

2 E No. 104

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"APROVECHAMIENTO DE LOS DESPERDICIOS DE PLATANO MADURO POR
FERMENTACION SOLIDA"**

T E S I S

CARLET JOSEPH SAINT-PHARD DELVA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 4



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.

I. INTRODUCCION

La insatisfacción actual de los requerimientos proteicos en la mayoría de los países del mundo, asociada con una demanda cada vez mayor de leche y de carne, representa un problema crucial al cual se debe de dar una solución pronta para evitar un colapso de consecuencias lamentables. La mala nutrición que azota a los países tercermundistas representa un enemigo a vencer ya que la base de desarrollo y de prosperidad de cualquier nación reside en una buena alimentación que se reflejará en el estado de salud de su población, en su fortaleza y en su buena disposición a trabajar.

Varias tentativas y constantes esfuerzos se dan en los campos de la tecnología de alimentos, de la nutrición y de la agronomía para afrontar este reto de aumentar la producción y el contenido de proteína de los alimentos, el problema es de doble faceta: cuali y cuantitativo. La producción asimismo como la utilización de los cereales juegan un papel importante en el acontecer de la problemática alimentaria. En los países desarrollados que por lo general cuentan con grandes reservas de granos, la mayor parte de la producción granera se destina a la alimentación animal y a la elaboración de productos derivados. La situación es diferente en los países en vías de desarrollo, incluyendo a México, en donde la producción no siempre cubre las necesidades globales ocasionando que se importen granos (fuga de divisas) y en segundo lugar el consumo humano compete de manera desfavorable con la disponibilidad para nutrir a los animales, lo que deriva en un déficit de

proteína animal que por ser más completa y más cercana a nuestros requerimientos, es la más adecuada. Así, cualquier tendencia a incrementar su producción al explotar fuentes baratas no convencionales sería muy aliviador.

Se dispone de varias alternativas entre otras, la producción de biomasa, la elaboración de aminoácidos y el aprovechamiento de los desperdicios agrícolas. Se sabe que para cada kilogramo de grano producido se obtiene uno o más kilogramos de paja y forraje (Tabla I-1), lo mismo sucede con las frutas y vegetales. Se puede obtener una idea más clara de la cantidad de desperdicios derivados de la producción de los cereales al examinar los datos de la Tabla I-2.

El empleo de estas enormes cantidades de desperdicios celulósicos, sobre todo en los países en vías de desarrollo, para la elaboración de alimentos baratos y de alto contenido proteico destinado principalmente a la nutrición animal y de preferencia a la alimentación de los monogástricos, ya que los rumiantes disponen en su rumen de una microflora celulolítica que les permite degradar estos materiales y utilizar la energía almacenada para producir leche, carne, etc., además de que también puede utilizar nitrógeno no proteico como la urea en lugar de proteína, ocasionaría una mayor disponibilidad de la proteína animal, un abatimiento de los costos de producción y de consumo y en cierta medida un saneamiento de las economías regionales. En el caso de los rumiantes se tratará de aumentar la digestibilidad de estos residuos celulósicos que por lo general contienen lignina. En la Tabla I-3, se presentan los datos de la digestibilidad de algunos forrajes que, se-

gún el valor elevado o bajo, se clasifican en forraje de buena o mala calidad.

Los desperdicios azucarados (frutas) también son de gran interés y pueden servir a los mismos fines con los mismos efectos. Hemos enfocado nuestra atención sobre los desperdicios de plátano maduro. Tanto en México como a nivel mundial los desperdicios de plátano acusan una cifra altísima. Es relevante notar que según la IFAC (Institut Français de Recherches Fruitieres d'Outre-mer) por cada tonelada de plátano empacada y exportada a los mercados internacionales de frutas, cerca de 750 Kg o sea las 3/4 partes se rechazan por ser inutilizables o bien en exceso y que esa cifra representa el 10-20% de los desperdicios totales teniendo en cuenta los ocurridos en el campo durante la cosecha y por circunstancias fortuitas como las heladas y los huracanes. Después de la uva que presenta la mayor producción anual total entre las frutas con 32.9 millones de toneladas, viene el plátano con unos 20.5 millones de toneladas, luego las manzanas y los cítricos en tercer y cuarto lugares con 14.7 y 13.8 millones de toneladas respectivamente (Economist Intelligence Unit, 1954). Desgraciadamente no se dispone de datos más recientes y en México, aunque no se cuentan con datos oficiales, se estima que casi la mitad del volumen destinado al consumo nacional se convierte en desperdicios.

Siendo muy fácilmente fermentable por la gran cantidad de azúcares que contiene, el plátano representa un sustrato adecuado para varios tipos de fermentación y el aprovechamiento de estos desperdicios para producir alimentos animales baratos de alto nivel proteico constituye una

solución viable al problema tan agudo de satisfacer los requerimientos alimentarios actuales. El objetivo de este trabajo es aprovechar la capacidad de unas bacterias de los tíficos para fijar el nitrógeno a fin de elevar el contenido de proteína de desperdicios de plátano maduro entero vía fermentación sólida.

TABLA I-1 VALOR ESTIMADO DE KG DE RESIDUOS OBTENIDOS POR KG DE GRANO COSECHADO.

Cereales	Residuos Kg/Kg de grano
Trigo	1.0
Cebada	1.5
Avena	2.0

Fuente: Anderson, 1977.

TABLA I-2 VOLUMEN DE DESPERDICIOS AGRICOLAS MUNDIALES Y EN EL CONTINENTE AMERICANO OBTENIDOS DE LA PRODUCCION DE CEREALES.

Forraje	Mundial	(X 1,000 toneladas métricas) Continente Americano
Trigo	550,000	50,000
Cebada	40,000	5,000
Avena	50,000	8,000
Arroz	180,000	50,000

Fuente: Atcheson, 1976.

TABLA I-3 VALOR DE LA DISPONIBILIDAD DE ALGUNOS FORRAJES.

Forrajes	Digestibilidad (% Materia seca)
Alfalfa (verde)	67
Fleo (verde)	73
Paja de trigo	38
Bagazo	35
Paja de cebada	46

Fuente: Nutrition & Food Science Vol. 2:156 (1978).

II. GENERALIDADES

Dado que el objetivo planteado fue el uso de subproductos agrícolas en la producción de alimentos, se selecciono el plátano.

II.1 LOS PLATANOS.

a) Clasificación.

Los plátanos comestibles del mundo se pueden clasificar en dos series: la serie Australimusa y la serie Eumusa, que pertenecen a la familia Musáceos. La serie Eumusa contiene la gran mayoría de los plátanos comestibles en tanto que la serie Australimusa produce una importante fibra que es el abacá (*M. textilis*). Los plátanos Fe'i, representativos de la serie Australimusa, se distinguen de todos los demás plátanos cultivados por poseer racimos erectos y savia roja, la pulpa contiene una proporción de azúcar a almidón mucho más baja que la de la fruta de la serie Eumusa cuyo prototipo es el "Gros Michel".

b) Composición.

Los plátanos contienen un contenido elevado de agua (78-80%). En el estado verde como generalmente se recolectan y se empaican, la materia seca consiste principalmente de almidón (72%), el cual al madurar la fruta, se convierte en azúcares simples (sacarosa, glucosa y fructosa). El contenido de celulosa es bajo (3 a 4%) y la mayor parte se encuentra en la cáscara. La ceniza es relativamente rica en potasio, magne-

sio, sodio y fósforo. La cantidad de grasa es insignificante. Verde o maduro, el plátano tiene poca proteína (0.5-1.5) y es deficiente en lisina y en aminoácidos que contienen azufre (2.3-2.9 g/16 g N). Además, el plátano contiene taninos que son ligeramente polimerizados en la fruta verde y por lo tanto inhibe la acción de las enzimas. En la fruta madura hay mayor polimerización. Se han encontrado once vitaminas siendo las más abundantes en la fruta la A, B₁, B₂ y C.

c) Valor Nutricional.

El plátano maduro es, en especial, un alimento azucarado de fácil digestión. A la pequeña cantidad de almidón que la fruta madura contiene se le ha estimado un 54-80% de digestibilidad en pruebas de nutrición con animales (Von Loesecke, 1950)*. Es una de las frutas más fáciles de asimilar y, en los últimos treinta años, se le ha usado generalmente como un elemento en la nutrición de las personas afectadas por diversos trastornos intestinales. El más espectacular de estos es, quizás, la enfermedad celiaca en los niños, que se manifiesta como una intolerancia a los carbohidratos; sin embargo, esos mismos niños digieren satisfactoriamente los plátanos y se dice que una dieta de plátanos maduros ha salvado en múltiples ocasiones la vida de niños seriamente afectados. Se ha sugerido que la causa puede residir en las aminas fenólicas de la fruta. El valor calórico se calcula aproximadamente en 1 cal/g. Los plátanos vianda por tener una carne ligeramente más seca que la de los plátanos fruta, poseen valores calóricos más altos. Unos 24 plátanos fruta (si cada uno pesa algo más de 100 g) pro-

*Citado en: Bananas. Simonds N.W. 1966.

porcionarán la energía (2,400 calorías diarias) que necesita un hombre sedentario. Tal alimentación, por si sola, no sería satisfactoria por deficiencia de grasas y proteínas, pero podría equilibrarse tomando mucha leche. Conviene señalar aquí que en Haití se elabora un alimento (tipo atole) considerado por los habitantes, como un regenerador, un vitalizador y muy saludable. Se prepara a partir de plátano macho verde entero molido y cocido al cual después de colar se le agrega leche.

