3) Alimentos fermentados en medio sólido
- 4) Enriquecimiento de harinas por *Aspergillus niger*
- 5) Importancia de la yuca (*Manihot esculenta*)

III. OBJETIVOS

IV. MATERIALES Y METODOS

- 1) Aislamiento de bacterias lácticas a partir de fermentaciones tradicionales y vegetales fermentados.
- 2) Selección de una cepa altamente productora de ácido láctico y amilolítica
- 3) Análisis de la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de harina de yuca a diferentes porcentajes de humedad.
- 4) Utilización del método de Diseño Experimental para el estudio y la optimización de la fermentación láctica de la harina de yuca enriquecida en proteína por la fermentación en medio sólido con *Aspergillus niger*

V. RESULTADOS Y DISCUSION

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

Diversos factores como son el aumento en el costo de la producción agrícola así como su lento incremento, en contraposición con el alarmante crecimiento de la población mundial y por consiguiente el aumento en la demanda cuantitativa de alimentos, nos hace pensar en la necesidad de buscar nuevas fuentes de los mismos utilizando los recursos disponibles que aún no han sido explotados. Es por este hecho que existe una gran necesidad de métodos más efectivos y menos costosos para el procesamiento de alimentos y de su preservación. Es fácil llegar a la conclusión anterior cuando vemos que cada día son más los problemas que surgen con respecto a proveer una dieta adecuada a la población mundial.

Es muy conocido ya el hecho de que una simple transferencia de tecnología de los países industrializados a los países en vías de desarrollo, no es la solución a estos problemas, debido a un sinnúmero de factores como son, la infraestructura para la industrialización, las facilidades para la comunicación y el suministro de agua y energía, entre otros, por lo que se ha pensado que lo más conveniente es desarrollar la tecnología en cada sitio de acuerdo a los materiales disponibles, así como a la ideología y a las cos

tumbres, entre otros aspectos.

La fermentación como sinónimo de procesamiento y preservación de los alimentos fue descubierta hace muchos siglos; sin embargo, es hasta recientemente cuando el mundo moderno a fijado su atención en los alimentos indígenas fermentados y ha descubierto que son, literalmente hablando, una mina de oro de la Ciencia y la Tecnología alimentaria que está esperando ser tomada y desarrollada para su uso en la alimentación.

La fermentación ofrece métodos a un bajo costo para la preservación de vegetales frescos mediante la fermentación láctica. Las fermentaciones tradicionales han perdurado a través del tiempo, debido a varias características como son: el incremento en el contenido proteínico de sustratos con altas concentraciones de almidón y el enriquecimiento de los alimentos con importantes vitaminas y aminoácidos esenciales.

Cabe aclarar que, únicamente en el territorio mexicano, existen una gran variedad de alimentos fermentados tradicionales en las diferentes regiones etnográficas y que, actualmente, en distintos centros de investigación se están realizando diferentes proyectos de investigación en torno a alguno de ellos desde muy diferentes puntos de vista. El presente trabajo forma parte de un proyecto de fermentación sólida aerobica y aneróbica, para el enriquecimiento en proteína de

la harina de yuca (*Manihot esculenta*).

Con estas fermentaciones se pretende enriquecer en proteína a la harina de este tubérculo (*M. esculenta*) mediante la inoculación con cepas de mohos tales como *Aspergillus niger* y de esa forma llegar a niveles cercanos al 20% de proteína, muy superior al 3% inicial.

Por otra parte, la fermentación láctica puede contribuir de dos formas:

- a) conservando el producto en forma húmeda antes de su fermentación.
- b) conservando el producto en forma húmeda después de ser enriquecido con *A. niger*.

Por tal motivo en este estudio se pretenden determinar las condiciones nutricionales, humedad y pH que favorezcan la fermentación láctica de la yuca, sola o enriquecida por el crecimiento de *A. niger*.

II. GENERALIDADES

1) Fermentación láctica

El concepto de fermentación ha pasado por una serie de significados a través del tiempo; actualmente se restringe a los procesos que tengan un compuesto orgánico como aceptor final de electrones. Este proceso puede conducir a la

formación de diferentes productos característicos, lo cual hace que las fermentaciones puedan ser clasificadas de acuerdo a su producto final (Doelle, 1975).

El ácido láctico es frecuentemente un producto de las fermentaciones de carbohidratos y es uno de los procesos fermentativos más antiguos conocidos. Las reacciones que se llevan a cabo para la producción de este ácido a partir de la glucosa son las descritas por la ruta conocida con el nombre de Embden Meyerhof Parnas (EMP) el cual se describe en la Figura 1.

Las bacterias responsables de que se produzca ácido láctico son llamadas bacterias lácticas e incluyen en su mayoría especies pertenecientes a la familia Lactobacillaceae; son fermentadoras obligadas y se dividen en dos grandes grupos dependiendo de si su producto final es casi exclusivamente ácido láctico (homolácticas) o si, además de ácido láctico producen otros compuestos a partir de carbohidratos como son etanol, ácido acético y CO_2 (heterolácticas).

A continuación se señalan las características generales de estas bacterias lácticas:

- Son gram positivas
- No esporuladas
- Obtienen energía sólo de la fosforilación a nivel de sustrato (fermentadoras obligadas).

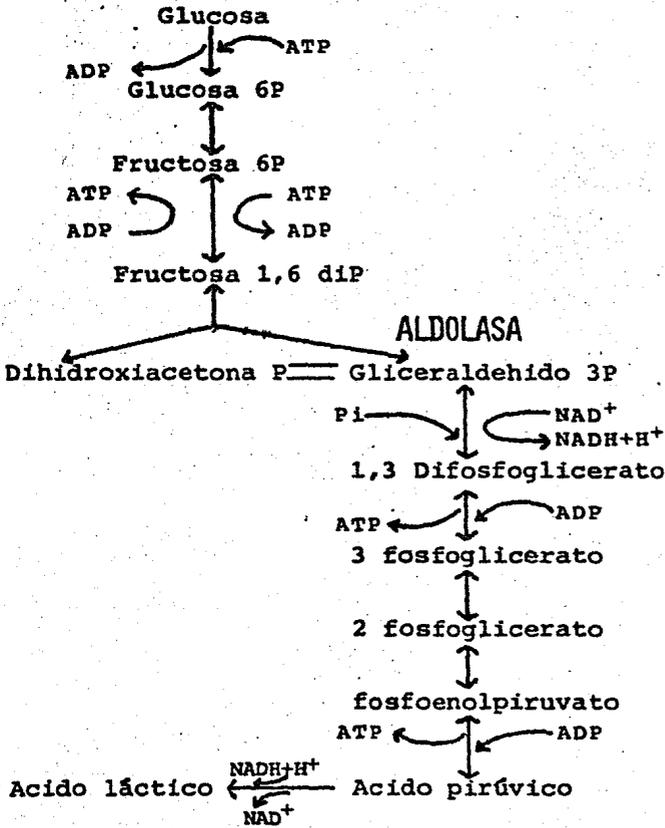


FIG. 1. Producción de ácido láctico, vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). (Bacterias homolácticas).

- Restringidas a hábitats con azúcares.
- Carecen de porfirinas y del sistema de citocromos (no presentan fosforilación oxidativa).
- Son cocos o bacilos
- La mayoría no son patógenas
- Van de anaerobias facultativas a anaerobias estrictas.
- Sus requerimientos nutricionales son muy estrictos en cuanto a los aminoácidos esenciales necesarios.
- Requieren de algunas vitaminas básicas, que generalmente son tiamina y ácido pantoténico (Prescott y Donn, 1962).

Las diferencias fundamentales entre los dos grandes grupos de bacterias lácticas son:

HOMOFERMENTATIVAS

- *Producen 70% de ácido láctico
- *Mayor crecimiento celular
- *Poseen aldolasa (Doelle, 1975)
- *Poca producción de CO₂
- *Producen 1.8 (o más moles de ácido láctico por mol de glucosa)

HETEROFERMENTATIVAS

- *Producen ácido láctico, etanol y ácido acético
- *Menor crecimiento celular
- *Sin aldolasa y con fosfocetolasa
- *Mucha producción de CO₂
- *Producen menos de 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa

*Realizan la ruta EMP completa, incluyendo la conversión del ácido pirúvico—ácido láctico

*Siguen la ruta de la fosfoacetolasa (Fig. 2)

*No tienen glucosa 6P deshidrogenasa

*Además de fermentar glucosa, fermentan fructuosa, manosa, galactosa y disacáridos.

Tomando en cuenta su morfología y el tipo de fermentación que realizan, se pueden subdividir en cinco grupos (Stainer, et al., 1969; Doelle, 1975).

FORMA	AGRUPACION	TIPO DE FERMENTACION	GENERO
COCOS	En cadenas	Homofermentativas	<i>Streptococcus</i>
		Heterofermentativas	<i>Leuconostoc</i>
	En tétradas	Homofermentativas	<i>Pediococcus</i>
	BACILOS	Generalmente en cadenas	Homofermentativas
Heterofermentativas			<i>Lactobacillus</i>

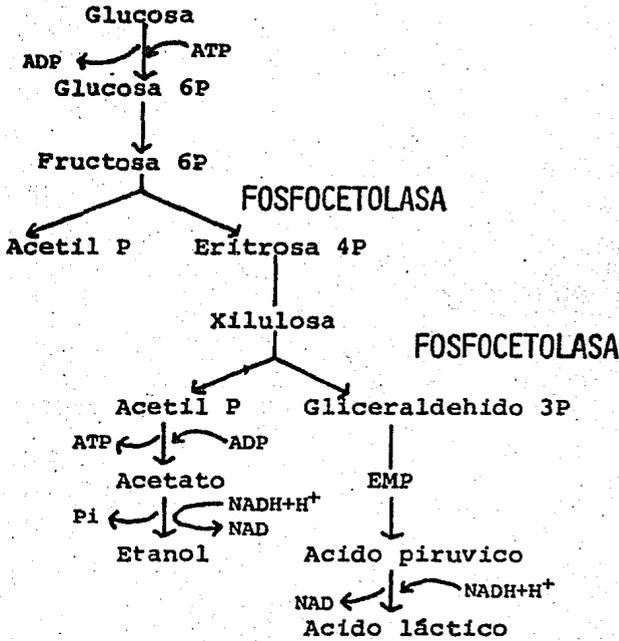


FIG. 2. Producción de ácido láctico, vía fosfocetolasa (Bacterias heterolácticas)

Cuando ocurre una fermentación espontánea, generalmente da lugar a una fermentación alcohólica o láctica. Se ha observado que el que se realice una u otra depende de la materia utilizada como sustrato. Viniegra-González y Gómez (1982) enfatizan que la proporción C/N es determinante en el tipo de fermentación que se llevará a cabo, de tal forma que cuando $C/N > 60$ se facilitan las fermentaciones alcohólicas y cuando $C/N < 30$ se facilitan las fermentaciones lácticas. El pH inicial también es un factor determinante cuando predomina el N bajo la forma de NH_4^+ , Gómez y Coronado (1983) encontraron que a pH muy bajo se lleva a cabo una fermentación alcohólica en lugar de una fermentación láctica (en fermentaciones con inóculo mixto).

Diversos autores han demostrado que las condiciones bajo las cuales se realiza una fermentación, determinan las concentraciones de los productos obtenidos: una fermentación homoláctica puede desviarse a que sea heteroláctica únicamente por la aereación del cultivo, lo cual hace que se produzca mayor concentración de acetatos comparada con la producción de lactatos (Dirar y Collins, 1977; Thomas, *et al.*, 1979 in Viniegra-González y Gómez, 1982).

Varios autores se han dedicado a estudiar la cinética de la fermentación láctica a lo largo de 20 años, y no obs-

tante que se han utilizado diferentes organismos y que existen algunas discrepancias en cuanto a los modelos propuestos, puede decirse que existen ciertos aspectos fundamentales en los que todos coinciden:

- a) La producción de ácido láctico está asociada principalmente con la concentración (Viniegra-González y Gómez, 1982).
- b) La fermentación láctica es fuertemente inhibida por el ácido láctico.
- c) La producción de ácido láctico depende en gran parte del pH.

La fermentación láctica puede realizarse por cultivos mixtos o puros; generalmente el producto final es el ácido láctico, el cual continúa estable tanto tiempo como se conserva en anaerobiosis. Si la concentración de carbohidratos solubles presentes en el sustrato es baja, existe una insuficiente producción de ácidos orgánicos dando lugar al crecimiento de organismos indeseables como *Clostridium* (el cual convierte el ácido láctico en butírico, cuya actividad causa la degradación de proteínas) (Viana, 1982), *Salmonella*, *Shigella*, etc. Pero si la producción de ácido láctico es favorable, no existe el crecimiento de estos organismos, ya que este ácido actúa como inhibidor de la mayoría de las bacterias patógenas; esta característica es la que hace que

la fermentación láctica sea utilizada como conservador de alimentos.

Anteriormente se conocían únicamente las fermentaciones tradicionales espontáneas y eran las que se utilizaban en la industria, pero se conoce muy poco sobre la bioquímica de la fermentación láctica; el control del pH y de la fuente de nitrógeno, según estudios realizados por Gómez y Viniegra-González (1981), presentan una interacción y son muy importantes para la orientación de la fermentación en sustratos, que tienen poblaciones microbianas heterogéneas; las conclusiones a las que se llegaron fueron que sin nitrógeno protéico (sulfato de amonio) se necesitan pHs de 6.5, pero las fermentaciones lácticas llevadas a cabo con proteína verdadera abundante, se realizan dentro de un intervalo de valores de pH muy amplio (por debajo de 7).

En los ensilajes de vegetales frescos se llevan a cabo principalmente tres etapas (Whittenbury, 1964):

1. Rompimiento aeróbico de los carbohidratos; aparecen levaduras y bacterias acéticas, las cuales consumen CO_2 e incrementan la temperatura de los materiales fermentables.
2. Crecimiento de bacterias lácticas; primeramente aparecen *Streptococcus* y *Leuconostoc* y más tarde aparecen *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

3. Producción de ácido láctico; permanecen los *Lactobacilli* y desaparecen los *Streptococci*.
 4. Crecimiento de *Clostridium*. No siempre se presenta.
-

2. Fermentaciones lácticas tradicionales

Los alimentos fermentados tradicionales son nativos a un área y propios a la cultura de un país. En la mayoría de los casos son aborígenes y se desarrollaron antes de que se registrara la historia (Steinkraus, 1981). Los alimentos fermentados presentan una serie de ventajas que hacen que se sigan obteniendo aún hoy en día, entre las cuales podemos mencionar las siguientes:

- Generalmente requieren de métodos de bajo costo de procesamiento.
- Se pueden preservar productos animales y vegetales perecederos.
- Hay reducción en el volumen del material, lo cual los hace más fáciles de almacenar y transportar.
- En algunos se presenta un significativo aumento en el contenido proteínico a partir de sustratos con alto contenido inicial de almidones.
- Aumento en el valor nutritivo.
- Destrucción de factores no deseados (sabores, olores)

- Adquisición de sabores y texturas agradables
- Aprovechamiento de productos que no podrían ser utilizado de otra manera: fauna de acompañamiento, etc.
- Reducción del tiempo de cocinado (ahorro de combustible)
- Obtención de productos agradables
- Obtención de productos seguros: mejoramiento en las cualidades sanitarias.

(Hesseltine y Wang, 1979; Steinkraus, 1981).

El efecto de la fermentación varía según el organismo que se encuentre presente y las condiciones establecidas para que se realice la fermentación; de acuerdo al efecto que se obtenga sobre el sustrato han sido clasificadas en diversos tipos (Hesseltine y Wang , 1979; Steinkraus, 1981); nuestro tema de estudio será el de las fermentaciones ácido lácticas.

Las fermentaciones ácidas se realizan en sustratos con contenidos de fibras muy altas; según McCullogh (1977) citado por Viana(1982), para obtener una fermentación láctica ideal, el producto por ensilar debe presentar un contenido de materia seca del 28 al 34%, carbohidratos solubles de 6 al 8%, una mínima capacidad buffer y una elevada población de bacterias ácido lácticas.

En las fermentaciones lácticas tradicionales, el valor nutritivo se ve incrementado y las condiciones que se forman durante la fermentación hacen que no sean fácilmente contaminadas por microorganismos no deseados; debido a que son alimentos utilizados desde hace mucho tiempo, tienen una aceptación cultural muy alta.

Normalmente cuando nos referimos a alimentos fermentados, siempre pensamos en aquéllos ya comercializados como son la salsa de soya, los quesos, la pasta de frijol de soya, etc., pero nunca pensamos en que existen muchos y diversos alimentos que son utilizados por una gran parte de la población mundial como elemento esencial de su nutrición.

En la Tabla 1 se enumeran una serie de alimentos, producido por fermentación ácido-láctica, mencionando el lugar donde se producen y el sustrato utilizado; es interesante ver que aunque no existe ningún tipo de comunicación entre los diferentes pueblos, existen ciertas similitudes en sus alimentos, como son el tipo de sustratos, ya que la mayoría se basan en cereales: sorgo, maíz y trigo, entre otros. Los procesos de fermentación también presentan similitudes, por ejemplo, la mayoría de estas fermentaciones son inoculadas por

si solas a la hora de su preparación.

En general, podemos decir, que son muy pocos los estudios realizados en cuanto a la fisiología, microbiología y bioquímica de los alimentos tradicionales no comercializados; si nos remitimos a la bibliografía, nos podemos percatar de que los primeros estudios realizados generalmente son de carácter etnológico y antropológico, y últimamente es que se empiezan a realizar estudios desde el punto de vista del valor nutritivo, microbiología, bioquímica, etc.

Okafor (1981) menciona que es necesario realizar estudios científicos de los alimentos fermentados y que sólo de esa manera podrá implementarse una producción industrial de esos alimentos.

En México, los alimentos fermentados tienen un fuerte significado tradicional en el cual se mezclan creencias religiosas y sociales (Cruz Ulloa y Ulloa, 1973). La forma de prepararlo y el momento de ingerirlo es muy importante; por ejemplo, el tesguino (del náhuatl tecuin = que golpea el corazón) utilizado por algunas tribus del Noroeste de México, es una bebida preparada a base de granos de cereal -principalmente maíz - a la cual se le agrega una "liga" la cual consta de diversas plantas que actúan como catalizadores o fortificadores (Cruz Ulloa y Ulloa , 1973) y se deja

fermentar; principalmente se lleva a cabo una fermentación alcohólica, pero también ocurre una fermentación láctica. Dependiendo de la ocasión en la que se vaya a tomar es el tipo de liga que se le agrega (ver cuadro anterior).

El pozol (del náhuatl *pozolli* = espumoso) es también un alimento fermentado originario de México, el cual es utilizado por los mayas y otros grupos étnicos del Sureste desde antes de la conquista española (Ulloa, 1974). Consiste en una bola de masa de maíz que se deja fermentar y se diluye en agua para beberse. Constituye una bebida alimenticia básica para grandes núcleos de población en esa región (Herrera y Ulloa, 1975). Existen diversos trabajos relacionados con el estudio del pozol, como son aquellos acerca de su composición química (Massieu, et al., 1959), etnobiológicos (Salinas, Ch., 1958) y varios trabajos en los que se explican algunos aspectos relacionados con la microbiología de esta masa de maíz fermentada (Ulloa y Herrera, 1970; Herrera y Ulloa, 1970 y 1971; Ulloa, Herrera y de La Lanza, 1971, entre otros); también se han realizado trabajos sobre la sucesión de organismos que ocurre durante la fermentación del pozol (Ulloa, 1974).

Es interesante el conocimiento de bacterias fijadoras de N_2 atmosférico en algunas fermentaciones tradicionales

en México, como son el tesguino (Herrera, Taboada y Ulloa, 1972) y el pozol (*Agrobacterium azotophilum*) (Ulloa y Herrera, 1972).

Estudios comparativos entre el maíz y el pozol (Cravito, et al., 1955) y entre el maíz y el tesguino (Massieu, et al., 1959) a nivel químico, demostraron que existe un incremento en el nitrógeno proteico, en algunos aminoácidos (lisina y triptófano) y también de algunas vitaminas (niacina y riboflavina) en ambos alimentos, lo cual aumenta su valor nutritivo.

Debido a todo esto, es importante seguir haciendo estudios sobre los alimentos fermentados tradicionales, para así poder implementar una tecnología favorable; sin embargo, es importante no perder de vista una observación de Okafor (1981) en la cual menciona que existen algunos factores que limitan la aplicación de los conocimientos científicos para la producción de alimentos fermentados a gran escala, como son las costumbres en la preparación, además de las limitantes económicas, ya que la población que acostumbra ingerir este tipo de alimentos es de muy bajos recursos económicos y tiene los elementos necesarios para elaborarlos, así como la mano de obra.

TABLA 1

ALGUNOS ALIMENTOS FERMENTADOS INDIGENAS, PRODUCIDOS POR FERMENTACION LACTICA QUE SON CONSUMIDOS EN DIVERSAS REGIONES DEL MUNDO

NOMBRE	REGION	SUSTRATO	MICROORGANISMO
Mish	Egipto	Leche	Bacterias lácticas homofermentativas
Idli	India	Granos de arroz sin cáscara y semillas del frijol <i>Phaseolus mingo</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>L. lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus lactis</i>
Doza	India	Granos de arroz sin cáscara y semillas del frijol	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Levaduras
Natto	Japón	Semillas de frijol de soya	<i>Bacillus nato</i> (<i>B. subtilis</i>)
Shoyu	Japón	Semillas de frijol de soya	<i>P. halophilus</i> <i>Saccharomyces rouxii</i> <i>Torulopsis cristatilis</i> <i>T. etchelsii</i> <i>Candida tropicalis</i> , entre otros
Kaanga-Kopuwai	Nueva Zelanda	Granos de maíz	Bacterias lácticas no determinadas
Tocos	Perú	Granos de maíz	Bacterias lácticas no determinadas
Cañcha	Perú	Granos de maíz	Bacterias lácticas no determinadas
Arroz fermentado	Ecuador	Granos de arroz sin cáscara	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. candidus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Tasquino	NW de México	Granos y jugo de tallos de maíz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S. uvarum</i>

Continuación Tabla 1

		<i>Randia echino-</i> <i>carpa</i> <i>R. watsoni</i> <i>R. laevigata</i> <i>Coutarea pteros-</i> <i>perma</i> <i>Stevia serrata</i> <i>Datura meteloi-</i> <i>des</i> <i>Ariocarpus fis-</i> <i>suratus</i> <i>Bromus arizoni-</i> <i>cus</i> <i>Phaseolus met-</i> <i>calfei</i> <i>Lophophora wil-</i> <i>liamsi.</i>	<i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Candida valida</i> <i>Bacillus megaterium</i>
Kenkey	Africa (Ghana)	Granos de maíz germinado	<i>Lactobacillus</i> Levaduras
Koko	Africa (Ghana)	Maíz (polenta)	No existen datos micro biológicos
Kaffir beer	Sudafrica	Granos de sorgo y de maíz	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. fermenti</i> <i>L. brevis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>L. dextranicum</i> <i>Pediococcus damnus</i> Levaduras
Ogi	Nigeria	Granos de maíz, sorgo, mijo	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>Candida sp.</i> <i>Pediococcus sp.</i> <i>P. pentosaceus</i> Levaduras
Tarhana	Turquía	Granos de arroz precocido y yogurth	Bacterias lácticas

Continuación Tabla 1

Busa	Turkestan	Granos de arroz o de mijo con azucar	<i>Lactobacillus</i> <i>Saccharomyces</i>
Yogurth	Caucaso y Turquía	Leche	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
Kishk	Egipto, Siria y Arabia	Granos de trigo y leche	Bacterias lácticas <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>L. brevis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Burukutu	Nigeria	Granos de sorgo	Bacterias lácticas <i>Candida</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Garri	Zaire, Nigeria y Ghana	Túberculos de yuca	<i>Saccharomyces</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Streptococcus</i> Levaduras
Agidi	Nigeria	Granos de maíz	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Aerobacter cloacae</i> Levaduras
Mahewu	Sudafrica	Granos de maíz	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>Streptococcus lactis</i>
Pozol*	SE de México	Masa de granos de maíz	<i>Achromobacter pozolis</i> <i>Aerobacter aerogenes</i> <i>Agrobacterium azotophilum</i> <i>Escherichia coli</i> var. <i>neapolitana</i> <i>Pseudomona mexicana</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Paracolobactrum aerogenoides</i> <i>Candida quillermondii</i> var. <i>quillermondii</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>Hansenula fabianii</i>

* Se incluyen únicamente los organismos clasificados y reportados en la literatura; sin embargo, el Dr. M. Ulloa ha informado personalmente del hallazgo de numerosos lactobacilos en el pozol.

Continuación de la Tabla 1

Kluyveriomyces fragilis
Saccharomyces cerevisiae
Trichosporon cutaneum
Candida tropicalis
Alternaria tenuis
Aspergillus flavus
Epicoccum sp.
Fusarium spp.
Geotrichum candidum
Monilia sitophila
Mucor racemosus
M. rouxianus
Penicillium claviforme
P. cyclopium
P. expansum
P. italicum
P. lanoso-viride
Phialophora richardsiae
Rhizopus stolonifer
Trichoderma viride
Neurospora sitophila
Aureobasidium pullulans
Peecilomyces fumosoroseus
Hemispora stellata

Continuación de la Tabla 1

Kluyveromyces fragilis
Saccharomyces cerevisiae
Trichosporon cutaneum
Candida tropicalis
Alternaria tenuis
Aspergillus flavus
Epicoccum sp.
Fusarium spp.
Geotrichum candidum
Monilia sitophila
Mucor racemosus
M. rouxianus
Penicillium claviforme
P. cyclopium
P. expansum
P. italicum
P. lanoso-viride
Phialophora richardsiae
Rhizopus stolonifer
Trichoderma viride
Neurospora sitophila
Aureobasidium pullulans
Peecilomyces fumosoroseus
Hemispora stellata

3) Alimentos fermentados en medio sólido

Las fermentaciones en medio sólido han sido utilizadas por el hombre a lo largo de varios siglos, mucho antes de que fuera comprendido el proceso microbiológico y bioquímico involucrado.

Una fermentación en medio sólido es aquella en la cual el sustrato no se encuentra ni en solución ni en suspensión en un gran volumen de agua (Raimbault, 1980) o, como la definiría Knapp (1978), es cuando el sustrato es un sólido húmedo no suspendido en agua.

En las fermentaciones en medio sólido, el agua puede encontrarse formando parte del agua de constitución, del agua libre y del agua ligada (debido a diferentes fuerzas: covalentes, iónicas, higroscópicas o capilares), pero en ningún caso el agua ocupa todos los espacios libres y tampoco circula libremente (Raimbault, 1980). No es fácil establecer una línea exacta de demarcación con respecto al líquido libre en las fermentaciones sólidas. El contenido de humedad no puede ser inferior al 12% ya que por debajo de este nivel la actividad biológica cesa (Golueke, 1977 tomado de Moo-Young, et al., 1983) y por arriba de un 80% de humedad el líquido libre se hace aparente.

El koji (alimento fermentado de origen japonés) se

puede considerar como el prototipo de las fermentaciones sólidas. Se han realizado varias investigaciones de este alimento para conocer sus características y sus posibilidades y actualmente se utiliza para producir determinadas enzimas fungales, como son celulasas (Toyama, 1976, citado por Moo-Young, et al., 1983), amilasa y proteasas (Knapp, et al., 1978).