II.2 LAS FERMENTACIONES LACTICAS TRADICIONALES.

Entre los métodos tradicionales de elaboración y conservación de los alimentos, la fermentación juega un papel importante en el mundo entero. De los dos tipos predominantes, acética y láctica, la segunda ocupa un interés extraordinario. No hay un sólo país o continente que no tenga un alimento fermentado típico o mejor dicho nativo de carácter láctico. Muchos investigadores se han dedicado a la labor de descifrar los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo esta fermentación que en la mayoría de los casos es espontánea y de comparar el valor nutritivo de estos productos.

Keith H. Steinkraus, Carl S. Pederson, Lois F. Melis y Ben J. Gavitt, colaboraron en la edición de un libro titulado: "Handbook of Indigenous Fermented Foods" en el cual presentaron las regiones en donde se elaboran dichos alimentos, la(s) materia(s) prima(s) utilizada(s), los microorganismos responsables de la fermentación que se lleva a cabo, el modo de preparación, el análisis de los diversos alimentos, su valor

nutritivo y toxicidad, etc.. En el simposio sobre alimentos indígenas fermentados (SIFF) que tuvo lugar en Bengkek, Tailandia en 1979 y que fue financiado por varias organizaciones internacionales entre otras la FAO y la UNESCO, y por varias empresas como la Nestlé Alimentaria, la Carnation Internacional y la Pfizer Co., se subrayo la urgente necesidad de hacer entender a los gobiernos de los países en vfa de desarrollo la ventaja que podría representar la producción en gran escala, de los alimentos indígenas fermentados, lo que habrá significado una solución al problema de la escasez de alimentos y del hambre en estas regiones. En México se conocen varios tipos de alimentos fermentados indígenas como son el pozol, el pulque, el tesgüino y el tepache elaborado a partir de los tibicos.

Las zoogreas, conocidas en México con el nombre de tibicos, son unas masas gelatinosas, compactas de color blanquecino o amarillento, translúcidos u opalescentes, atravesados irregularmente por vetas muy finas, de forma irregular y de tamaño variable, desde unos pocos milímetros hasta uno o dos centímetros, que se desarrollan en artículos y frutos de nopales (*Opuntia spp.*), en jugos de fruta como la piña para obtener la bebida conocida como tepache, o en agua azucarada con piloncillo o azúcar morena para obtener el vinagre de tibico, un líquido de olor penetrante, sabor ácido y color amarillento que después de filtrar la beben ciertas personas con la intención de reducir de peso, de combatir la arteriosclerosis y de prevenir algunos males cardiacos. Estas zoogreas están constituidas por bacterias y levaduras que son las responsables de la fermentación de los distintos sustratos donde se desa-

rrollan.

Varios investigadores han estado estudiando los microorganismos encontrados en varios alimentos y bebidas mexicanos como por ejemplo el pulque, el pozol, el tesgüino y el tepache. De especial interés es el trabajo de Taboada y col., sobre *Agrobacterium azotophilum*, bacteria fijadora de nitrógeno aislada del pozol. Lutz (1898)* fue el primer investigador que estudió los microorganismos de los tibicos y describió una especie nueva de bacteria a la que denominó *Bacillus mexicanus* y una especie, también nueva de la levadura a la que dió el nombre de *Saccharomyces radaisii*. Mascott y Terrés (1952)* estudiaron dos especies de levaduras aisladas de los tibicos: *Saccharomyces bayanus* sacc. y *Pichia membranaefaciens* Hansen. Además aislaron diversas cepas de bacterias de los tibicos. Moreno y Dfaz (1932)* describieron someramente algunos aspectos sobre la microbiología y el análisis químico de los tibicos y registraron para estos las bacterias *Escherichia coli* (Mígula), *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn. y *Acetobacter peroxydans* Visser y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (como *S. ellipsoideus* Hansen). Es notorio comentar que la especie *S. cerevisiae* puede considerarse como la especie de levadura más difundida en las bebidas fermentadas autóctonas de México ya que se encuentra en el pozol, en el tesgüino (de maíz), en el pulque y la tuba (de savia de plantas), en el colonche (de jugo de tuna) y en el tepache. (Ulloa y Herrera, 1981).

El trabajo bacteriológico más reciente sobre los tibicos publicado en abril de 1984, lo desarrollaron Teófilo Herrera, Cora Salinas Ch. y Sergio Palacios Mayorga. Consistió el trabajo en el aislamiento de

* Citado en: Estudio de *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*. Ulloa M. y T. Herrera (1981).

dos cepas (T_4 y T_5) que integran las zoogreas, la caracterización bioquímica de las mismas y su identificación como *Klebsiella oxytoca* (Flügge) Lautrop. Las cepas aisladas fueron capaces de crecer en medios libres de nitrógeno, demostrando así su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, la cual se verificó por la técnica de la reducción del acetileno. Comparando la actividad nitrogenásica de las cepas aisladas T_4 y T_5 y de la zoogrea misma con la de las cepas de *Azotobacter sp.* y *Beijerinckia indica* como testigos de bacterias de vida libre muy conocidas se registró, en orden decreciente la siguiente clasificación: máxima actividad nitrogenásica para el *Acetobacter sp.*, en segundo lugar la cepa T_4 de los tísticos, en tercer lugar, con una mínima diferencia, la cepa T_5 de los tísticos, en cuarto lugar la cepa *Beijerinckia indica* y en quinto lugar la zoogrea original.

Características de las cepas:

- Bacilos de 2 a 3 μm de largo por 1 a 1.6 μm de ancho, con extremos redondeados - Gram negativos; con cápsula y con mucílago abundante.
- Aerobias y anaerobias facultativas. La temperatura de crecimiento fluctúa entre 15 y 37°C, siendo su óptima entre 26 y 30°C, capaces de crecer en una escala de pH de 4 a 9.

11.3 BACTERIAS PRODUCTORAS DE ACIDO LACTICO.

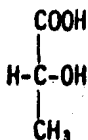
Las bacterias productoras de ácido láctico incluyen las especies de Lactobacillaceae, que son bien conocidas como microorganismos que contaminan los alimentos. Forman un grupo heterogeneo y se caracterizan

bioquímicamente por su principal producto final: el ácido láctico. Son cocos o bacilos Gram positivos, no forman esporas. Algunas son catalasas positivas, otras catalasas negativas. Todas las especies de esta familia son fermentadoras obligadas, es decir, obtienen energía sólo de la fosforilación a nivel de sustrato. Se agrupan en dos divisiones: homofermentativas y heterofermentativas. Esta división se basa principalmente en el porcentaje de los otros productos, que a parte del ácido láctico, se obtienen en la fermentación. En general las cepas de Lactobacillaceae que producen más de 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa, con cantidades mínimas de ácido acético, etanol y CO_2 , se agrupan como las homofermentativas. Así tenemos a los *Diplococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Microbacterium*. Las homofermentativas aparte de la glucosa fermentan también la fructosa, la manosa, la galactosa y los disacáridos como la lactosa, la maltosa y la sacarosa.

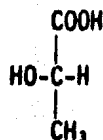
Los microorganismos que fermentan las hexosas con la producción de menos de 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa y, en adición, etanol, acetato, glicerol, manitol y CO_2 , son llamados heterofermentativos. El principal grupo de estos microorganismos incluye a cepas de *Leuconostoc*, algunas cepas de *Lactobacillus*, los *Peptostreptococcus* anaerobios y las especies aeróbicas de *Eubacterium*, *Catenabacterium*, *Rumibacterium* y *Bifidobacterium*. En la reacción global de la conversión de la glucosa a ácido láctico los heterofermentativos producen durante la fermentación 1 mol de ATP por mol de glucosa, lo que representa la

mitad de la energía producida por los homofermentativos.

El ácido láctico presenta dos formas ópticamente activas; los isómeros D(-) y L(+) y una forma racémica ópticamente inactiva, la DL.



Acido láctico D(-)



Acido láctico L(+)

El ácido láctico que se forma durante las fermentaciones generalmente es de la forma DL.

11.4 ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DE SUBPRODUCTOS AGRICOLAS POR FERMENTACION SOLIDA.

Hasta ahora no se ha reportado la utilización de cepas bacterianas en la tecnología de la fermentación sólida con el objeto de enriquecer proteínicamente desperdicios azucarados particularmente de plátano maduro entero, para su conversión a alimentos enriquecidos para animales, restringiendo el uso de esas a la producción de proteína unicelular en cultivos sumergidos. A excepción del ensilaje, se ha utilizado de preferencia la pulpa y concretamente citaremos el trabajo de María del Carmen Wacher sobre el "Estudio de la utilización de hongos termofílicos en el enriquecimiento proteico de desperdicios de pulpa de plátano" (M.C. Wacher, 1981).