En la naturaleza, los sustratos sólidos (residuos vegetales y animales) sufren una degradación microbiológica y una transformación como producto de una serie de procesos microbiológicos que llevan a cabo los microorganismos en sucesión. La mayor diferencia entre el crecimiento microbiano en un sustrato sólido y uno líquido, es que en un sustrato completamente disuelto, todos los compuestos se encuentran uniformemente accesibles, mientras que en un sustrato sólido, el medio es heterogéneo y los compuestos no son accesibles en todos los sitios. Como se puede observar, la fermentación sólida presenta una serie de ventajas y desventajas que podemos resumir a continuación (Moo-Young, et al., 1983).

Ventajas

-Requieren de menos energía de proceso

Desventajas

-Presentan algunos problemas de dispersión de calor

- | | |
|---|---------------------------------|
| -Reduce el espacio ocupado | -Son más difíciles de controlar |
| -No es necesaria una etapa de recuperación del producto | -Falta de sensores adecuados |

Muchos microorganismos son capaces de crecer en sustratos sólidos, pero los hongos filamentosos son los más exitosos. Podemos mencionar tres clases de hongos filamentosos que han adquirido una importancia práctica: ficomicetos, con los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, ascomicetos con *Aspergillus* y *Penicillium*; y basidiomicetos (Moo-Young, et al., loc. cit.).

A partir del estudio de fermentaciones sólidas en la naturaleza y en alimentos tradicionales, se han tratado de implementar técnicas que presenten bajos costos, y las cuales presenten la ventaja de poder controlar el inóculo para así poder obtener el producto deseado; para esto han sido utilizados cultivos puros en fermentaciones sólidas a nivel industrial en el proceso Koji, el proceso Raimbault y el proceso de bioconversión Waterloo (Moo-Young, et al., loc. cit.).

4) Enriquecimiento de harinas por *Aspergillus niger*

Debido a los problemas económicos actuales, se ha visto que deben surgir nuevas técnicas de procesamiento para tener

suficientes fuentes de proteínas (Senez, et al., 1980). El enriquecimiento de harinas hace posible la obtención de alimentos balanceados en regiones en las cuales no existe otra forma de obtener proteína por medios convencionales (Raimbault, 1977). Los materiales amiláceos son de gran interés, debido a que existen varios microorganismos que crecen en sustratos que tienen como única fuente de energía el almidón y, además, estos microorganismos presentan una tasa de crecimiento muy alta.

Muchos *ficomicetos* y *ascomicetos* pueden convertir almidón a azúcares, en particular especies de *Mucor*, *Rhizopus* y especialmente, *Aspergillus* (Raimbault y Alazard, 1980). El *Aspergillus niger* tiene una alta actividad amilolítica y composición de aminoácidos muy aceptable (Senez, et al., 1980).

La harina de yuca es un sustrato amiláceo con un alto contenido de almidón, tiene un costo de producción muy bajo, es de fácil almacenamiento (en la tierra) y presenta una productividad por hectárea muy elevada; es debido a estas características que la fermentación de harina de yuca inoculada con *A. niger* a sido utilizada por varios investigadores (Raimbault & Alazard, 1980; Senez, et al., 1980, Carrizales, et al., 1981, entre otros) para el estudio de enriquecimiento de harinas.

5) Importancia de la yuca (*Manihot esculenta*)

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pertenece a la familia de las euforbiáceas. No se conoce en su estado nativo; existen dos centros geográficos de especiación del género, uno es el Oeste y Sur de México y parte de Guatemala y el otro el Noreste de Brasil. Los límites actuales de su distribución en el continente americano van de 25°N a 25°S (Purseglove, 1976).

Se cree que en el siglo XVI fue transportada por los portugueses desde el continente americano al africano, pero no tuvo gran importancia sino hasta el siglo XIX y su uso se incrementó en el siglo XX. También fue transportada a Malasia, Ceilán y las Filipinas.

Actualmente se le encuentra en todas las regiones tropicales, esencialmente en sitios de baja altitud, pero puede crecer a 5000 pies en el ecuador. Puede soportar prolongados periodos de sequía y vuelve a reverdecer rápidamente con las lluvias. Es por esto que es de gran valor en áreas con poca pluviosidad.

Los terrenos más favorables para su cultivo son de suelos arenosos o arcillosos-arenosos de una fertilidad razonable (Miranda, 1952), pero puede crecer en cualquier tipo de sue-

lo mientras no este inundado, sea poco profundo y no muy rocoso. Puede producir cosechas en suelos agotados que no son capaces de producir otros cultivos; es tomada incluso como la última cosecha en suelos rotativos. Un exceso en el fertilizante es contraproducente, ya que produce un excesivo crecimiento vegetativo a expensas del tubérculo y de la formación de almidón (Purseglove, 1976).

La yuca es un arbusto de corta vida, de 1-5 m de alto y presenta látex en todas sus partes. Los tubérculos se desarrollan como abultamientos en las raíces adventicias a corta distancia del tallo. Generalmente cada planta presenta 5-10 tubérculos, de 15-100 cm de largo, de 3-15 cm de ancho y ocasionalmente ramificados. Cada tubérculo presenta una peridermis, una corteza y una pulpa de parénquima donde se localiza el almidón. Cuando el tubérculo es viejo sufre un proceso de lignificación.

Existen diversas variedades de yuca, pero se pueden agrupar en dulces o amargas. Algunas autoridades han dado nombres específicos a éstas, pero esta distinción no es justificada ya que existe entrecruzamiento entre ellas. Es por esto que únicamente podemos dividirla para fines prácticos en yuca dulce (con bajo contenido de HCN) y en yuca amarga (con alto contenido de HCN). Este ácido cianhídrico, se encuentra

bajo la forma de glucósidos cianogénicos (linamarina y lotaustralina); al hidrolizarse éstos liberan HCN, lo cual la hace altamente venenosa. El mismo tubérculo contiene la enzima linamarasa, la cual, al ponerse en contacto con los glucósidos cianogénicos localizados en diferentes tejidos, libera HCN, y éste es eliminado por evaporación al hervir (Nartey, 1973). En México se cultiva principalmente la yuca dulce a diferencia de Africa donde se produce más yuca amarga.

Los tubérculos de la yuca son una fuente de carbohidratos muy importante en muchas regiones de tierras bajas de los trópicos. La forma de prepararlos varía entre las diferentes regiones; a partir de ellos se obtiene almidón, el cual es utilizado para hacer tapioca; se comen hervidos o se rebanan y se dejan secar al sol, para después hacer harina moliendo estos pedazos. En Africa Oriental se fermenta la pulpa por un período largo de tiempo; este alimento recibe el nombre de garri (tabla 1); en Nigeria existe un alimento conocido como foo-foo y otro como attieké, los cuales son elaborados también a base de yuca fermentada y en Indonesia el tape se consume de la misma manera.

Es posible obtener un promedio de 20-40 toneladas de tubérculos de yuca/hectárea (8-12 toneladas de materia seca/hectárea), pero su contenido proteínico es muy bajo, 3.5% de pro

teína cocida (Grace, 1971).

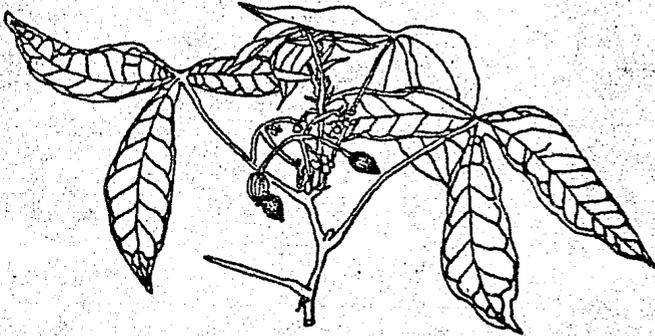
La composición de la harina de yuca es (Raimbault, 1980):

Agua residual	10%
Materia seca total	90%
Almidón	83%
Azúcares reductores	3%
Proteínas	2%
Lípidos	1%
Cenizas	1%

Debido a' hecho de que la yuca tiene un alto contenido de almidón y además de que se localiza en zonas geográficas donde las carencia proteínicas son graves (Raimbault, 1980), ha hecho que diferentes autores la hayan tomado como sustrato para la producción de proteínas por medio del crecimiento de hongos (Gregory, et al., 1977; Reade y Gregory, 1975, Raimbault y Alazard, 1980; Carrizales, et al., 1981; Hesseltine, 1972, entre otros).

El método de enriquecimiento de harina descrito por Raimbault (1981) consiste en cocinar la harina (con un contenido de humedad del 30-35%) a una temperatura de 70-80°C durante 10-15 min en una amasadora (de panadería) con agitación moderada. Después de enfriarse a 40°C, se mezcla con una solución salina (sulfato de amonio, urea y minerales) y 4×10^7 esporas

Manihot esculenta Crantz



PLANTA CON FLORES



TUBERCULOS

FIG. 3 La planta de yuca, *Manihot esculenta* Crantz.

de *Aspergillus niger* por gramo de materia seca hasta alcanzar un 50% de humedad en el sustrato. Al mezclar, el material se aglutina formando gránulos de 2-3 mm de diámetro, lo cual asegura una matriz favorable para el desarrollo del micelio y la aereación manteniendo su estructura incluso cuando el sustrato es reemplazado por el micelio.

III. OBJETIVOS

- Ampliar el conocimiento sobre el cultivo de bacterias lácticas en sustratos ricos en almidón para uso alimentario.
- Aprovechamiento de fermentaciones lácticas tradicionales para la conservación de alimentos.
- Aislamiento de cepas de bacterias lácticas a partir de fermentaciones tradicionales y vegetales frescos fermentados, con características para alta producción de ácido láctico en sustratos de almidón.
- Optimización de la fermentación de harina de yuca enriquecida por *Aspergillus niger*.
- Desarrollo de tecnología para la conservación de alimentos enriquecidos con proteína microbiana, almacenados en forma húmeda.

IV. MATERIALES Y METODOS

El trabajo fue realizado en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Gustavo Viniegra González de la U.A.M. Iztapalapa y del Dr. Maurice Raimbault de la ORSTOM y Dr. Miguel Ulloa del Instituto de Biología, por parte de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

1. Aislamiento de bacterias lácticas a partir de fermentaciones lácticas tradicionales y de vegetales frescos fermentados.

Para llevar a cabo el aislamiento de bacterias lácticas a partir de vegetales frescos fermentados, se prepararon tres mezclas que consistieron de: a) col; b) col y hojas de maíz; c) hojas de plátano.

Se picó el material vegetal añadiendo 2.5% de NaCl y se compactó dentro de frascos con tapa de rosca, ocupando las dos terceras partes de su capacidad, a estos frascos se les adaptó una válvula de Bunsen. Se sumergió el material en el jugo producido y se evacuó el aire bombeando CO₂. Se incubaron a 30-35°C. El pH inicial fue de 6.

Se tomaron muestras diariamente durante 12 días y se sem-

braron en cajas de petri en tres medios distintos: Rogosa SL Agar Difco), jugo de tomate-agar Difco) y medio LB (Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar 2%), mismas que se incubaron a 37°C.

A partir de las cajas inoculadas, se hicieron aislamientos utilizando los mismos medios pero preparados con una solución de azul de anilina saturada (200 mg/l) esterilizada (10 gotas/100 ml de medio gelosado). Las cepas que producen ácido se colorean de azul, de esta manera es fácil aislar las bacterias acidófilas para ser analizadas posteriormente.

Simultáneamente fueron aisladas cepas a partir de pozol (proporcionado por el Dr. Hermilo Leal, Div. de Est. Postgrado, Fac. Química, UNAM) y de tesguino (proporcionado por la M. en C. Patricia Lappe, Depto. Micología, Inst. Biol., UNAM), siguiendo el método anterior.

2. Selección de una cepa productora de ácido láctico y amilolítica.

Las cepas aisladas con características acidófilas (92) se sembraron en cajas de petri con un medio que contenía almidón como única fuente de carbohidratos (extracto de levadura 2.5g, triptona 5g, NaCl 2.5g, K_2HPO_4 2.5g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g, almidón 20g y agar 20 g/1000 ml H_2O). Para conocer la capaci-

dad de hidrólisis del almidón de las distintas cepas, las cajas se expusieron a vapores de yodo.

Se hicieron observaciones microscópicas y macroscópicas de las cepas aisladas. A partir del análisis de los resultados de las pruebas anteriores, se seleccionaron 17 cepas para conocer su producción de ácido láctico, esto último por medio de cromatografía de gases.

Método de medición de ácido láctico.- A cada una de las muestras se les agregaron 0.6 ml/5ml de muestra de una mezcla de ácido fórmico (al 25%) y ácido fosfórico (concentrado), en una proporción 3:1, para detener el metabolismo y poder conservar la muestra. Después se esterificó de la siguiente forma: a 1 ml de muestra se le agregaron 2 ml de metanol absoluto y 0.4 ml de ácido sulfúrico al 50%. Se incubó durante 1 hora a 55°C, se adicionó 1 ml de agua cuando ya estaba fría y se agitó. Se extrajo el ácido láctico esterificado agregando 1 ml de cloroformo agitando durante medio minuto.

Se tomaron 3 ml de la fase clorofórmica y se inyectaron en el cromatógrafo (Varian 1400) bajo las siguientes condiciones: flujos: H₂-20 seg/10 ml, N₂-50 seg/10 ml y aire 30 seg/10 ml. Temperatura inicial a 80°C y final a 130°C, inyector a 110°C y detector a 110°C.

3. Análisis de la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de harina de yuca a diferentes porcentajes de humedad.