El ensilaje, cuyo éxito depende particularmente de una rápida acidificación láctica del medio que será favorecida por la presencia de grandes cantidades de glúcidos solubles en el producto inicial, es principalmente un medio de conservación de los desperdicios de plátano tanto verde como maduro, sea naturalmente o artificialmente en atmósfera de acetileno. Aunque para el plátano maduro entero se ha observado un aumento del contenido de proteína de 5.3 a 8.1, mientras que para el plátano verde el contenido se ha disminuido de 6.4 a 3.8, el ensilaje cuyas características fundamentales son una buena compactación y un drenaje adecuado, no se le puede considerar como un buen método para el enriquecimiento proteico del plátano maduro y en general se prefiere el ensilaje del plátano verde tanto por razones económicas (pérdidas de nutrientes) como nutricionales (concentración energética del producto final). Los datos obtenidos por Le Dividich, Seve y Geoffrey, 1976, de la composición del plátano ensilado verde y maduro después de la estabilización del ensilaje se presentan en la Tabla II.1.

Un estudio realizado por J.C. Senez y colaboradores sobre el enriquecimiento de diferentes substratos almidonosos ha revelado que la fermentación sólida, además de las ventajas que presenta sobre la obtención de proteína unicelular tradicional, es la más adecuada para este propósito. Los materiales almidonosos como la yuca en las regiones tropicales y la papa en regiones más templadas son de un notable interés a causa de su gran productividad (rendimiento) por hectárea cultivada (40-60 toneladas), su excelente tasa de conversión a biomasa por un gran número de microorganismos de rápido crecimiento principalmente

cepas de hongos filamentosos de los géneros *Rhizopus*, *Neurospora*, *Aspergillus* y *Mucor*. El aumento del nivel de proteína de varios substratos almidonosos después de 30 horas de fermentación sólida por *Aspergillus niger* se presenta en la Tabla II-2.

TABLA II-1 DATOS DE LA COMPOSICION FISICA Y QUIMICA DEL PLATANO ENSILADO VERDE Y MADURO.

	Plátano verde	Ensilado verde	Plátano maduro	Ensilado maduro
<u>Composición física</u> -----	<u>Porcentaje de materia seca</u> -----			
Cáscara	20		18	
Pulpa	80		82	
<u>Composición química</u> -----	<u>Porcentaje</u> -----			
Materia seca	21.2	29.0	21.7	23.5
Fibra cruda	3.7	5.3	3.8	6.1
Proteína	6.4	3.8	5.3	8.1
Azúcares solubles en alcohol a 80°C.L.	1.8	0	73.6	17.3
Almidón	72.3	70.9	3.4	6.8
Cenizas	4.6	3.8	5.2	5.7
pH		4.2		3.8
Acido láctico (g/% m.s.)		5.3		10.1
Acidez volátil (g CH COOH/100 g m.s.)		1.8		3.0
Etanol		0.2		2.3
Pérdidas como porcentaje de materia seca ensilada		13.5		33.9

(Le Dividish y col. 1976).

**TABLA II-2 ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DE SUSTRATOS ALMIDONOSOS POR FERMENTACION SOLIDA CON *Aspergillus niger*.
J.C. Senez y col.(1980).**

PRODUCTO	Composición inicial (% materia seca)		Composición final (% materia seca)	
	Proteína	Carbohidratos	Proteína	Carbohidratos
Yuca	2.5	90	18	30
Plátano	6.4	80	20	25
Desperdicios de plátano	6.5	72	17	33
Papa	5.0	90	20	35
Desperdicios de papa	5.0	65	18	28

III. MATERIALES Y METODOS.

III.1 CEPAS BACTERIANAS.

Las cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno T₁, T₄ y T₆, con las cuales se prepararon los cultivos utilizados en el presente trabajo, fueron proporcionados por el Dr. Herrera y la M^{en}C. Ma. Cora Salinas quienes las aislaron de las zoogreas de tíficos en el Departamento de Micología del Instituto de Biología Celular (U.N.A.M.). Las recibimos sembradas por separado en medio sólido Lipman en tres cajas de petri debidamente marcadas. Se denominaban así porque todavía no estaban plenamente identificadas.

III.2 MEDIOS DE CULTIVO.

El medio de cultivo basal empleado en este trabajo ha sido el medio Lipman al cual se le han hecho algunas modificaciones, según el objetivo de cada experimento.

III.2.1 COMPOSICION Y PREPARACION DEL MEDIO LIQUIDO LIPMAN.

Se pesan las siguientes cantidades para las diferentes sustancias:

K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.02g

NaMoO ₄	0.002 g
FeCl ₃	0.01 g
Sacarosa	10 g
NaHCO ₃	1 g

Luego se disuelven en 1000 ml de agua destilada y antes de esterilizar el medio se ajusta el pH a 6.8-7.

III.2.2 MODIFICACIONES AL MEDIO LIPMAN.

Las modificaciones al medio basal Lipman consistieron en:

- 1.- Utilizar otras fuentes de carbono como la glucosa, el fosfato de celulosa y el almidón en la misma concentración que la de la fuente de carbono original (Experimento 1, Sección IV).
- 2.- a) Suplementarlo con 1 g/l de las siguientes sustancias:
(NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, peptona de soya y extracto de levadura.
b) Sustituir el NaHCO₃ por el CaSO₄ y el Ca(OH)₂.
c) Incrementar la concentración de KH₂PO₄ a 0.8 g/l y de NaMoO₄ a 5 y 10 ppm (Experimento 2, Sección IV).
- 3.- En una ocasión se emplearon 5 g/l tanto de (NH₄)₂SO₄ como de extracto de levadura (Experimento 3, Sección IV).
- 4.- a) Se adicionó al medio Lipman suplementado con 1 g/l de (NH₄)₂SO₄.

una mezcla vitamínica* que fue proporcionada por la M. en C. A. Sotelo (Departamento de Farmacia y Productos Naturales, D.E.Pg. Facultad de Química, UNAM). (Experimento 4, Sección IV).

b) Finalmente en el medio Lipman, suplementado con 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa 5, 10, 15 y 20 g/L. (Experimento 5, Sección IV).

III.2.3 PREPARACION DE LOS MEDIOS DE FERMENTACION CON EL PLATANO.

Los desperdicios de plátano sobremaduro (tipo Tabasco) fueron proporcionados por la tienda comercial Aurrera-Taxueña de la Ciudad.

Enteros, sin fisura en la cáscara, los plátanos se depositaban en una solución de detergente durante aproximadamente una hora con el objeto de eliminar lo mejor posible las contaminaciones sufridas durante su manejo anterior; después se les ejuagaba muy bien con agua de la llave y por medio de un trapo limpio se les secaba. Repartidos sobre la superficie limpia de una mesa se cortaban, se machacaban en pequeños trozos y se molfan en un molino eléctrico del tipo que se usa para moler carne. La masa se recogía en vasos de licuadora para convertirla en un puré. En algunos casos se suplementaba la masa con las sales minerales del medio Lipman y en otros se adicionaba además el sulfato de amonio.

En frascos de alimento infantil debidamente marcados, se depositaban 85 g de la preparación o medio correspondiente, se tapaban con hule

*Vitamin Diet Fortification Mixture; elaborado por ICM Pharmaceuticals, Inc. Life Sciences Group, Cleveland, Ohio, U.S.A.

espuma sujetándola por medio de una liga. La tapa fue cubierta con papel aluminio y se incubaban los frascos a 28°C durante 13 días. En la Tabla III-1 se presenta la composición de los diferentes medios de plátano.

III.3 CONDICIONES DE CULTIVO.

III.3.1 PRUEBA DE VIABILIDAD PARA LAS CEPAS DE TIBICOS.

Con una asa estéril en condiciones asépticas se pasaban colonias de cepa original a tres pequeños tubos de ensayo esterilizados con 10 ml de agua destilada en cada uno hasta obtener después de agitarlos muy bien, una turbidez correspondiente a una densidad óptica de 0.1-0.15. La suspensión resultante se adicionaba a 50 ml de medio Lipman contenidos en un matraz de 125 ml previamente esterilizados. Los tres matraces se incubaron a 28°C durante 10 días. El desarrollo de las cepas se relacionaba con la turbidez que los cultivos iban presentando. Al día 10 se hizo un frotis de las cepas originales y de los diferentes cultivos. La comparación al microscopio de los respectivos frotis permitió saber que las cepas se mantuvieron estables morfológicamente hablando. Los cultivos se guardaban en refrigeración y fueron renovados una vez al mes.

III.3.2 INOCULACION DE LOS MEDIOS.

Se utilizó como inóculo al medio basal Lipman con una determinada cepa

en pleno crecimiento cuyo valor de D.O. era de 0.7-0.8.

Después de prepararse, los medios fueron esterilizados en el autoclave a 120°C a una presión de 12 Kg/cm² durante 15 min. Al día siguiente, en condiciones asépticas se adicionaban 10 ml del inóculo correspondiente a 100 ml de medios contenidos en matraces de 250 ml; se mezclaba muy bien y se tomaban 5 ml de muestra para leer la densidad óptica correspondiente al día 0. A la flama del mechero se tapaban los matraces y después se les ponía en incubación en la estufa a 28°C. Para la inoculación del medio de plátano se utilizaban 100 ml de inóculo por 700 g de medio, excepto el experimento 8 Sección IV en donde la inoculación se hizo empleando un concentrado de células*.

III.4 TOMA DE MUESTRAS.

III.4.1 MEDIOS LÍQUIDOS.

Las muestras se tomaban por duplicado. De cada matraz por medio de una jeringa y de micropipetas previamente esterilizadas y en condiciones asépticas, se tomaban cada vez, después de agitar muy bien, 5 ml de medio que se ponían en unos pequeños frascos. Enseguida contra un respectivo blanco se les leía la densidad óptica a una longitud de onda de 500 μ m. Las muestras se tomaban los días especificados en la columna (días de incubación) de las diferentes tablas.

* El inóculo (D.O. de 0.7-0.8) fue repartido en 4 tubos de centrifugación con 50 ml en cada uno llevándose la operación a 5000 rpm durante 40 minutos. Se tiraba el sobrenadante (40 ml/tubo) y se recolectaban los 10 ml residuales de cada tubo para inocular el plátano (700g).

III.4.2 MEDIO DE PLÁTANO.

Para cada medio (Tabla III.2) se tenían 11 frascos, dos correspondiendo al día 0. Los días 5, 9 y 13 se retiraban al azar 3 matraces a los cuales se ponía la fecha del día correspondiente y se guardaban el menor tiempo posible en congelación. Para hacer la determinación de proteína se secaba a 85°C durante dos días la mitad del contenido de un frasco, luego se pulverizaba en un "mixer" la muestra seca, se tomaba por duplicado 0.1 g para el microkjeldhal guardándose el resto en una pequeña bolsa de plástico etiquetada con el nombre y la fecha de la preparación correspondiente. De la otra mitad del frasco se preparaban las muestras para la determinación de las características bioquímicas (pH, AGV,s, etanol, ácido láctico).

TABLA III-1 PREPARACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE PLATANO.

Medio	Plátano (g)	H ₂ O desti- lada (ml)	Solución de sa- les minerales Lipman (ml)	Suplemento (NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	Esterilización	Inóculo T de Zoogleas D.O. = 0.7-0.8 (ml)
1	700	300	-	-	-	-
2	700	-	300	-	-	-
3	700	-	200	-	-	100
4	700	-	300	1	-	-
5	700	-	200	1	-	100
6	700	200	-	-	Sf	100
7	700	-	200	-	Sf	100
8	700	-	200	1	Sf	100

Para cada medio se tenían 11 frascos de alimento infantil con 85g en cada uno.

III.5 DETERMINACIONES ANALITICAS.

III.5.1 PH.

Se realizó instrumentalmente en un medidor de pH (Sargent-Welch, Modelo LSX) con electrodo de vidrio. Se ponfan 2 g de muestra húmeda en 10 ml de agua destilada agitando mecánicamente.

III.5.2 DENSIDAD OPTICA.

Se determinaba en un espectrofotómetro Baush & Lomb a una longitud de onda de 500 μ m utilizando para cada problema el blanco correspondiente.

III.5.3 PROTEINA (MÉTODO DE MICROKJELDAHL).

El principio de este método consiste en que al ser oxidadas las proteínas y demás materias orgánicas por el ácido sulfúrico, el nitrógeno presente es convertido a sulfato de amonio. Al hacer reaccionar esta solución con una base fuerte se desprende amoniaco que se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido bórico. Por titulación del ácido no neutralizado se calcula la cantidad de amoniaco desprendido y así la cantidad de nitrógeno de la muestra. El porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6.25, nos da el porcentaje de proteínas (AOAC).

Para la determinación de proteína en las muestras de platano se pesó

0.1 g de muestra seca en papel glassine y se colocó en un matraz de microkjeldhal. A continuación se añadieron 2 ml de mezcla digestora (300 ml de ácido sulfúrico, 100 ml de ácido fosfórico, 3 g de sulfato de cobre y 3 g de dióxido de selenio). Se calentó hasta la total destrucción de la materia orgánica, o sea hasta que el contenido del matraz fuera completamente claro y no presentara residuos negros de proteína orgánica. Después de haberse enfriado el matraz de digestión el residuo se disolvió en la menor cantidad de agua posible (5 a 10 ml) y se paso al aparato de destilación.

A la salida del destilador se colocó un vaso de precipitado con 15 ml de ácido bórico al 4% y 2 gotas del indicador. Este indicador se preparó mezclando dos partes de una solución de rojo de metilo al 0.2% con una parte de solución alcohólica de azul de metileno al 0.2%.

Al iniciarse la ebullición en el aparato de destilación, se añadieron lentamente (gota a gota) 20 ml de hidróxido de sodio 1:1 al aparato de destilación, empezando entonces la destilación hasta obtener 50 ml de destilado. Se retiró el vaso del aparato de edestilación y se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N hasta la aparición del color rosa claro. Se determinó un blanco con un pedazo de papel igual al que se usó para la muestra. El contenido de nitrógeno en la mezcla se calcula entonces utilizando la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{(\text{ml HCl problema} - \text{ml HCl blanco}) \times N_{\text{HCl}} \times 0.014}{\text{g Muestra}} \times 100$$

El contenido de proteína se calcula entonces:

$$\% \text{ Protefna} = \% \text{ N} \times 6.25$$

III.5.4 DIGESTIBILIDAD *in vitro*,

La determinación de la digestibilidad *in vitro* se hizo según el método de Saunders y col. Se pesaban 250 mg de muestra a los cuales se agregaban 15 ml de HCl 0.1 N con 1.5 mg de pepsina de actividad 1:10,000. Se incubaban a 37°C durante 3 horas agitando de vez en cuando. Después se neutralizó con NaOH 0.5 N. Una vez a pH neutro, se adicionaban 7.5 ml de una solución buffer de fosfatos 0.02 M, pH 8.0 que contienen 4 mg de pancreatina porcina grado 11. Se dejaba otras 24 horas a 37°C agitando de vez en cuando al término de las cuales se filtraba la muestra lavando 3 veces con agua destilada caliente el sólido que se secaba durante 1 hora a 85°C. Se le determinó su contenido de protefna (% de protefna retenida) de acuerdo a la Sección III.5.3.

$$\% \text{ de digestibilidad} = \frac{(\% \text{ protefna de la muestra} - \% \text{ protefna retenida})}{\% \text{ Protefna de la muestra}} \times 100$$

III.5.5 ACIDOS GRASOS VOLATILES (AGV's) ACIDO LACTICO Y ETANOL.

Se realizó por cromatografía de gases en un Cromatógrafo Perkin Elmer, empleando una columna Cromosorb W 80/100 - Tween 80.

Preparación de muestras problema

1. Para AGV's, etanol.

Se hacía una dilución con 5 g de muestra húmeda en 50 ml de agua destilada estéril. Se adicionaban 5 ml de mezcla ácida (0.6 ml de ácido fosfórico y ácido fórmico al 25% en una relación de 3:1 en volumen. Luego se centrifugaba a 5 000 rpm durante media hora. El sobrenadante se guardaba en pequeños frascos de 6 ml.

2. Para ácido láctico (esterificación).

Se tomaba 1 ml del sobrenadante y se le agregaban 0.6 ml de H_2SO_4 (1:1 vol) con 3 ml de metanol. Se mezclaba perfectamente bien y se incubaba a 55°C por una hora. Después de enfriarse, se agregaba 1 ml de agua destilada (para disolver impurezas) con 2 ml volumétricos de cloroformo (para solubilizar el éster del ácido láctico).

Preparación de las soluciones estándar

Solución estándar de AGV's etanol.

Se medían 1 ml de etanol, 1 ml de ácido acético, 1 ml de ácido propiónico, 1 ml de ácido butírico y se llevaban a 100 ml con agua.

Solución estándar de ácido láctico.

Se tomaban 1.5 ml de ácido láctico que se llevaban a 100 ml con agua. Después se hacía la esterificación igual que con el problema.

Para la determinación se inyectaba primero la solución estándar corres

pendiente y luego el problema (3 μ l por triplicado).

Los cálculos se efectuaron obteniendo un factor para cada componente de los estándares

$$\text{Factor}_{\text{Comp.}} = \frac{\text{g del componente en la solución estándar}}{\text{Area obtenida}}$$

Este factor se multiplicaba por el área obtenida para este componente en el problema. El resultado obtenido se multiplicaba a su vez por un factor de corrección obtenido de las diluciones efectuadas en la preparación de la muestra para así obtener la concentración en g/L.

IV. EXPERIMENTOS Y RESULTADOS.

EXPERIMENTO 1

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL DESARROLLO DE LAS CEPAS PROVENIENTES DE LOS "TIBICOS".

En estudios previos realizados por Teofilo Herrera, Cora Salinas y Sergio Palacios, en el Instituto de Biología (UNAM) con las cepas bacterianas T_1 , T_4 y T_6 , se habia comprobado su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (crecimiento en medio Lipman) y asimismo de utilizar varias fuentes de carbono, entre otras las de fácil asimilación, como la sacarosa, la glucosa, la fructosa, la lactosa y el almidón. De ahí surgió la idea de emplear estas cepas para enriquecer por fermentación sólida, el contenido de proteína de los desperdicios de plátano maduro, compuestos principalmente por sacarosa, glucosa, celulosa y almidón. Por ello se decidió inicialmente comparar la capacidad de estas cepas para asimilar estos carbohidratos.

Se efectuó el experimento por duplicado tanto a 28°C como a 35°C para investigar si habia cierta influencia de esta variable en el crecimiento de estas cepas en los diferentes medios midiéndoles la variación de la densidad óptica (D.O.). Los medios fueron preparados como se indicó en la Sección III.2.2.