La cepa seleccionada (no. 50), provenía de la mezcla de col y hoja de maíz, al séptimo día de incubación; es un *Lactobacillus* sp. que presenta una producción de ácido láctico de 3.35 g/l con un pH de 4.05, y que hidroliza almidón.

Para conocer la influencia del acondicionamiento del sustrato (harina de yuca) y los factores de crecimiento en la cantidad de ácido láctico producido por la cepa elegida, se inoculó ésta en matraces que contenían 100 ml de solución salina (K_2HPO_4 2.5 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 3 g/l y NaCl 2.5 g/l) y uno de los siguientes tratamientos:

- A. harina de yuca cocida.....1 g
- B. harina de yuca cocida.....1 g
extracto de levadura.....0.25 g
triptona.....0.25 g
- C. glucosa.....1 g
extracto de levadura.....0.25 g
triptona.....0.25 g
- D. harina de yuca enriquecida*.....1 g
- E. harina de yuca enriquecida*.....1 g
extracto de levadura.....0.25 g
triptona.....0.25 g

* Harina de yuca enriquecida (preparada en el proyecto de "Fermentación sólida de sustratos amiláceos en equipos a escala intermedia" realizado en el Laboratorio de Microbiología, UAM-Iztapalapa, bajo las siguientes condiciones: A 1 kg de harina de yuca cocida (30 min. a 15 lb/in²) con un contenido de humedad de 35%, congelada y secada, se le agregó una solución salina (NH₄)₂HPO₄, KH₂PO₄ y urea) con un inóculo de 2 X 10⁷ esporas de *Aspergillus niger*/gr de materia seca hasta alcanzar un 50% de humedad, con un pH de 3.2; se empacó en un fermentador estático vertical (diseñado por el Dr. Raimbault) a una densidad aparente mayor a 0.5 gr/cm³ y se incubó a 35°C durante 30 horas.

Dichos tratamientos se ajustaron a pH de 6.5. Las pruebas anteriores se hicieron por triplicado y el tratamiento C fue el grupo testigo. Se esterilizaron y se inocularon con la cepa 50, se incubaron a 37°C y se tomaron muestras dos veces al día durante 5 días; se midió el pH y la concentración de ácido láctico.

Para las pruebas posteriores, se utilizó como sustrato la harina de yuca enriquecida sin factores de crecimiento; se varió la concentración del sustrato de 10 g/l a 500 g/l para conocer el efecto del porcentaje de humedad en la producción de ácido láctico. Las experiencias fueron preparadas siguiendo

el mismo método de la prueba anterior y también se realizaron por triplicado. Se midió el pH y se tomaron muestras para medir el ácido láctico producido utilizando un cromatógrafo de gases.

4. Utilización del método de diseño experimental para el estudio y la optimización de la fermentación láctica de la harina de yuca previamente enriquecida en proteína por la fermentación en medio sólido con *Aspergillus niger*.

El método de diseño experimental fue adaptado de una simplificación del método de Box-Wilson. Esta nueva técnica de investigación permite optimizar un proceso más rápidamente y con menor número de experimentos, que el método clásico, donde se estudian las variables independientemente. Además como se varían los factores estudiados simultáneamente, considere las posibles interacciones de sinergismos o antagonismos entre los factores estudiados.

Este método utiliza un modelo matemático lineal del proceso y un diseño experimental preciso para calcular el coeficiente de importancia de cada factor estudiado, para lo cual es necesario identificar el proceso con una ecuación lineal del tipo siguiente:

$$R = F_0 + b_1(A) + b_2(B) + b_3(C) + \dots + b_i(I)$$

Donde:

R = dato de la medida

Fo = efecto residual de los otros parámetros que los estudiados (\bar{X})

$b_1 \dots b_i$ = coeficientes algebraicos de importancia específica de cada factor estudiado $b_i = \sum \frac{S_i X_i}{n}$

donde:

S_i = signo de la matriz

n = número de experiencias

A, B ... (I) = Factores cualitativos (+ o -) fijados a un nivel definido (o)

Para poder calcular los coeficientes de una ecuación con n variables es necesario tener n+1 ecuaciones, es decir n+1 experiencias, en las cuales se varíen todos los factores.

Para definir las condiciones para cada experiencia así como para el cálculo de los coeficientes, se utilizó el método matricial, elaborando una matriz cuadrada (nxn) con diagonal negativa y adición de una línea positiva.

Es necesario fijar un nivel (0) para cada factor que generalmente se basa en datos bibliográficos o en experiencias previas.

En el presente trabajo se utilizaron siete parámetros; los niveles y amplitudes de variaciones fueron fijados de acuerdo

a los datos de la literatura y de laboratorio citados por Viniegra González y Gómez (1981), con respecto a la técnica de ensilaje de los forrajes. Los factores estudiados se indican en la TABLA 2.

TABLA 2

VALOR DEL NIVEL SUPERIOR E INFERIOR DADO PARA LOS DIFERENTES FACTORES ESTUDIADOS.		
FACTORES	Nivel +	Nivel -
A. HUMEDAD (% de materia seca)	80%	65%
B. INOCULO de cepa de bacteria láctica	si	no
C. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (control de pH inicial=6.5)	si	no
D. TEMPERATURA	37°C	20°C
E. MELAZA (carbohidratos fermentables)	si (10g)	no
F. UREA (C/N)	si (10g)	no
G. CELULOSA (carbohidratos fermentables/fibras crudas)	si (10g)	no

Para resolver el problema se realizaron ocho experiencias utilizando la matriz (7x8) de la forma siguiente:

(ver TABLA 3).

TABLA 3

MATRIZ DE 7X8 CON DIAGONAL NEGATIVA Y ADICION DE UNA LINEA POSITIVA, QUE INDICA EL NIVEL SUPERIOR O INFERIOR PARA CADA FACTOR A,B, C,... (ver TABLA 2)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-	+	-	+	-	+	-	+
B	-	-	+	+	-	-	+	+
C	+	-	-	+	+	-	-	+
D	-	-	-	-	+	+	+	+
E	+	+	-	-	-	+	-	+
F	-	+	+	-	-	-	+	+
G	+	-	+	-	+	-	-	+

De la matriz anterior, se sacaron las condiciones para cada una de las experiencias, quedando como se indica en la TABLA 4.

Tomando los datos de la tabla, se prepararon los medios para cada una de las experiencias y se repartieron equitativamente en cinco bolsitas de plástico, a las cuales se les evacuó el aire; se cerraron herméticamente y se incubaron a la temperatura adecuada.

A los 7 días de incubación, se diluyó el contenido de las bolsitas en 500 ml de agua y se homogenizó con una licuadora

TABLA 4

CONDICIONES DE LOS DIFERENTES FACTORES PARA CADA UNO DE LOS OCHO TRATAMIENTOS

TRATAMIENTO FACTOR	1	2	3	4	5	6	7	8
HARINA ENRIQUECIDA	100 g							
UREA	0	10 g	10 g	0	0	0	10 g	10 g
CELULOSA	10 g	0	10 g	0	10 g	0	0	10 g
MELAZA	10 g	10 g	0	0	0	10 g	0	10 g
INOCULO	0	0	10ml	10ml	0	0	10ml	10ml
Ca (OH) ₂	2 g	0	0	2 g	2 g	0	0	2 g
AGUA	241ml	480ml	213ml	430ml	223ml	440ml	196ml	550ml
INCUBACION	20°C	20°C	20°C	20°C	37°C	37°C	37°C	37°C

durante 50-60 seg a partir de cada dilución; se tomaron tres muestras y se realizaron dos análisis para cada una. Se midieron el pH, y el ácido láctico, posteriormente se realizó un análisis estadístico para conocer la validez de los datos.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se presentarán de acuerdo al orden en que se

realizó la parte experimental.

1. Aislamiento de bacterias lácticas a partir de fermentaciones lácticas tradicionales y de vegetales frescos fermentados.

Los resultados de esta parte experimental se resumen en la TABLA 7 donde se presentan las características de las cepas aisladas mencionando su fuente de origen, producción de ácido láctico, crecimiento sobre medio de almidón, pH y el género al que pertenecen. Puede verse que existe una fuerte relación entre el valor del pH y el ácido láctico producido y que un 46.7% de las cepas presentan capacidad de crecimiento sobre el medio de almidón.

El porcentaje de presencia de cada género es el siguiente:

TABLA 5

PORCENTAJE DE LOS ORGANISMOS AISLADOS A PARTIR DE POZOL, TESHUINO Y VEGETALES FRESCOS FERMENTADOS

<i>Lactobacillus</i>	54.34%
<i>Leuconostoc</i>	11.95%
<i>Pediococcus</i>	7.6 %
<i>Streptococcus</i>	5.43%
Levaduras	5.43%
Otros	15.21%

También podemos calcular que un 70% de los géneros encontrados en el sustrato de col, pertenecen al género *Lactobacillus*, mientras que en el pozol sólo se da un 38.9%.

En cuanto a la capacidad de crecimiento sobre medio de almidón, aún es necesario realizar más pruebas variando las características del medio, es decir, inocular a los organismos en medio rico y medio pobre de almidón para poder afirmar si existe o no una verdadera capacidad de hidrólisis de éste.

La mayor cantidad de ácido láctico producido corresponde a la cepa 90 (*Lactobacillus*) con una producción de 5.58 g/l y con un pH de 3.7, pero no presenta crecimiento en medio de almidón.

En total se aislaron 92 cepas a partir de los diferentes sustratos, las cuales son analizadas en el Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa y pasarán a formar parte de un cepario para dicho departamento.

2. Selección de una cepa productora de ácido láctico y amilolítica.

La cepa seleccionada fue la No. 50 (*Lactobacillus* sp., TABLA 7), la cual provenía de la mezcla de col y hoja de maíz; su producción de ácido láctico es de 3.35 g/l y el pH es de 4.05, presentando crecimiento en medio de almidón.

Al referirnos a la TABLA 7, podemos observar que existen cepas con mayor producción de ácido láctico y que tal vez tengan mejores características que la seleccionada, pero inicialmente se realizaron observaciones al microscopio a partir de las cuales se seleccionaron 17 cepas para su análisis de producción de ácido láctico, crecimiento en medio de almidón y el pH; dentro de estas cepas, la No. 50 presentaba las características necesarias para continuar con la siguiente fase del trabajo, por lo cual fue elegida y las restantes seguirán siendo analizadas en el laboratorio para usos posteriores.

3. Análisis de la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de yuca a diferentes porcentajes de humedad.

a) Efecto del acondicionamiento de la harina de yuca.

En la TABLA 8 se reportan los resultados de las fermentaciones de harina de yuca bajo diferentes condiciones, de las cuales podemos decir que:

- i) el pH tiende a bajar conforme pasa el tiempo en todos los casos y en un término de dos días se alcanza el pH final.
- ii) después de dos o tres días la fermentación láctica es avanzada.

En la figura 4, A y B correspondientes a dicha tabla, se

observa que en todos los casos es posible obtener ácido láctico, pero el grupo testigo (C = glucosa 10g/l + 2.5 g/l de extracto de levadura + 2.5 g/l de triptona), es el que presenta la más alta producción (3.28 g/l) siguiéndole el de yuca enriquecida (10g/l) + extracto de levadura (2.5 g/l) + triptona (2.5 g/l).

Comparando la producción de ácido láctico entre la muestra con sustrato de harina de yuca sin enriquecer con aquella enriquecida, se puede observar que en el segundo caso existe mayor producción de ácido láctico, lo cual se puede atribuir a dos hechos:

- i) La relación de C/N es diferente para cada caso, es decir, la harina sin enriquecer presenta un C/N muy alto (115.43) y en la harina de yuca enriquecida debido al tratamiento para su fermentación con *Aspergillus niger*, el C/N baja hasta un 10.12 de tal manera que se encuentra dentro del rango (C/N 30) en el cual se favorece la fermentación láctica.
- ii) En la harina de yuca enriquecida existe una hidrólisis del almidón llevada a cabo por *Aspergillus niger* durante la fermentación de ésta para su enriquecimiento; esto hace que en este sustrato exista mayor disponibilidad de azúcares libres y también un alto nivel de amilasas, al contrario de lo que ocurre en la harina sin enriquecer.

Es importante hacer notar que en ambos casos (yuca enriquecida y sin enriquecer) es posible obtener ácido láctico y que en el caso de la yuca enriquecida, la presencia de micelio del *Aspergillus niger* no es un factor que llegue a limitar esta fermentación y, además, no inhibe el crecimiento de las bacterias lácticas de ninguna manera.

b) Influencia de la concentración del sustrato en la producción de ácido láctico.

En la TABLA 9 se muestran los resultados de la fase experimental en la cual se pretende conocer la influencia de la concentración de la harina de yuca (en este caso harina de yuca enriquecida) en la producción de ácido láctico. Como se puede observar, la mayor concentración (200 g/l) corresponde a un porcentaje de humedad de 83.44%, lo cual nos dice que en todos los casos se realizó una fermentación en medio líquido.

En la figura 5.A, la gráfica de cinética de fermentaciones correspondiente a dicha tabla, nos indica que la velocidad inicial para todos los casos es muy alta y que la fermentación no está terminada a las 142 horas, mientras que en la figura 5.B, (ácido láctico vs. concentración de yuca), también podemos observar que la producción de ácido láctico tiende a subir conforme aumenta la concentración del sustrato y que no se alcanzó el nivel máximo de concentración de sustrato para

la producción de ácido láctico.

Estas dos observaciones nos condujeron a incrementar el tiempo de la fermentación hasta 860 horas y también a aumentar la concentración del sustrato hasta 500 g/l. Los resultados obtenidos al realizar lo anterior, se reportan en la TABLA 10, de la cual podemos observar que el pH baja (desde pH= 6.5) en un lapso de 24 horas y que se mantiene alrededor de 3.4 a lo largo de la fermentación en todos los casos.