De los datos de la Tabla IV-1 con representación gráfica en la Figura IV-1 para la cepa T_1 , se destaca que ésta cepa degrada mejor la sacaro-

sa alcanzándose el máximo valor de D.O. de 1.0 a 28°C a los 5 días de incubación. A 35°C, la degradación fue pobre, el valor máximo de D.O. siendo de 0.52 a los 4 días y de 0.51 a los 5 días. El almidón, en términos del desarrollo alcanzado por la cepa T₁ se encuentra en segundo lugar con un valor de D.O. máximo de 0.9 a 28°C a los 15 días mientras que a 35°C el valor máximo fue de 0.52 a los 13 días. Para el fosfato de celulosa y para la glucosa, la situación fue inversa; a 35°C se obtuvieron los valores máximos de D.O. Con el fosfato de celulosa, a los 15 días el valor máximo fue de 0.75 mientras que a 28°C el valor de D.O. máximo era de 0.58 a los 4 días. Con la glucosa, a las dos temperaturas, se alcanzaba un mismo valor de D.O. máximo de 0.75 sólo que a 35°C este valor se obtuvo al segundo día de incubación mientras que a 28°C fue en el último día.

Los datos de la Tabla IV-2 con ilustración gráfica en la Figura IV-2 corresponden a la cepa T₄ que también degrada mejor la sacarosa encontrándose en éste medio el máximo valor de D.O. de 1.25 a 28°C a los 13 días. El valor máximo a 35°C fue de 0.80 a los 7 días mientras que en éste mismo día a 28°C se registró un valor de D.O. de 1.2. Para la glucosa el valor de D.O. máximo fue de 1.2 a 28°C a los 13 días y de 0.82 a 35°C el mismo día por lo que representa la segunda fuente de carbono más utilizada. Con el fosfato de celulosa a 35°C se alcanzó un valor máximo de D.O. de 0,76 a los 13 días mientras que a 28°C el valor máximo fue de 0.64 a los 11 días. Finalmente se registró una pobre degradación del almidón tanto a 28°C como a 35°C. En el primer caso, el valor máximo de D.O. fue de 0.46 a los 15 días mientras que en el segun-

do caso este valor era de 0.33 a los 11 días.

La cepa T_6 , según los datos de la Tabla IV-3 graficados en la Figura IV-3, presentó una baja capacidad de crecer en estos medios tanto a 28°C como a 35°C. Con la sacarosa el valor máximo de D.O. fue de 0.50 a 28°C a los 11 días y de 0.99 a 35°C a los 2 días. Con la glucosa la situación fue igual, a 28°C el valor máximo de D.O. siendo de 0.46 a los 7 días y de 0.10 a 35°C a los 5 días. Con el fosfato de celulosa a 28°C el valor de D.O. máximo fue de 0.54 a los 13 días y de 0.36 a 35°C a los 7 días. Con el almidón a 28°C el valor de D.O. máximo fue de 0.42 a los 7 días y de 0.17 a los 5 días a 35°C.

En conclusión, se puede decir que las tres cepas degradan de manera diferente estas fuentes de carbono, que la temperatura de incubación resultó presentar un efecto sobre el desarrollo de ellas y que las cepas T_1 y T_4 poseen una mayor capacidad para asimilar estos sustratos, de preferencia la sacarosa a 28°C. La cepa T_6 por ser la menos activa, fue descartada para los experimentos posteriores.

EXPERIMENTO 2.

EFFECTO DE LAS MODIFICACIONES DEL MEDIO DE CULTIVO LIPMAN SOBRE EL DESARROLLO DE LAS CEPAS T₁ Y T₄ A 28°C.

Con este experimento se planteó la posibilidad de lograr un mayor desarrollo de las cepas T₁ y T₄ modificando el medio basal Lipman ya que para estas cepas en este medio a 28°C, se alcanzó el máximo valor de D.O. que fue de 1 y de 1.25 respectivamente (Figuras IV-1 y IV-2).

Se consideró suplementar el medio Lipman (control) con fuentes de nitrógeno inorgánico como (NH₄)₂SO₄ y NH₄Cl y con una orgánica como la peptona de soya, pensando que estas sustancias nitrogenadas podrían activar aún más el desarrollo de estas cepas. El extracto de levadura, como suplemento, fue utilizado principalmente como fuente de vitaminas para poder observar su eventual necesidad. Por otra parte, se sustituyó el NaHCO₃ por el Ca(OH)₂ en un caso y por el CaSO₄ en otro, ya que se supone que el calcio favorece la fijación del nitrógeno en las bacterias del pozol (sugerencias del Dr. Hermilo Leal L.). Finalmente, se decidió incrementar la concentración de NaMoO₄ a 5 y 10 ppm ya que se sabe que ciertas bacterias fijadoras de nitrógeno requieren de este elemento*. La concentración de KH₂PO₄ se aumentó a 0.8 g/L.

Por la importancia que tiene el fosfato en la nutrición microbiana, se supuso que una mayor disponibilidad contribuiría a que el desarrollo de las cepas mejorase.

Los medios fueron preparados como se describió en la Sección III-2.2.

* Singh M., Kumar V. 1979.

efectuándose el experimento por duplicado para cada cepa.

Los datos obtenidos para la cepa T_4 se encuentran en la Tabla IV-4 y la representación gráfica en la Figura IV-4. Una comparación de los valores máximos de D.O. de los diferentes medios con el del control permite ver que en los medios en donde el NaHCO_3 fue sustituido por las sales de calcio y en donde se incrementó la concentración del NaMoO_4 y del KH_2PO_4 , la cepa acusó un desarrollo notablemente inferior. En el caso del Ca(OH)_2 el D.O. máximo fue de 0.72 a los 5 días, para el CaSO_4 fue de 0.46 a los 3 días, para el NaMoO_4 (5 ppm) fue de 0.58 a los 5 días y de 0.75 a los 9 días para el NaMoO_4 (10 ppm); para el KH_2PO_4 fue de 0.6 a los 5 días por un valor de D.O. de 0.68-1 para el control a los días 3-5. Con las suplementaciones nitrogenadas y con el extracto de levadura el efecto fue positivo. En los 4 medios se alcanzó un valor máximo de D.O. superior al del control que fue de 1.15 a los 7 días. Para el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el valor máximo de D.O. fue de 1.5 a los 5 días siendo en el mismo días de 1.45 para el NH_4Cl y de 1.2 para la peptona de soya. Con el extracto de levadura se alcanzó el valor de D.O. máximo un poco antes de 1.4 a los 3 días aunque en es te mismo día con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se alcanzaba un valor de D.O. superior de 1.45.

A la luz de estos resultados se pudo concluir que la suplementación del medio Lipman con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ favoreció con mayor intensidad el desarrollo de la cepa T_4 .

En la tabla IV-5 presentamos los datos obtenidos para la cepa T_1 . La

representación gráfica corresponde a la Figura IV-5. Al comparar los valores de D.O. máximos de los diferentes medios con el del medio control, se observa que con la suplementación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4Cl y con la sustitución de NaHCO_3 por el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se pudo rebasar el valor máximo de D.O. del control que fue de 1.2 a los 5 días. En el caso del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el valor máximo de D.O. fue de 1.5 a los 3 días, para el NH_4Cl fue de 1.4 a los 5 días y para el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ de 1.3 en el mismo día. El incremento de concentración en el NaMoO_4 (5 y 10 ppm) y en el KH_2PO_4 (0.8 g/l) no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo de la cepa T_1 alcanzándose en estos medios el mismo valor de D.O. máximo que en el control de 1.2 a los 5 días. Con el extracto de levadura, la situación fue igual sólo que el valor máximo de 1.2 de D.O. se alcanzó 2 días anteriores, al día 3. Efectos negativos se encontraron con la suplementación con la peptona de soya y por la sustitución del NaHCO_3 por el CaSO_4 . El crecimiento de la cepa en estos medios fue inferior al crecimiento en el medio control obteniéndose un valor máximo de D.O. de 0.9 a los 3 días para la peptona de soya y de 0.8 para el CaSO_4 a los 5 días.

En consecuencia, la suplementación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por permitirle a la cepa T_1 alcanzar su crecimiento máximo en el menor tiempo fue la más adecuada.

Para las dos cepas, la T_1 y la T_2 , la suplementación del medio líquido Lipman con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resultó en el mayor crecimiento con un valor de D.O. de 1.5 para ambas. A causa de esta similitud y debido a que los trabajos para lograr su plena identificación estaban ya muy avanzados,

se decidió seguir utilizando la cepa T₄ para los siguientes experimentos.

EXPERIMENTO 3.

EFFECTO DE MAYORES NIVELES DE SUPLEMENTACION.

Se decidió a continuación determinar el efecto de mayores niveles de suplementación en el medio Lipman sobre el desarrollo de la cepa T₄. Se empleó ahora una concentración de 5 g/l tanto de sulfato de amonio como de extracto de levadura ya que con 1 g/l de ambos se pudo alcanzar en el experimento previo un valor de D.O. máximo de 1.5 y 1.4 respectivamente (Figura IV-4). El experimento fue llevado a cabo por duplicado a 28°C.

Los diferentes resultados se presentan en la Tabla IV-6. Allí se observa que en el caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a los 6 días se alcanzó el valor máximo de D.O. para las dos concentraciones con un valor de 1.5 para la concentración de 1 g/l y de 1.4 para la concentración de 5 g/l. En el caso del extracto de levadura la situación fue diferente. Con la concentración de 5 g/l se llegó a los 5 días a un valor máximo de D.O. de 1.5 mientras que con la concentración de 1 g/l el valor de D.O. máximo fue de 1.4 a los 6 días.