En la figura 6 (gráficas A,B,C,D,E) se llega a la misma observación hecha para la gráfica B de la figura 5 con respecto a la velocidad inicial, es decir que la producción de ácido láctico es muy rápida en las primeras 24 horas.

c) Cinética de la fermentación láctica a diferentes concentraciones de la harina de yuca enriquecida.

Para calcular el valor de producción máxima de ácido láctico, es posible ajustar a una curva para cada una de las fermentaciones a las diferentes concentraciones de sustrato la cual cumple con la siguiente ecuación:

$$P_L = \frac{P_{\max} t}{K + t}$$

donde:

P_L = producción de ácido láctico

P_{\max} = producción máxima

t = tiempo

K = constante

Si invertimos la ecuación y graficamos los inversos de P_L y t obtenemos una recta que cumple con la ecuación invertida:

$$\frac{1}{P_L} = \frac{K}{P_{\max}} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{P_{\max}}$$

de donde se pueden obtener los valores de P_{\max} y K ; de esta manera, en la figura 7, A - D se reportan los valores de P_{\max} para cada concentración y su ecuación correspondiente.

El valor máximo de producción de ácido láctico es de 23.474 g/l y corresponde a la concentración de 500 g/l la cual corresponde a un 66.67% de humedad (medio sólido).

En la TABLA 11 se reportan los resultados de los cálculos de las ecuaciones lineales de las gráficas de los inversos de producción de ácido láctico contra el inverso del tiempo, desde una concentración de 10 g/l hasta 500 g/l, reportándose los coeficientes de correlación correspondientes a cada concentración, así como el error estándar, del cual se puede obtener matemáticamente que el error de esos cálculos es generalmente inferior al 20%, lo que es aceptable para este tipo de evaluaciones; para el último punto (500 g/l) el error fue próximo al 100%, si eliminamos entonces este punto, el máximo valor de producción de ácido láctico sería de 14.45 g/l.

Se menciona también la producción máxima de ácido láctico para cada concentración y los rendimientos, tanto con base en la concentración de harina de yuca, como con base en la concentración de carbohidratos presentes en ésta (rendimiento neto). Se puede decir que si bien la cantidad de ácido láctico presente en los ensilajes aumenta conforme se incrementa la concentración de harina, el rendimiento de transformación de azúcar en ácido láctico decrece, la gráfica de la figura 8 lo demuestra.

- d) Utilización de la ecuación de Monod y la ecuación de cinética de inhibición por sustrato para la obtención de una ecuación general de la cinética de la fermentación láctica de la harina de yuca.

La figura 9. representa la velocidad inicial de formación de ácido láctico (estimada como la cantidad de ácido láctico al término de 24 horas en g/l) contra la concentración de harina de yuca. La curva resultante, presenta un punto máximo de velocidad inicial, lo cual indica que debe de existir un óptimo en función de la concentración de la harina de yuca. Para determinar ese punto, se utilizaron cálculos matemáticos de ajuste polinomial. Los datos experimentales se ajustan bien a una curva de tercer grado ($R= 0.9961$) y la

ecuación correspondiente nos indica que la concentración óptima para la producción de ácido láctico fue de 341.5 g/l de harina de yuca enriquecida (% de humedad = 74.5%).

Esta gráfica presenta una cinética del tipo de inhibición por sustrato propuesta para actividad enzimática por Dixon & Webb, 1977 (tomado de Pirt, 1975) que cumple con la ecuación:

$$q = \frac{q_{\max} S}{K_s + S + S^2/K_i}$$

donde:

q = velocidad de formación del producto

q_{\max} = velocidad máxima de formación del producto

S = concentración de sustrato

K_s = constante de afinidad por el sustrato

K_i = constante de inhibición

Invirtiendo la ecuación y multiplicando por S , tenemos que:

$$\frac{S}{q} = \frac{K_s + S + S^2/K_i}{q_{\max}}$$

Reordenando:

$$\frac{S}{q} = \frac{K_s}{q_{\max}} + \frac{1}{q_{\max}} \cdot S + \frac{1}{q_{\max} K_i}$$

Al efectuar el ajuste polinomial de los datos experimentales de acuerdo a esta ecuación, se obtiene un coeficiente de correlación de 0.8863, lo cual no es aceptable.

Si graficamos $\frac{S}{q}$ vs. S con los datos experimentales, se observa que efectivamente no corresponden bien a una curva polinomial de 2º; sino que obtenemos una recta (ver figura 10) lo que cumple con la ecuación de Monod y no a la anterior. De la ecuación de Monod:

$$q = \frac{q_{\max} S}{K_s + S}$$

Se obtiene la ecuación lineal:

$$\frac{S}{q} = \frac{K_s}{q_{\max}} + \frac{1}{q_{\max}} S$$

Graficando los datos experimentales y realizando un ajuste lineal se obtiene la ecuación:

$$\frac{S}{q} = 14.25 + 0.081 S$$

$R = 0.9616$, de donde se pueden obtener los valores de $q_{\max} = 12.20 \text{ g/l} \cdot \text{día}$ y de $K_s = 186.08$

Este valor de K_s es bastante grande en comparación con los valores reportados en la literatura. Es importante ha

cer notar que no nos estamos refiriendo a una cinética enzimática, sino a una fermentación láctica y, además que este dato concuerda con otros resultados obtenidos por Viniestra, Gómez y Saucedo (comunicación personal) al hacer uso de la misma ecuación para cinéticas lácticas en medio líquido.

A partir de las observaciones anteriores se puede decir que para concentraciones bajas el proceso se cumple con el modelo de Monod y que para concentraciones altas (alrededor de 450 g/l de harina) se ajusta mejor el modelo de inhibición por sustrato.

4. Utilización del método de diseño experimental para el estudio y la optimización de la fermentación láctica de la harina de yuca enriquecida en proteína por la fermentación en medio sólido con *Aspergillus niger*.

En esta etapa, se estudió la influencia de la humedad, de la temperatura, adición de Ca(OH)_2 , inoculación con la cepa No. 50 y adición de melaza, urea y celulosa.

Los resultados son resumidos en la TABLA 12; como se puede observar, los valores de la variación del pH concuerdan con los valores de ácido láctico presente en cada experimento. En general las bolsas presentaban un inflamiento debido

a la producción de gas durante la fermentación, a excepción de las bolsas de las experiencias 2 y 7, lo cual se entiende al ver los resultados de producción de ácido láctico, ya que en ninguno de los dos casos se llevó a cabo una fermentación láctica (ver TABLA 12). A dichos resultados se les hizo un análisis estadístico (TABLA 14), en los cuales se comprobó que sí existe una diferencia significativa entre las diferentes pruebas y que los datos se encuentran dentro del rango de confiabilidad del 95%.

A partir de esos datos, se calcularon los coeficientes correspondientes a cada factor, los cuales son reportados en la TABLA 13. Así se obtiene la ecuación del modelo experimental para cada parámetro estimado; las ecuaciones resultantes son de la siguiente forma:

Para pH inicial:

$$R = 5.237 + 0.05 (\text{humedad}) - 0.05 (\text{inóculo}) + 1.26 \\ (\text{Ca(OH)}_2) - 0.01 (\text{temperatura}) + 0.05 (\text{melaza}) - \\ 0.65 (\text{urea}) + 0.61 (\text{celulosa}).$$

Para pH final:

$$R = 4.26 + 0.21 (\text{humedad}) - 0.43 (\text{inóculo}) - 0.41 \\ (\text{Ca(OH)}_2) - 0.56 (\text{temperatura}) + 0.35 (\text{melaza}) \\ + 0.47 (\text{urea}) - 0.23 (\text{celulosa}).$$

Para producción de ácido láctico:

$$R = 1.48 + 0.41 (\text{humedad}) + 0.56 (\text{inóculo}) + 1.19 (\text{Ca(OH)}_2) + 0.12 (\text{temperatura}) - 0.10 (\text{melaza}) - 0.26 (\text{urea}) + 0.58 (\text{celulosa}).$$

Analizando esta última ecuación (tercera columna, TABLA 13) se puede estructurar la siguiente tabla en la cual se mencionan los factores de influencia positiva y los de influencia negativa sobre la producción de ácido láctico en los ensilajes de harina de yuca enriquecida.

TABLA 6

INFLUENCIA DE LOS FACTORES ESTUDIADOS EN LA FERMENTACION LACTICA Y SUS PORCENTAJES DE IMPORTANCIA

Factores positivos	%de impor- tancia	factores negativos	%de impor- tancia
Ca(OH)	80%	urea	17.56%
celulosa	39.2%	melaza	6.0%
inóculo	38%		
humedad	27%		
temperatura	8%		

Como se puede ver la fijación del pH inicial a un 6.5 por medio de la adición de Ca(OH)_2 es de gran importancia y de-

terminante para que se lleve a cabo una fermentación láctica. La importancia de la utilización de celulosa se puede deber a que proporcione una estructura de soporte para la fijación de bacterias lácticas así como a los granos de almidón. El inóculo, presenta un porcentaje de importancia muy similar al de la celulosa e indica que sí es favorable usar inóculos de bacterias lácticas para ensilar la harina de yuca enriquecida.

Aunque la temperatura no presenta una fuerte influencia, su control tiene un efecto positivo lógico. Su baja influencia es favorable a la aplicación de ensilajes prácticos sin necesidad de regular la temperatura con mucha precisión, ya que el rango es amplio (20°C-37°C).

El factor negativo urea, produce un efecto de alcalinidad debido a su hidrólisis en amoníaco, lo que desfavorece la iniciación de la fermentación láctica.

La influencia negativa de la melaza puede ser debida al incremento del C/N y también puede favorecer otros factores no lácticos.

Los resultados obtenidos a partir de esta última fase experimental nos proporcionan los datos necesarios para poder establecer los niveles positivos y negativos en la realización de subsecuentes experimentos, en los cuales se po-

drá conocer con mayor exactitud la importancia de los diferentes factores estudiados, ya que este trabajo fue de caracter preliminar.

TABLA 7

CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS A PARTIR DEL POZOL,
TESGUINO Y VEGETALES FRESCOS FERMENTADOS

CEPA	GENERO	FUENTE	PRODUCCION DE ACIDO LACTICO (g/l)	pH	CRECIMIENTO EN SUSTRATO DE AL MIDON
94	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	0	7.35	-
37	<i>Pediococcus</i>	col+hoja de maiz	0	7.0	+ ?
111	<i>Lactobacillus</i>	col	0	6.95	-
86	Levadura	hoja de plátano	0	6.95	
87	Levadura	hoja de platano	0	6.9	-
68	<i>Leuconostoc</i>	col+hoja de maiz	0	6.9	-
80	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	0	6.9	-
39	<i>Pediococcus</i>	col+hoja de maiz	0	6.9	
102	?	col+hoja de maiz	0	6.5	-
112	<i>Lactobacillus</i>	col	0	6.4	+
9 pz	<i>Leuconostoc</i>	pozol	0.22	3.65	-
51-A	Levadura	hoja de plátano	0.25	6.95	-
2 pz	<i>Leuconostoc</i>	pozol	0.31	6.45	-
43	<i>Lactobacillus</i>	col	0.34	6.9	-
47	?	col	0.35	6.6	

Continuación TABLA 7

16 pz	<i>Lactobacillus</i>	pozol	0.37	6.6	+
109	?	col+hoja de maiz	0.37	6.55	-
29	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	0.4	6.45	-
10 pz	<i>Lactobacillus</i>	pozol	0.42	6.4	-
30	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	0.44	6.55	-
16	<i>Lactobacillus</i>	col	0.47	6.7	-
15	<i>Lactobacillus</i>	col	0.48	6.65	-
13	<i>Lactobacillus</i>	col	0.51	6.50	-
23-1	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	0.53	6.65	-
21	<i>Lactobacillus</i>	col	0.54	6.65	-
2 pl	?	tesglino	0.57		+
51	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	0.58	6.25	+ ?
78	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	0.64	6.95	-
100	Levadura	hoja de plátano	0.73	6.95	
8 pz	<i>Leuconostoc</i>	pozol	0.73	4.15	+
46	?	col+hoja de maiz	0.93	6.45	+
44	<i>Lactobacillus</i>	col	0.93	4.25	-
114	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	1.08	4.0	+
14 pz	?	pozol	1.09	4.15	

Continuación TABLA 7

115	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	1.18	4.4	+
103	?	col+hoja de maiz	1.38	7.5	+
79	Levadura	col+hoja de maiz	1.49	6.0	-
85	<i>Streptococcus</i>	hoja de plátano	1.5	4.85	+
12 pz	?	pozol	1.52	3.75	+
3 pz	<i>Lactobacillus</i>	pozol	1.55	4.56	+
18 pz	?	pozol	1.69	4.25	-
12 (2)	<i>Leuconostoc</i>	col	1.705	4.70	+
70	<i>Leuconostoc</i>	col	1.72	3.95	-
117	<i>Lactobacillus</i>	col	1.88	3.9	+
110	<i>Streptococcus</i>	col	1.92	7.0	-
108	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	1.92	5.55	-
71	<i>Lactobacillus</i>	col	1.98	3.95	-
1 pz	<i>Lactobacillus</i>	pozol	2.03	4.15	+
46-A	?	col+hoja de maiz	2.04	3.3	+
24 pz	?	pozol	2.05	4.3	
12 (1A) pl	?	tesguino	2.27		+
63	<i>Lactobacillus</i>	col	2.29	4.35	+
50-A	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	2.37	4.2	