Así, el aumentar la concentración de estos suplementos no proporcionaba ningún beneficio en el crecimiento de la cepa T₄ en medio líquido Lipman. El máximo valor de D.O. de 1.5 obtenido con 1 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no se pudo superar, y por lo tanto, se decidió utilizar este nivel de suplementación para los próximos experimentos.

EXPERIMENTO 4.

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON VITAMINAS SOBRE EL DESARROLLO DE LA CEPA T₄.

Se pensó que la adición de vitaminas al medio líquido Lipman suplementado con 1 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ podría ocasionar un incremento en el desarrollo de la cepa T₄ partiendo del hecho de que con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el extracto de levadura se encontraron valores máximos de D.O. superiores al control. El experimento se hizo durante 8 días a 28°C.

Los resultados presentados en la Tabla IV-7 revelan que sin y con vitaminas el crecimiento de la cepa fue similar. El valor máximo de D.O. fue en ambos casos de 1.5, el cual se obtuvo a los 5 días.

EXPERIMENTO 5.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA.

Ya que la inoculación del medio de plátano con la cepa T₄ se iba a efectuar en forma líquida lo que provocaba una dilución del medio y por lo tanto la disminución de la concentración inicial de sacarosa (15-20%), se decidió estudiar el efecto de menores concentraciones de sacarosa sobre el desarrollo de la cepa T₄ a 28°C. Para ello, se probaron concentraciones de 5, 10, 15 y 20 g/l de sacarosa utilizando las sales minerales del medio Lipman y 1 g/l de (NH₄)₂SO₄ (Sección III.4.2). Los medios fueron inoculados obviamente con la cepa T₄ y puestos en incubación a 28°C durante 8 días.

De los valores máximos de D.O. para los diferentes medios, se observa en la Tabla IV-8 que con el nivel de sacarosa de 10 g/l se alcanza otra vez el valor de D.O. máximo de 1.5. Con la concentración de 5 g/l el valor de D.O. máximo que se obtiene es de 1.4. Para las concentraciones de sacarosa superiores a 10 g/l el valor máximo de D.O. disminuye siendo de 1.2 para la concentración de 15 g/l y de 1.15 para la de 20 g/l. Es de notar que los valores máximos de D.O. se alcanzaban el mismo día para todos los medios, el día 6.

EXPERIMENTO 6.

SELECCION DE LA METODOLOGIA PARA LA FERMENTACION DEL PLATANO MADURO.

Una vez escogido el material de trabajo, los desperdicios de plátano maduro, el segundo paso consistió en determinar cual de las dos formas, a saber la pulpa o la furta entera, se prestaba mejor como sustrato para una fermentación sólida. Para ello se realizaron unos experimentos que detallamos a continuación.

6.a. Fermentación espontánea de la pulpa.

El primer estudio que se realizó fue el de fermentar espontáneamente la pulpa de plátano. La fermentación espontánea de un medio se define como aquella en la cual sólo interviene la microflora natural del último; otra terminología similar es la fermentación natural.

Por medio de una licuadora la pulpa de plátano fue homogenizada repartiéndola enseguida en frascos de alimento infantil de 60 ml en cada uno de tal manera que estuvieron medio llenos. Los frascos se taparon con un tapón metálico, incubando unos a 28°C y dejando otros a la temperatura ambiente. El pH inicial de la pulpa de plátano fue de 5.6. Se observó durante la fermentación la evolución del olor, la formación de estratos o capas y se midió el pH del medio. Después

de 24 horas de fermentación se encontró lo siguiente para ambas condiciones de incubación:

- 1.- En los frascos medio llenos hubo estratificación de la masa, es decir, se formaron dos capas, una sólida muy porosa arriba y otra líquida abajo. Además la masa en fermentación tendía a derramarse por el borde del frasco.
- 2.- En los frascos llenos completamente, la pérdida de masa por derramamiento fue mucho mayor y al abrir los frascos se produjo una proyección provocada por la acumulación excesiva de CO_2 .

El fuerte olor a ácido y un pH de 4.5 con producción de gas en ambos casos, revelaron que la fermentación fue muy rápida. El empleo de tapón metálico no fue conveniente ya que el CO_2 que se produce debe eliminarse y para tal efecto pareció ideal el uso de tapones de hule espuma. El experimento fue repetido con los frascos tapados ésta vez con hule espuma. Las observaciones fueron las siguientes:

1. La homogeneidad no se conservó en los frascos medio llenos, la mezcla volvió a separarse pero sin derramamiento de materia. El pH fue de 4.5.
2. En los frascos llenos completamente el uso de hule espuma no fue de ningún beneficio ya que se derramó buena parte de la masa quedando los frascos destapados. La explicación que le encontramos a eso fue por su consistencia pegajosa; la masa de plátano en contacto con el tapón hule espuma había tapado los poros y no pudiendo escapar libremente, el CO_2 , ejerció cierta presión que botó el tapón.

De allí se pudo concluir que la condición frasco medio lleno-tapón hule espuma, es la mas conveniente. Quedó por resolverse el problema de la estratificación.

6.b. Secado de la pulpa.

La gran cantidad de agua que contiene la pulpa puede ser la razón por la cual la emulsión que se obtiene al homogenizar la masa sea muy inestable. Se pensó que con la eliminación de una buena parte del agua se podría obtener una emulsión más estable.

El secado se llevó a cabo en el secador de charolas a una temperatura de 70-80°C y una presión de vacío de 1.2 Kg/cm² durante dos días, repartiéndola masa en capas de 1 cm de espesor. La operación no fue del todo satisfactoria ya que la masa seca se volvió pegajosa y gruesa lo que dificultó su manejo posterior. El secado se planteó me-

por como una alternativa para conservar el material. Pero por el costo que representa a nivel industrial secar toneladas de pulpa y mantenerlas en congelación, etc., esa alternativa fue pronto descartada.

6.c. Fermentación espontánea del plátano maduro integral.

El plátano integral (pulpa y cáscara) representa, en términos generales, la forma más económica para ser usada en esta fermentación. Se pensó que la presencia de la cáscara daría a la masa una consistencia adecuada durante la fermentación.

Después de limpiarse adecuadamente, los plátanos fueron molidos en un molino Marver. La masa fue repartida en frascos (medio llenos) y tapados con hule espuma. Las condiciones de incubación fueron las mismas que con la pulpa sola (6.a).

Después de un día de fermentación, en todos los frascos se observó es tratificación de la masa con formación de dos capas: una sólida arriba y otra líquida abajo, comportamiento similar al de los frascos con pulpa sola pero, esta vez, la fase sólida tenía mucho menos poros, la consistencia era más firme. No hubo derramamiento ni pérdida de sustancia, el pH inicial fue de 5.2 y el final de 3.1, lo que quiere decir que en este caso la fermentación fue todavía más rápida.

Luego de considerar sin éxito notable, varias alternativas como el uso de aditivos (Tween 80, aceite y grasa vegetales) y una ligera

cocción al plátano molido con cáscara para estabilizar la emulsión, se pudo solucionar este problema agitando el medio varias veces al día. Así de las observaciones anteriores se decidió realizar la fermentación utilizando como sustrato el plátano maduro integral molido, fermentándolo en frascos de alimento infantil medio llenos tapados con tapón de hule espuma y con agitación constante del medio.

EXPERIMENTO 7.

EFFECTO DE LA ADICION DE LAS SALES MINERALES LIPMAN Y DEL SULFATO DE AMONIO SOBRE EL INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEINA EN EL MEDIO DE PLATANO.

Como para la cepa T₄ se obtuvo el mayor desarrollo en el medio basal Lipman suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se creyó que la combinación de las sales minerales de este medio de cultivo con el sulfato de amonio ayudaría a la microflora natural del plátano a multiplicarse mejor durante la fermentación y por lo tanto, en comparación con la fermentación de plátano solo, obtener un incremento mayor del contenido de protefna. Se consideró un litro de plátano molido con cáscara como equivalente a un litro de medio Lipman añadiendo así las sales minerales en las concentraciones especificadas para éste volumen de medio y 1g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los frascos fueron incubados a 28°C, haciéndose el experimento por duplicado. La determinación de protefna se hizo por el método MicroKjeldahl (Sección III-5.3).

De los datos presentados en la Tabla IV-9, se observa que el mayor incremento en el contenido de protefna se obtuvo para la combinación de las sales minerales Lipman y del sulfato de amonio encontrándose un aumento de 6.12 a 8.48%. Para el medio de plátano adicionado de las sales minerales Lipman el incremento fue de 5.26 a 7.29% indicando una aportación positiva de estas sales en comparación con el incremento inferior registrado con el plátano solo, de 5.18 a 6.98%.

EXPERIMENTO 8.

EFFECTO DE LA INOCULACION SOBRE EL INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEINA DEL MEDIO DE PLATANO SUPLEMENTADO CON LAS SALES MINERALES LIPMAN Y EL SULFATO DE AMONIO.

En el experimento anterior como se obtuvo un mayor incremento del nivel de protefna en el medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el sulfato de amonio, se pensó que con la inoculación de este medio con la cepa T, el aumento del contenido de protefna iba ser mucho mayor.