Continuación TABLA 7

65-A	<i>Lactobacillus</i>	col	2.41	4.35	+
67	<i>Leuconostoc</i>	hoja de plátano	2.41	4.25	-
19 pz	<i>Lactobacillus</i>	pozol	2.43	3.95	+
7 pz	<i>Leuconostoc</i>	pozol	2.51	3.65	+
23 pz	<i>Streptococcus</i>	pozol	2.61	4.25	+
18	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	2.65	4.2	+
67-A	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	2.75	4.25	-
22 pz	<i>Lactobacillus</i>	pozol	2.78	4.0	-
116	<i>Lactobacillus</i>	col	2.82	3.9	+
42	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	2.87	4.25	+ ?
25 pz	?	pozol	2.87	3.85	+
17	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	2.88	4.2	+
65	<i>Leuconostoc</i>	col	2.94	4.2	-
22-2	<i>Lactobacillus</i>	col	2.96	3.75	-
73	<i>Lactobacillus</i>	col	2.98	4.15	+
66-B	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	3.04	4.05	-
33	<i>Pediococcus</i>	col	3.08	4.2	+
77	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	3.13	4.1	+
72	<i>Lactobacillus</i>	col	3.14	4.15	-

Continuación TABLA 7

26	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	3.24	4.2	+
66	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	3.25	4.1	+
14	<i>Lactobacillus</i>	col	3.28	4.1	+
31	<i>Pediococcus</i>	hoja de plátano	3.35	4.1	+
50	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	3.35	4.05	+
25	<i>Streptococcus</i>	col	3.44	4.1	-
32	<i>Lactobacillus</i>	hoja de plátano	3.48	4.1	-
12	<i>Leuconostoc</i>	col	3.59	3.95	-
28	<i>Lactobacillus</i>	col	3.63	4.0	+
15 pz	?	pozol	3.65	3.55	
84	<i>Pediococcus</i>	hoja de plátano	3.67	4.0	-
75	<i>Leuconostoc</i>	col+hoja de maiz	3.68	4.05	+
88	<i>Lactobacillus</i>	col+hoja de maiz	3.91	3.95	+
92	<i>Streptococcus</i>	col	3.93	4.2	-
28-A	<i>Lactobacillus</i>	col	3.99	3.95	+
81	<i>Pediococcus</i>	hoja de plátano	4.14	3.95	+
95	<i>Lactobacillus</i>	col	4.23	4.0	+
96	<i>Pediococcus</i>	col+hoja de maiz	4.51	3.9	-
90	<i>Lactobacillus</i>	col	5.58	3.7	-
21 pz	<i>Lactobacillus</i>	pozol	N.D.	4.05	+

TABLA 8

EFFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO DEL SUSTRATO
(HARINA DE YUCA) PARA SU FERMENTACION LACTICA.

tiempo (hrs.)	A		B		C		D		E	
	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)
21.25	6.3±0.1	0	5.25±1	0.2714	6.25±0	0	6.1±0.1	0	5.6±0.3	0
45.5	4.9±0.3	0.0857	4.7±0.1	0.4297	4.7±0.3	0.4578	4.7±0.3	0.2317	5.1±0.1	0.359
70.0	4.81±1.1	0.3584	4.7±0.3	0.6669	3.92±0.14	0.7080	4.25±0.07	0.3511	4.65±0.07	0.3683
94.0	4.13±0.4	0.4929	4.72±0.8	0.5677	3.72±0.1	2.7949	4.4±0.35	0.7401	4.48±0.04	1.0664
119.5	4.2±0.14	0.8305	4.7±0.1	0.9345	3.53±0.12	3.2864	4.0±0	0.8644	4.45±0.07	1.0902

A = yuca 10 g/l

B = yuca 10 g/l + ext. lev. 2.5 g/l + triptona 2.5 g/l

C = glucosa 10 g/l + ext. lev. 2.5 g/l + triptona 2.5 g/l

D = yuca enriquecida 10 g/l

E = yuca enriquecida 10 g/l + ext. lev. 2.5 g/l + triptona 2.5 g/l

102

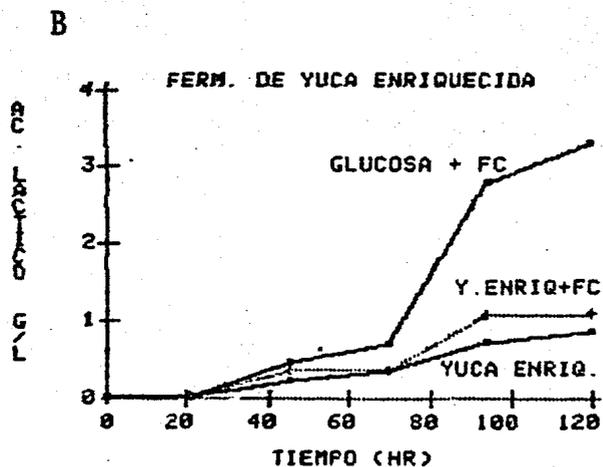
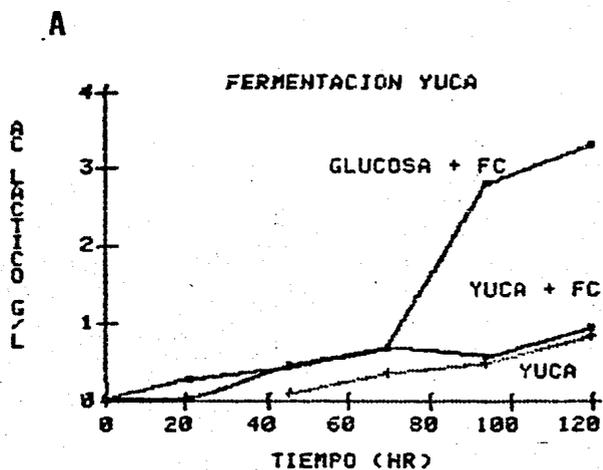


FIG. 4. Gráficas de la fermentación láctica de la harina de yuca:

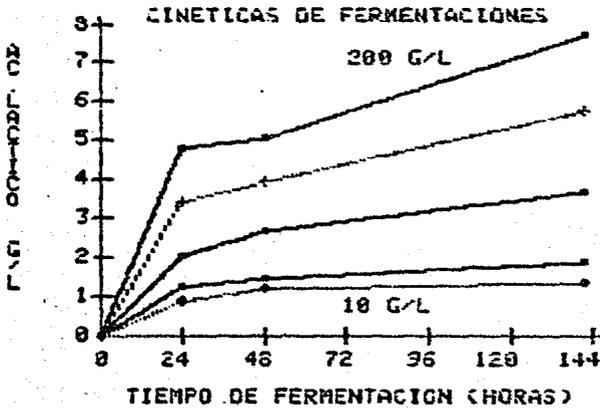
A = Harina cocida

B = Harina enriquecida

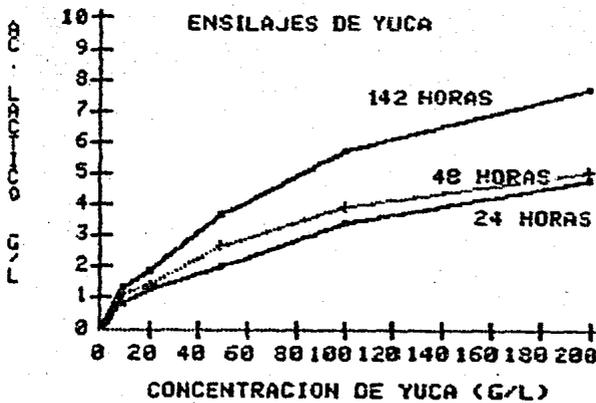
TABLA 9

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA HARINA DE YUCA ENRIQUECIDA (g/l) EN LA PRODUCCION DE ACIDO LACTICO (g/l).

CONCENTRACION DE HARINA DE YUCA ENRIQUECIDA										
tiempo (hrs.)	10 g/l		20 g/l		50 g/l		100 g/l		200 g/l	
	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)	pH	ácido láctico (g/l)
23.5	3.9	0.86	3.95	1.2697	4.05	2.0482	4.2	3.4405	4.25	4.8175
48.0	3.85	1.1914	3.9	1.4410	4.0	2.6588	4.15	3.9518	4.25	5.0653
142.0	3.9	1.3327	3.9	1.8702	3.9	3.6838	4.0	5.7326	4.2	7.7009



A



B

FIG. 5. Gráficas de la fermentación láctica de la harina de yuca enriquecida.

A. Cinéticas de fermentaciones a diferentes concentraciones de sustratos (g/l).

B. Producción de ácido láctico a diferentes tiempos variando la concentración del sustrato.

TABLA 10

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA
HARINA DE YUCA ENRIQUECIDA (g/l) EN LA PRODUCCION DE ACIDO LACTICO (g/l).

CONCENTRACION DE HARINA DE YUCA ENRIQUECIDA										
tiempo (hrs.)	100 g/l		200 g/l		300 g/l		400 g/l		500 g/l	
	pH	ácido láctico (g/l)								
24.0	3.6	4.563	3.7	7.113	3.7	8.47	3.8	8.07	3.9	4.6
66.83	3.5	4.448	3.4	8.43	3.4	10.92	3.5	13.33	3.5	13.98
113.83	3.5	6.665	3.5	10.18	3.5	9.44	3.6	11.68	3.6	16.02
332.33	3.4	7.36	3.4	10.75	3.4	12.56	3.5	13.77	3.5	22.38
501.08	3.4	8.46	3.4	10.12	3.4	13.74	3.4	12.62	3.4	14.27
716.08	3.5	7.11	3.4	8.8	3.4	12.63	3.4	8.54	3.4	18.32
860.08	3.5	N.D.*	3.4	N.D.*	3.4	10.51	3.4	N.D.*	3.4	15.96

* N.D. = No determinado

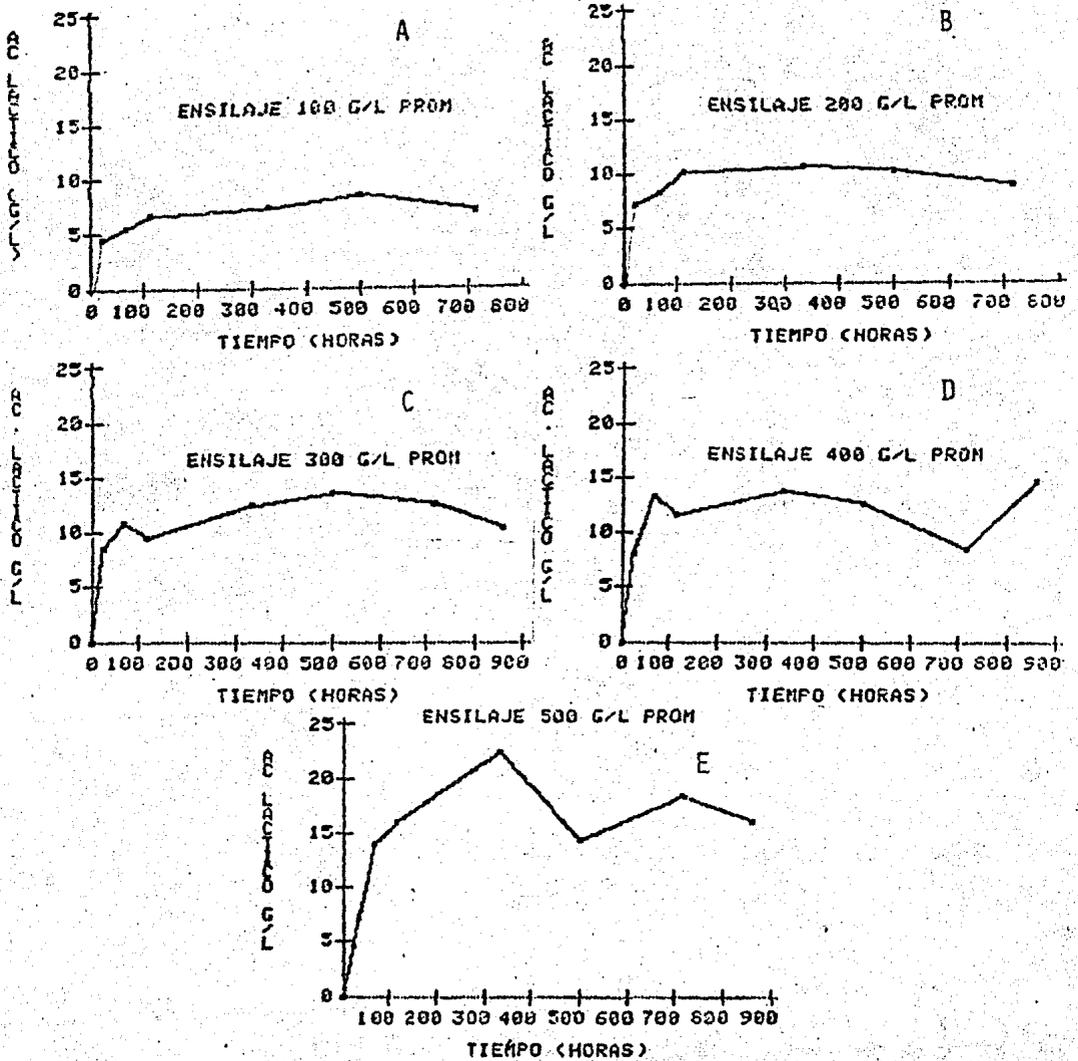


FIG. 6 Influencia de la concentración de la harina de yuca (100 a 500 g/l) en la fermentación láctica.

TABLA 11

RESULTADOS OBTENIDOS DE CALCULOS A PARTIR DE LAS TABLAS 9,10

PARA LAS ECUACIONES LINEALES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HARINA DE YUCA.

Concentración de harina de yuca (g/l)	Y	R	σ	Producción máxima de ac. lac.g/l	Rendimiento porcentual de harina	Rendimiento neto
10	0.6378 + 11.92X	0.982	0.0575	1.568	15.68	32.76
20	0.5108 + 6.879X	0.962	0.049	1.958	9.78	20.44
50	0.2373 + 6.026X	0.994	0.0166	4.214	8.43	17.62
100	0.1656 + 3.15X	0.947	0.027	6.039	6.039	12.62
100'	0.1299 + 2.260X	0.956	0.012	7.698	7.698	16.09
200	0.1305 + 2.036X	0.862	0.030	7.660	3.83	8.00
200'	0.0981 + 1.0X	0.877	0.094	10.19	5.10	10.66
300	0.0821 + 0.882X	0.796	0.010	12.173	4.06	8.36
400	0.0692 + 1.218X	0.935	0.0079	14.45	3.61	7.54
500	0.0426 + 3.883X	0.952	0.020	23.474	4.70	9.82

Y= 1/ac. láctico,

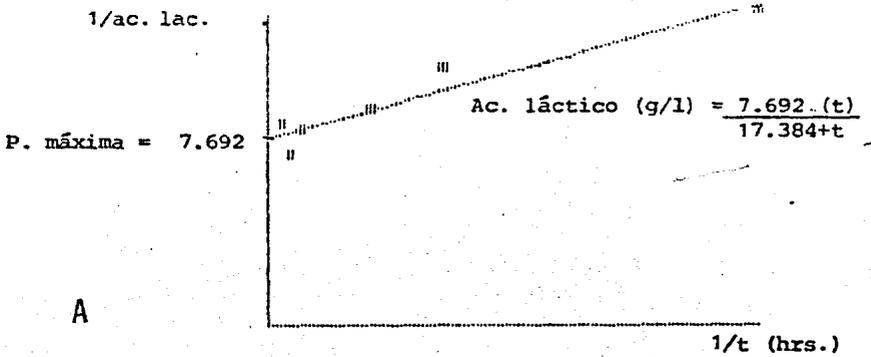
R= coeficiente de correlación

σ = error estandar

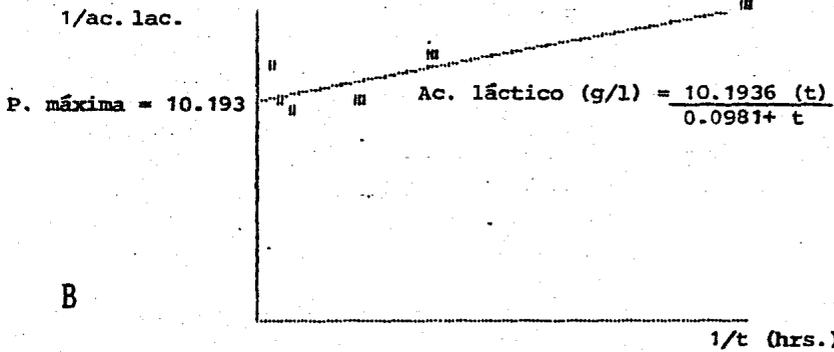
1
83
1

FIGURA 7

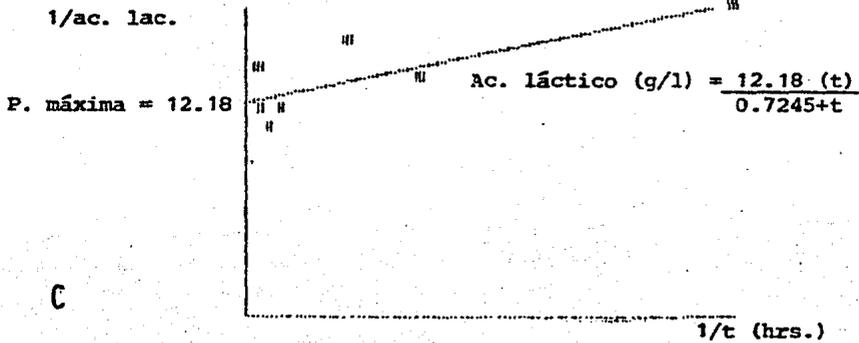
100 g/l de Harina de Yuca Enriquecida



200 g/ l de Harina de Yuca Enriquecida



300 g/l de Harina de Yuca Enriquecida



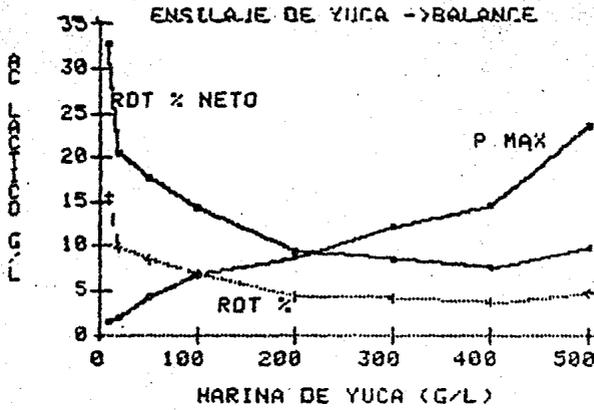
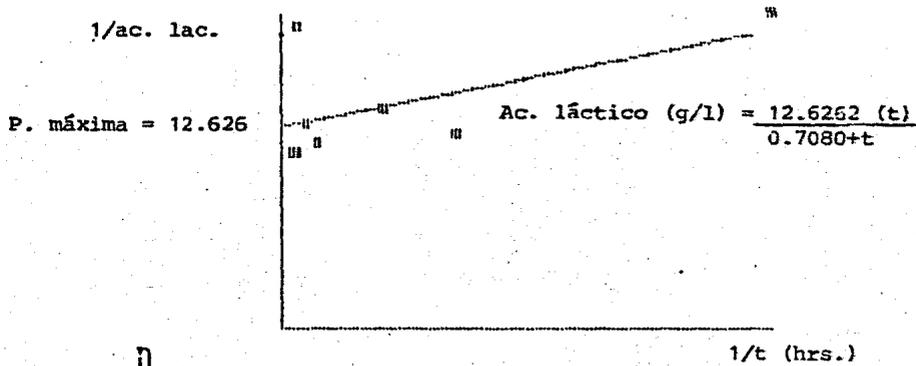


FIG. 8

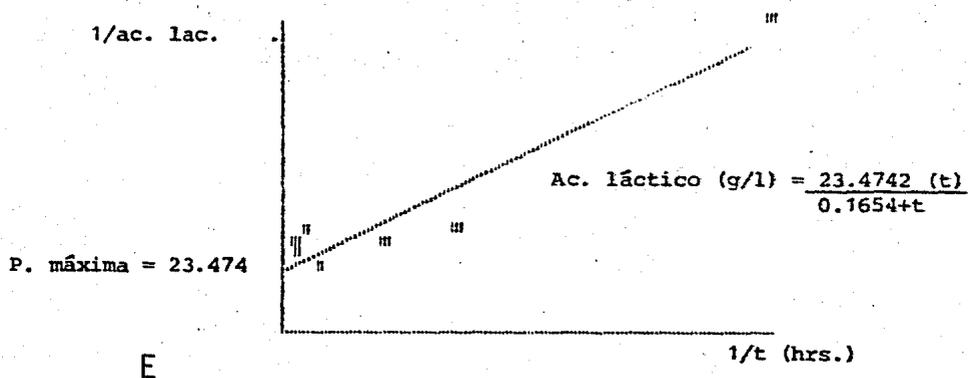
Gráfica de los rendimientos porcentuales de la fermentación láctica de la harina de yuca (g/l) y la producción máxima de ácido láctico a diferentes concentraciones

FIGURA 7 (CONTINUACIÓN)

400 g/l de Harina de Yuca Enriquecida



500 g/l de Harina de Yuca Enriquecida



Gráficas de las ecuaciones lineales de las cinéticas de fermentaciones (ver Tabla 11)

A: 100 g/l B: 200 g/l C: 300 g/l D: 400 g/l

E: 500 g/l

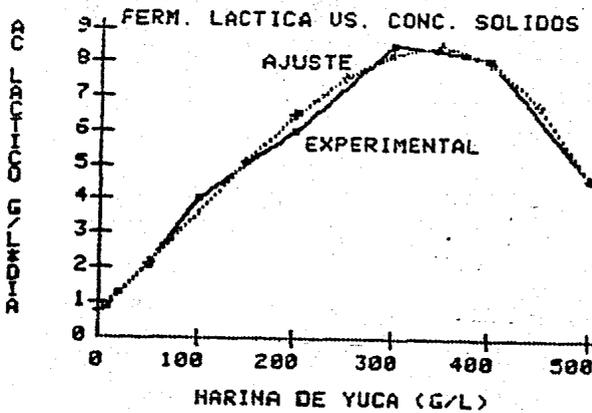


Fig. 9

Gráfica de la velocidad inicial de la fermentación láctica a diferentes concentraciones de harina de yuca; con ajuste polinomial de tercer grado.

Ecuación:

$$q = .73 + .02 S + 5.3 \times 10^{-5} S^2 - 1.7 \times 10^{-7} S^3$$

R = .9961

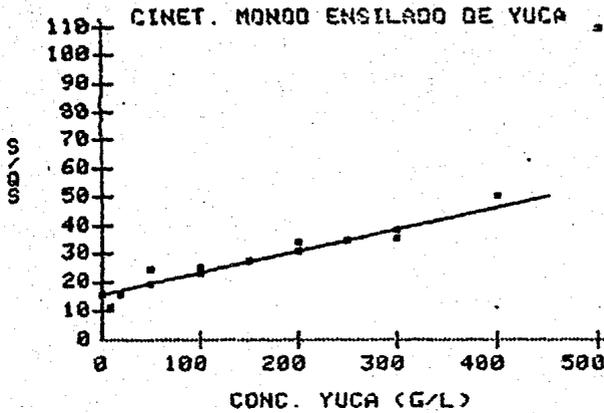


Fig. 10

Gráfica del ajuste de primer orden y datos experimentales de S/Q vs. S , por medio de la cual se puede calcular:

$$q_{\max} = 12.20 \text{ g/l} \cdot \text{día}$$

$$K_s = 186.08$$

TABLA 12

RESULTADOS DE LA OPTIMIZACION DE LA FERMENTACION LACTICA POR MEDIO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL (TIPO BOX-WILSON) CON SU MATRIZ CORRESPONDIENTE

	A*	B	C	D	E	F	G	pH inicial	pH final	Δ pH	ácido láctico final (g/l)	
1	-	-	+	-	+	-	+	6.5	4.15	0.03	-2.3	1.2564
2	+	-	-	-	+	+	-	4.1	7.21	0.02	3.1	0
3	-	+	-	-	-	+	+	3.9	4.33	0.05	0.43	0.8917
4	+	+	+	-	-	-	-	6.5	3.6	0	-2.9	3.3233
5	-	-	+	+	-	-	+	6.5	3.97	0.04	-2.5	2.13
6	+	-	-	+	+	-	-	4.05	3.43	0.03	-0.62	0.285
7	-	+	-	+	-	+	-	3.85	3.73	0.04	-0.12	0
8	+	+	+	+	+	+	+	6.5	3.66	0.02	-2.8	3.98

A*=Humedad, B=Inóculo, C=Ca(OH)₂, D=Temperatura, E=Melaza, F=Urea y G=Celulosa

- 74 -

TABLA 13

COEFICIENTES DE LOS FACTORES ESTUDIADOS CALCULADOS*

A PARTIR DE LA MATRIZ Y DE LOS DATOS REPORTADOS EN LA TABLA 12.

FACTORES	Coefficientes para pH inicial (b_f)	Coefficientes para pH final	Coefficientes para ácido láctico final
Humedad	0.05	0.21	0.41
Inóculo	-0.05	-0.43	0.56
Ca(OH) ₂	1.26	-0.41	1.19
Temperatura	-0.01	-0.56	0.12
Melaza	0.05	0.35	-0.10
Urea	-0.65	0.47	-0.26
Celulosa	0.61	-0.23	0.58
Fo	5.237	4.26	1.48

$$* F_o = \frac{\sum x}{n}$$

$$b_i = \sum \frac{S_i X_i}{n}$$

donde:

X= valor obtenido del parámetro estudiado

 S_i = signo de la matriz

n= número de experiencias

TABLA 14

ANALISIS ESTADISTICO DE LA OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION
DE ACIDO LACTICO (g/l)

Experiencia	Media	Desviación Standard	Error Standard	Mínima	Máxima	Intervalo de Confianza al 95%	
1	1.2564	0.7972	0.2404	0.0000	2.9000	0.7208	a 1.7919
2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	a 0.0000
3	0.8917	0.9775	0.2822	0.0000	2.4800	0.2706	a 1.5128
4	3.3233	0.5770	0.2356	2.5400	4.2900	2.7178	a 3.9289
5	2.1300	0.7919	0.1817	1.0000	3.4900	1.7483	a 2.5117
6	0.2850	0.5287	0.1869	0.0000	1.2000	0.1570	a 0.7270
7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	a 0.0000
8	3.9800	0.4161	0.1201	3.3000	4.7800	3.7156	a 4.2444

VI. CONCLUSIONES

*La harina de yuca cocida o enriquecida puede ser utilizada como sustrato para una fermentación láctica; además se ha mostrado que la harina enriquecida no presenta inhibición de las bacterias lácticas.

*Es posible llevar a cabo una fermentación láctica en medio sólido de la harina de yuca para su conservación, ya que se obtienen rápidamente (2 ó 3 días) altas concentraciones (1.5%) de ácido láctico y pH bajo (3.4).

*La fermentación láctica de la harina de yuca enriquecida presenta una cinética que cumple con la ecuación de Monod (para concentraciones bajas), presentando una concentración de sustrato óptima a los 341.5 g/l y para concentraciones altas (menos de 69% de humedad) parece cumplir con la ecuación de cinética de inhibición por sustrato.