Se prepararon dos medios, uno con inóculo y otro sin inóculo. La inoculación se hizo en forma concentrada según se detalló en la Sección III.3.2. El experimento se hizo por duplicado durante 16 días de fermentación a 28°C.

Sorpresivamente los resultados de la Tabla IV-10 muestran que en el medio de plátano suplementado con las sales minerales y el sulfato de amonio sin inóculo, el incremento del contenido de protefna fue muy superior partiendo de un valor de 6.42 hasta alcanzar un valor máximo de 10.35 a los 8 días mientras que para el medio con inóculo, el mismo día el contenido de protefna se elevaba de 6.33 a 8.69 para luego subir a 8.82 en el último día.

EXPERIMENTO 9.

A partir de las informaciones preliminares del efecto de la composición del medio y de la inoculación, se desarrolló un experimento más completo con tres medios de plátano que fueron fermentados de manera diferente, a saber: espontáneamente (sin inoculación) y con inoculación (cepa T₄) tanto en medio de plátano no esterilizado como esterilizado.

Las diferentes preparaciones para efectuar el experimento se resumen en la Tabla III-1. El experimento se llevó a cabo por duplicado durante 13 días de fermentación a 28°C.

Al comparar los resultados presentados en la Tabla IV-11 con representación gráfica en la Figura IV-6, nos damos cuenta de que el medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el (NH₄)₂SO₄ sin inoculación, presenta otra vez la mayor elevación del contenido de protefna de 5.76 a 14.9%. Enseguida encontramos el medio de plátano solo fermentado con inóculo de T₄, con un aumento de 6.17 a 13.57% y finalmente el medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el (NH₄)₂SO₄ fermentado con inóculo de T₄, con una variación de 5.97 a 12.24%.

EXPERIMENTO 10.

Se pensó que al emplear las zoogreas, mezclas de bacterias fijadoras de nitrógeno T₁-T₆ y de levaduras para inocular el medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el sulfato de amonio, se podría aumentar aún más su contenido de proteína ya que con la T₄ sola no se pudo superar este valor. Al mismo tiempo se probó la inoculación con otra cepa fijadora de nitrógeno de colección como es la *Beijerinckia indica*.

El experimento se hizo por duplicado durante 13 días de fermentación a 28°C. Aparte del contenido de proteína, se determinó la digestibilidad proteínica *in vitro* (Sección III-5) y algunas características bioquímicas de los medios fermentados como el contenido de ácidos grasos volátiles AGV's y etanol (Sección III-5).

Los resultados de la Tabla IV-12 revelan que una vez más la mayor elevación del contenido de proteína (de 6.09 a 15.05) se obtuvo con el medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el (NH₄)₂SO₄ fermentado sin inoculación. Prácticamente se alcanzó el mismo resultado tanto con la inoculación con las zoogreas que con la *Beijerinckia indica* de 7.12 a 12.69% y de 7.18 a 12.37% respectivamente. La inoculación con la cepa T₄ acusó un incremento ligeramente superior de 6.99 a 13.11.

Por lo que toca a la digestibilidad de la proteína (Tabla IV-12), se vio que aumentó por medio de la fermentación en los tres casos y que

el valor máximo (42.11%) se obtuvo en el medio de plátano fermentado con inóculo de T_4 . Al medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el $(NH_4)_2SO_4$, le correspondió el valor más bajo de 22.40% y con las zoogreas un valor intermedio de 36.79%. Para el control el % de digestibilidad fue de 15.25.

De las características bioquímicas se dedujo que tanto en la fermentación natural (sin inóculo) como en las fermentaciones con inóculo se producía una mayor cantidad de ácido láctico que de ácido acético al término de los 13 días. La producción de cantidades grandes de ácido acético en el medio de plátano inoculado con T_4 (28 g/l al día 13) y en el medio inoculado con las zoogreas (36.06 g/l al día 9) se puede explicar considerando que con estas cepas se elabora el "vinagre de tибicos" a partir del jugo de algunas frutas.

TABLA IV-1. DESARROLLO DE LA CEPA T₁ EN MEDIO LIQUIDO LIPMAN CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO A 28 y 35°C.

FUENTES DE CARBONO (10 g/l)	TEMP.	DENSIDAD OPTICA								
		DIAS DE INCUBACION								
		0	1	2	5	7	9	11	13	15
Almidón	28°C	0.27	0.27	0.26	0.48	0.60	0.75	0.84	0.85	0.90
	35°C	0.28	0.31	0.23	0.32	0.41	0.50	0.51	0.52	0.50
Fosfato de celulosa	28°C	0.06	0.25	0.58	0.42	0.48	0.52	0.58	0.54	0.54
	35°C	0.06	0.45	0.68	0.54	0.70	0.70	0.64	0.64	0.75
Glucosa	28°C	0.06	0.10	0.22	0.62	0.67	0.69	0.72	0.72	0.75
	35°C	0.05	0.12	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Sacarosa	28°C	0.05	0.12	0.64	1.00	1.00	0.88	0.90	0.90	0.90
	35°C	0.04	0.14	0.52	0.51	0.48	0.48	0.48	0.45	0.45

Los valores presentados en esta tabla son el promedio de las lecturas casi siempre iguales de dos matraces. Las pocas veces que había una diferencia entre ellos, no era superior a 0.05.

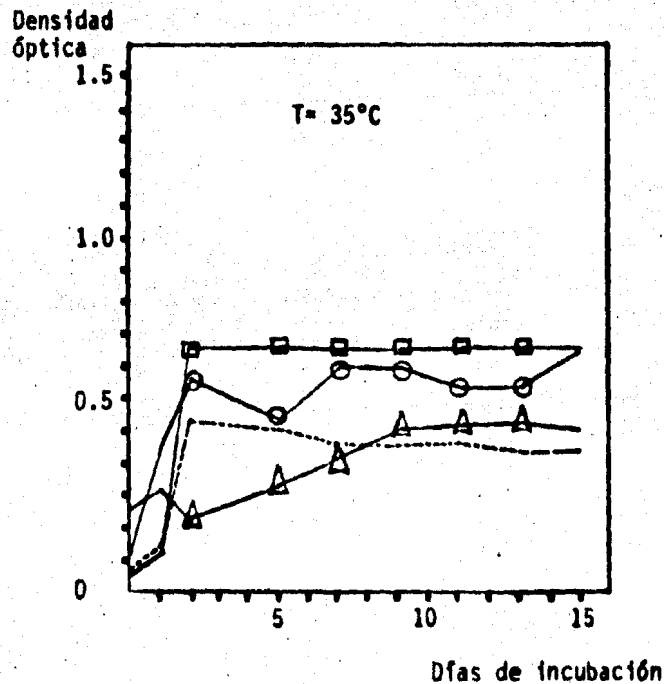
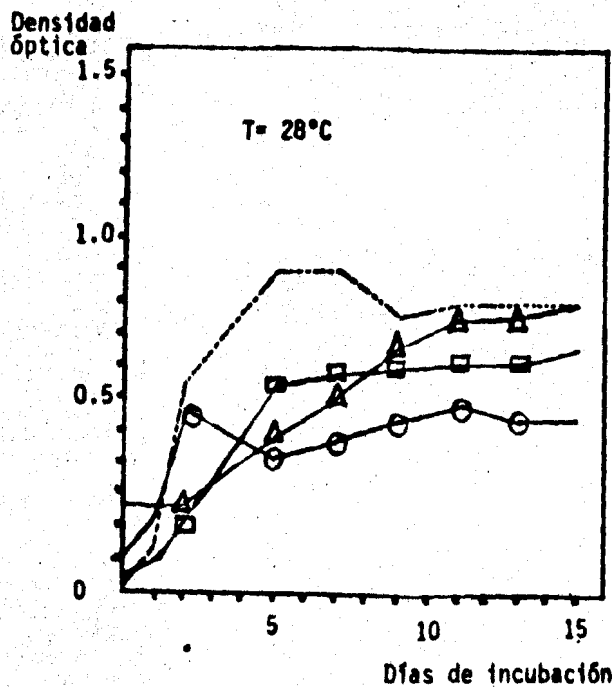


FIGURA IV-1. Desarrollo de la cepa T_1 (densidad óptica) a 28°C y 35°C en el medio basal Lipman (-) y empleando otras fuentes de carbono como la glucosa (=), el fosfato de celulosa (o) y el almidón (Δ).

* (-) = sacarosa

TABLA IV-2. DESARROLLO DE LA CEPA T₆ EN MEDIO LIPMAN CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO A 28 y 35°C.

FUENTES DE CARBONO (10 g/l)	TEMP.	DENSIDAD OPTICA								
		DIAS DE INCUBACION								
		0	1	2	5	7	9	11	13	15
Almidón	28°C	0.30	0.27	0.20	0.27	0.31	0.34	0.41	0.44	0.46
	35°C	0.30	0.28	0.19	0.27	0.28	0.32	0.33	0.32	0.33
Fosfato de celulosa	28°C	0.07	0.20	0.52	0.52	0.68	0.62	0.64	0.57	0.62
	35°C	0.07	0.59	0.64	0.64	0.73	0.70	0.68	0.66	0.76
Glucosa	28°C	0.06	0.07	0.17	0.70	0.90	1.10	1.10	1.2	1.2
	35°C	0.06	0.07	0.35	0.70	0.71	0.75	0.79	0.82	0.82
Sacarosa	28°C	0.06	0.14	0.72	0.90	1.20	1.20	1.20	1.25	1.25
	35°C	0.06	0.43	0.78	0.75	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80

Los valores presentados en esta tabla son el promedio de las lecturas casi siempre iguales a dos matraces. Las pocas veces que habia una diferencia entre ellos, no era superior a 0.05.