*Las cinéticas de la fermentación láctica a diferentes concentraciones de harina parece cumplir con el siguiente modelo:

$$P_L = \frac{P_{max} t}{K + t}$$

y a partir de este pueden obtenerse los valores de producción máxima para cada concentración de sustrato.

*El porcentaje de rendimiento en la fermentación láctica de la harina de yuca enriquecida presenta una relación inversamente proporcional a la concentración de sustrato.

*La adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para fijar el nivel inicial de pH a 6.5 tiene un efecto muy positivo en la fermentación láctica de la harina de yuca.

*El método de diseño experimental permite demostrar la importancia de optimizar el pH inicial, las fibras y la inoculación con una cepa láctica para obtener en silajes buenos; el uso de este método nos permite reducir drásticamente el número de experiencias necesarias y además considera los posibles sinergismos entre los parámetros estudiados.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aborhey, S. & D. Williamson. 1977. Modeling of lactic acid production by Streptococcus cremoris hp. J. Gen. Appl. Microbiol. 23: 7-21.
- Amoa, B. & H. G. Muller. 1975. To calcium and phytic acid. Cereal Chem. 53 (3): 365-375.
- Andah, A. & H. G. Muller. 1973. Studies on koko, a Ghanaian fermented maize porridge. Ghana Journ. Agric. Sci. 6: 103-108.
- Anónimo. 19.... Optimización de medios de cultivo en sistemas industriales de fermentación. Método de Box-Wilson. Mecanografiado. 9 pp.
- Aucamp, M. C., J. T. Grieff, L. Norellie, B. Papendick, H. M. Swartz & A. G. Steer. 1961. Kaffircorn malting and brewing studies. VIII. J. Sci. Food. Agr. 12: 449-456.
- Banigo, E. O. I. & H. G. Muller. 1972. Carboxylic acid patterns in Ogi fermentation. J. Sci. Food Agr. 23: 101-111.
- Banigo, E. O. I. & H. G. Muller. 1972. Manufacture of Ogi (a Nigerian fermented cereal porridge): comparative evaluation of corn, sorghum and millet. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 5 (4): 217-221.
- Banigo, E. O. I., J. M. de Man & C. L. Duitschaeffer. 1974.

Utilization of high-lysine corn for the manufacture of Ogi using a new, improved processing system. Cereal Chem. 51: 459-472.

Brown, W. V. & E. B. Collins. 1976. End products and fermentation balances for lactic Streptococci grown aerobically on low concentrations of glucosa. Appl. and Environ. Microbiol. 33 (1): 38-42.

Cárdenas, O. S. & T. S. de Bluchle. 1980. Sour cassava starch production: a preliminary study. J. Food. Sci. 45: 1509-1512.

Carrizalez, V., H. Rodríguez & J. Sardiña. 1981. Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. Biotechnol. & Bioengineer. 23: 321-333.

Cottyn, B. C. & C. Boucque. 1968. Rapid method for the chromatographic determination of volatil acids in rumen fluid. J. Agric. Food. Chem. 16: 105.

Cravioto, D. R., Y. O. Cravioto, H. G. Masieu y G. J. Guzmán. 1955. El pozol: forma indígena de consumir el maíz en el Sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. Ciencia 15: 27-30.

Cruz-Ulloa, S. y M. Ulloa. 1973. Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericana

nos. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 34: 423-457.

Doelle, H. W. 1975. Bacterial Metabolism. Academic Press, New York. 738 pp.

Gómez, G. J. & G. Viniegra-González. 1981. Orientation of sugar fermentation inoculated with heterogeneous microbial population from cow-dung. Adv. Biotechnol. 2: 627-631.

Gómez-Hernández, J. & B. Coronado-Vega. 1983. Lactic acid production using animal wastes as inoculum. Biotechnol. Let. (in press).

Gregory, K. F., A. E. Reade, et al. 1977. Further thermotolerant fungi for the conversion of cassava starch to protein. Anim. Feed. Sci. and Technol. 2: 7-19.

Hamdy, M. K. & S. M. Taha. 19---. Mish: a soft ripened Egyptian cheese. Milkprod. Jour.

Hanson, T. P. & G. T. Tsao. 1972. Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures. Biotechnol. & Bioengeer. 14: 233-250.

Healey, F. P. 1980. Slope of the Monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition. Microb. Ecol. 5: 281-286.

- Herrera, T. y M. Ulloa. 1970. Aspectos generales sobre la mi
crobiología de pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 12: 103
108.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1971. Estudio de Candida krusei y
Trichosporon cutaneum asilados del pozol. Rev. lat-amer.
Microbiol. 13: 255-261.
- Herrera, T., J. Taboada y M. Ulloa. 1972. Fijación de nitró-
geno en el tesgüino y el pulque. An. Inst. Biol. Univ.
Nal. Autón. México. 43, Ser. Biol. Exp. (1): 77-78.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1973. Estudio de Hansenula fabianii
aislada del pozol. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón.
México 44, Ser. Bot. (1): 1-8.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1975. Reconsideraciones sobre dos
trabajos anteriores, para la identificación de Kluyve-
romyces fragilis y Candida quilliermondii en el pozol
y de Kloeckera apiculata en el pulque. Bol. Soc. Mex.
Mic. 9: 13-15.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1975. Antagonismo del pozol y de
Agrobacterium azotophilum sobre diversas especies de
bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. Rev.
lat-amer. Microbiol. 17: 143-147.
- Hesseltine, C. W. 1972. Solid state fermentations. Biotech-
nol. & Bioengineer. 14: 517-532.

Hesseltine, C. W. & H. L. Wang. 1979. Fermented foods. Chem. and Ind. 16: 393-399.

Hesseltine, C. W. 1979. Some important fermented food of Mid-Asia, the Middle East, and Africa. J. Am. Oil. Chem. Soc. 56: 367-374.

Keller, A. K. & P. Gerhardt. 1975. Continuous lactic acid fermentation of whey to produce ruminant feed supplement. High in crude protein. Biotechnol. & Bioengineer. 17: 997-1018.

Knapp, J. S. & J. A. Howell. 1978. Solid substrate fermentation. In Topics in enzyme and fermentation technology. Wiseman. 4: 85-135.

Ko, S. D. 1972. Tape fermentation. Appl. Microbiol. 23: 976.

Massieu, H., D. R. Cravioto, O. G. Guzmán y G. y J. Olivera B. 1959. Contribución adicional al estudio de la composición de alimentos mexicanos. Ciencia 19: 53-66.

Miracle, M. P. 1965. Food technology in tribal Africa. In Food technology the world over. Peterson M. S. & Tressler D. K. (Editors). Ed. Aci Publ. Co. Inc. Westport, Connecticut. 107-154.

Miranda, F. 1952. La vegetación de Chiapas. Departamento de Prensa y Turismo. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México, pp. 305-307.

Moo-Young, M. A., R. Moreira & R. P. Tengerdy. 1983. Principles of solid-substrate fermentation. In The Filamentous fungi. Fungal Technology. Vol. IV. Smith S. E., Berry D. R. & Vristiunsen B. (Editors). Arnold, London, pp. 117-144.

Muller, H. G. 1981. Kenkey. Advances in Biotechnology. Proc. 6th. Internat. Ferment. Sympo. London. Canada. July 20-25, 2: 541.

Nartey, F. 1973. Biosynthesis of cyanogenic glucosides in cassava (Manihot spp.). In Chronic cassava toxicity: proceedings of an interdisciplinary workshop. London. Int. Develop. Res. Centr Mongr. IDRC-010e, pp. 73-87.

Noda, F., K. Hayashi & T. Mizunuma. 1980. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeast in brine fermentation of soy sauce. Appl. & Environ. Microbiol. 40 (3): 452-457.

Okafor, N. 1981. A scheme for the improvement of fermented foods of Africa South of the Sahara. In Proceedings of the Sixth International Conference on Global Impacts of Applied Microbiology (GIAM VI). Lagos, Nigeria. S. O. Emejuaiwe, O. Ogunbi & S. O. Sanni (Eds.). Academic Press, London, pp. 45-49.

Pamment, N. B., R. J. Hall & J. P. Borford. 1978. Mathema-

tical modeling of lag phases in microbial growth. Bio-
tec. & Bioengineer. 20: 342-381.

Pederson, C. S. 1979. Microbiology of food fermentations
2nd. Edition. The Avi Publishing Co. Westport, Connecti-
cut. 16, pp. 120-124.

Pirt, H. M. 1975. Principles of microbe and cell cultivation.
Blackwell Scientific Publications, 274 pp.

Prescott, S. C. & C. G. Dunn. 1962. Industrial Microbiology.
3rd. Edition. McGraw Hill Book Co., New York, pp.324-359.

Purseglove, J. W. et B. Dreyfus. 1977. Hidrolyse de l'almidon
de manioc par un lactobacille, enrichissement dé un
ensilage en protéines. Etude D.F.R.S.T. France No. 75,
7, 0623. Doc. roneo. 45 pp.

Raimbault, M. 1982. Método de diseño experimental. Semina-
rio de Biotecnología. Mecanografiado.

Raimbault, M. & D. Alazard. 1980. Culture method to study
fungal growth in solid fermentation. Europ. J. Appl.
Microbiol. Biotechnol. 9: 199-209.

Raimbault, M. 1981. Fermentation en milieu solide. Croissan-
ce des champignons filamenteuse sur substrat amylicé.
Tesis de doctorado. Un. Tolusa, Francia, Doc ORSTOM
No. 127.

- Reade, A. E. & K. F. Gregory. 1975. High-temperature production of protein-enriched feed from cassava by fungi. Appl. Microbiol. 30 (6): 897-904.
- Rich, C. M. & E. Anderson. 1949. On some uses of maize in the Sierra of Ancash. Ann. Miss. Bot. Gard. 36 (4): 405-412.
- Salinas Ch., C. 1958. Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol. Tesis profesional. Facultad de Ciencias . UNAM. México. 63 pp.
- Schwartz, H. M. 1956. Kaffircorn malting and brewing studies. I. The kaffir beer brewing industry in South Africa. J. Sci. Food Agr. 7:101-105.
- Schweigart, F. & A. Fellingham. 1963. A study of fermentation in the production of mahewu, an indigenous sour maize beverage of Southern Africa. Milchwissenschaft 18: 241-246.
- Senez, J. C., M. Raimbault y F. Deschamps. 1980. Protein enrichment of starchy substrates for animal feeds by solid-state fermentation. World Animal Review (FAO). No. 35. pp. 36-39.
- Steinkraus, K. H. 1981. The indigenous fermented foods. Nestlé Research News 1980/1981. 23-28 pp. Technological Alimentation Center.

- Taboada, J. y T. Herrera. 1972. Efecto de aminoácidos sobre la fijación de nitrógeno por *Agrobacterium azotophilum*. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx. 43, Ser. Biol. Exp. (1): 35-42.
- Ulloa M. y T. Herrera. 1970. Persistencia de las aflatoxinas durante la fermentación del pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 12: 19-25.
- Ulloa M. y T. Herrera. 1971. Mohos aislados del pozol en medios con deficiencia o carencia de nitrógeno. Bol. Soc. Mex. Micol. 5: 13-21.
- Ulloa M. y T. Herrera. 1972. Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. Rev. lat-amer. Microbiol. 14:15-24.
- Ulloa M. y T. Herrera. 1973. Características generales y algunos datos sobre pruebas de antibiosis de cinco especies de *Penicillium* aisladas del pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 15: 191-197.
- Ulloa M. y T. Herrera. 1973. *Phialophora richardsiae*, un hongo causante de feosporotricosis en el hombre, aislado del pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 15:199-201.
- Ulloa M. y T. Herrera. 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. Bol. Soc. Mex. Mico. 8: 17-48.

- Ulloa, M. C. Salinas y T. Herrera. 1974. Estudio de *Bacillus megaterium* aislado del tesguino de Chihuahua, México. Rev. lat-amer. Microbiol. 16: 209-211.
- Ulloa, M. y C. P. Kurtzman. 1975. Occurrence of *Candida parapilosis*, *C. tropicalis* y *S. cerevisiae* in pozol form Tabasco, Mexico. Bol. Soc. Mex. Mic. 9: 7-12.
- Ulloa, M., T. Herrera y J. Taboada. 1977. *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum* aislados de diferentes muestras de tesguino de Jalisco, México. Bol. Soc. Mex. Mic. 11: 15-22.
- Umoh, V. & M. Fields. 1981. Fermentación of corn for Nigerian Agidi. J. Food Science. 46:903-905.
- Viana, M. T. 1982. Una alternativa a la utilización de sub-productos de la fauna de acompañamiento del camarón. Composición química de microensilajes de subproductos pesqueros y desperdicios agrícolas. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 53.
- Viniegra, G. & J. Gomez. 1982. Lactic acid production by pure and mixed bacterial cultures. In Fuels and organic chemicals from biomass. D. Wise, CRC Press, New York. En prensa.
- Wacher, M. C. 1981. Estudio de la utilización de hongos termofílicos en el enriquecimiento protéico de desperdi-

cios de pulpa de plátano. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, UNAM. pp. 70.

Wang, H. L. & C. W. Hesseltine. 1981. Use of microbial cultures: legume and cereal products. Food Technol. Jan: 79-83.

Wang, H. L., L. Kraidej & C. W. Hesseltine. 1974. Lactic acid fermentation of soybean milk. J. Milk and Food Technol. 37 (2): 71-73.

Whittenbury, R. 1964. The enrichment and isolation of lactic acid bacteria from plant materials. In Anreicherungskultur und Mutantenlese. Zbl. F. Bakt. I. Abteilung. Supplementheft. 1: 395-398.

Yajurvedi, R. P. 1980. Microbiology of Idli fermentation. Indian Food Packer. 34 (6) : 33-38.

Yen, D. E. 1959. The use of maize by the New Zealand Maoris. Econ. Bot. 13: 319-327.