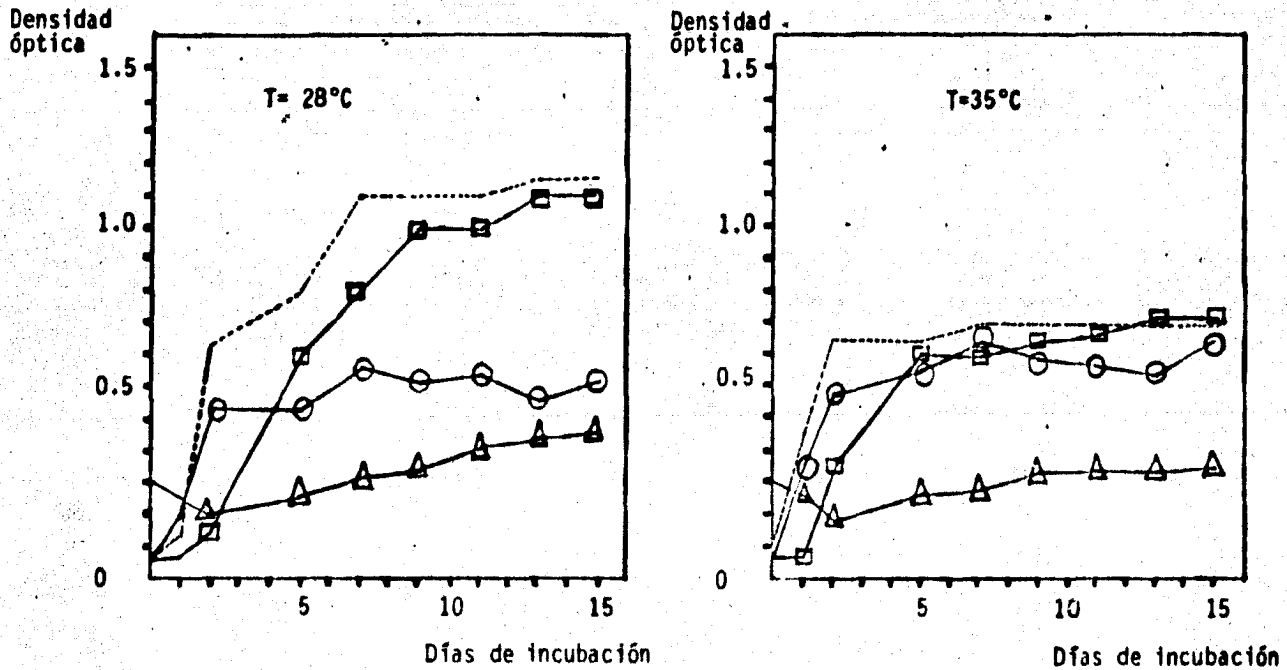


FIGURA IV-2. Desarrollo de la cepa T. (densidad óptica) a 28°C y 35°C en el medio basal Lipman (-) y empleando otras fuentes de carbono como la glucosa (■), el fosfato de celulosa (○) y el almidón (Δ).

TABLA IV-3. DESARROLLO DE LA CEPA T₆ EN MEDIO LIPMAN CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO A 28 Y 35°C.

FUENTES DE CARBONO (10 g/l)	TEMP.	DENSIDAD OPTICA								
		DIAS DE INCUBACION								
		0	1	2	5	7	9	11	13	15
Almidón	28°C	0.23	0.24	0.22	0.38	0.42	0.40	0.39	0.32	0.32
	35°C	0.23	0.22	0.15	0.17	0.14	0.16	0.16	0.16	0.17
Fosfato de celulosa	28°C	0.03	0.10	0.27	0.34	0.35	0.38	0.45	0.54	0.54
	35°C	0.03	0.13	0.16	0.16	0.36	0.36	0.35	0.34	0.35
Glucosa	28°C	0.01	0.02	0.13	0.40	0.46	0.46	0.33	0.30	0.28
	35°C	0.01	0.01	0.01	0.10	0.09	0.10	0.10	0.11	0.11
Sacarosa	28°C	0.03	0.05	0.15	0.30	0.30	0.32	0.50	0.40	0.38
	35°C	0.01	0.06	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.07	0.07

Los valores presentados en esta tabla son el promedio de las lecturas casi siempre iguales de dos matraces. Las pocas veces que había una diferencia entre ellos, no era superior a 0.05.

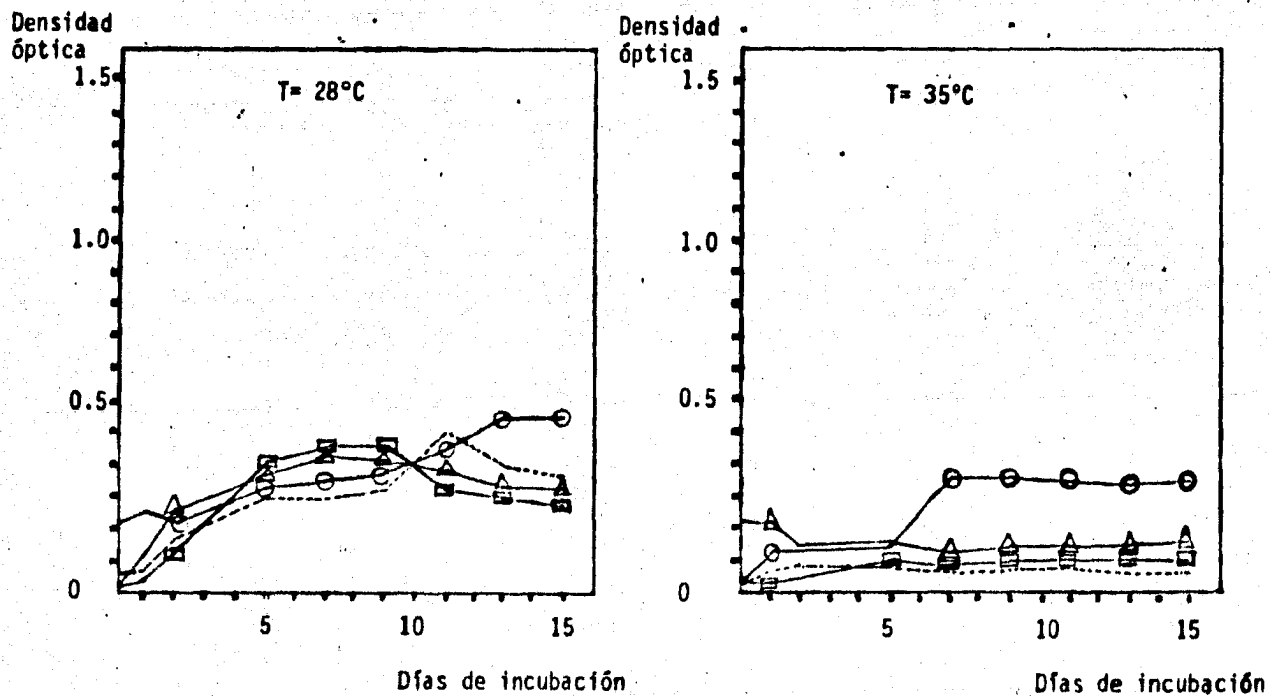


FIGURA IV-3 Desarrollo de la cepa T_c (densidad óptica) a 28°C y 35°C en el medio basal Lipman (-) y empleando otras fuentes de carbono como la glucosa (=), el fosfato de celulosa (>) y el almidón (Δ).

TABLA IV-4 EFECTO DE LAS MODIFICACIONES AL MEDIO LIPMAN SOBRE EL DESARROLLO DE LA CEPA T, A 28°C.

M E D I O S	DENSIDAD OPTICA					
	Días de incubación					
	0	1	3	5	7	9
Medio Lipman (Control)	0.04	0.19	0.68	1.00	1.15	1.15
<u>Suplementación:</u>						
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05	0.14	0.45	1.50	1.50	1.35
NH ₄ CL	0.05	0.18	1.05	1.45	1.40	0.95
Extracto de levadura	0.07	0.75	1.40	1.40	1.40	1.00
Peptona de soya	0.07	0.64	0.98	1.20	1.20	0.80
<u>Sustitución de NaHCO₃ por:</u>						
Ca(OH) ₂	0.05	0.35	0.26	0.72	0.58	0.60
CaSO ₄	0.05	0.37	0.46	0.43	0.40	0.30
<u>Incremento de concentración en:</u>						
NaMoO ₄ (5 ppm)	0.04	0.10	0.54	0.58	0.33	0.58
NaMoO ₄ (10ppm)	0.04	0.12	0.47	0.64	0.22	0.75
KH ₂ PO ₄ (0.8 g/ℓ)	0.04	0.14	0.56	0.60	0.50	0.19

NOTA: Valores promedio de las lecturas de dos matraces, la diferencia entre las diferentes lecturas no era superior a 0.04.

Densidad
óptica

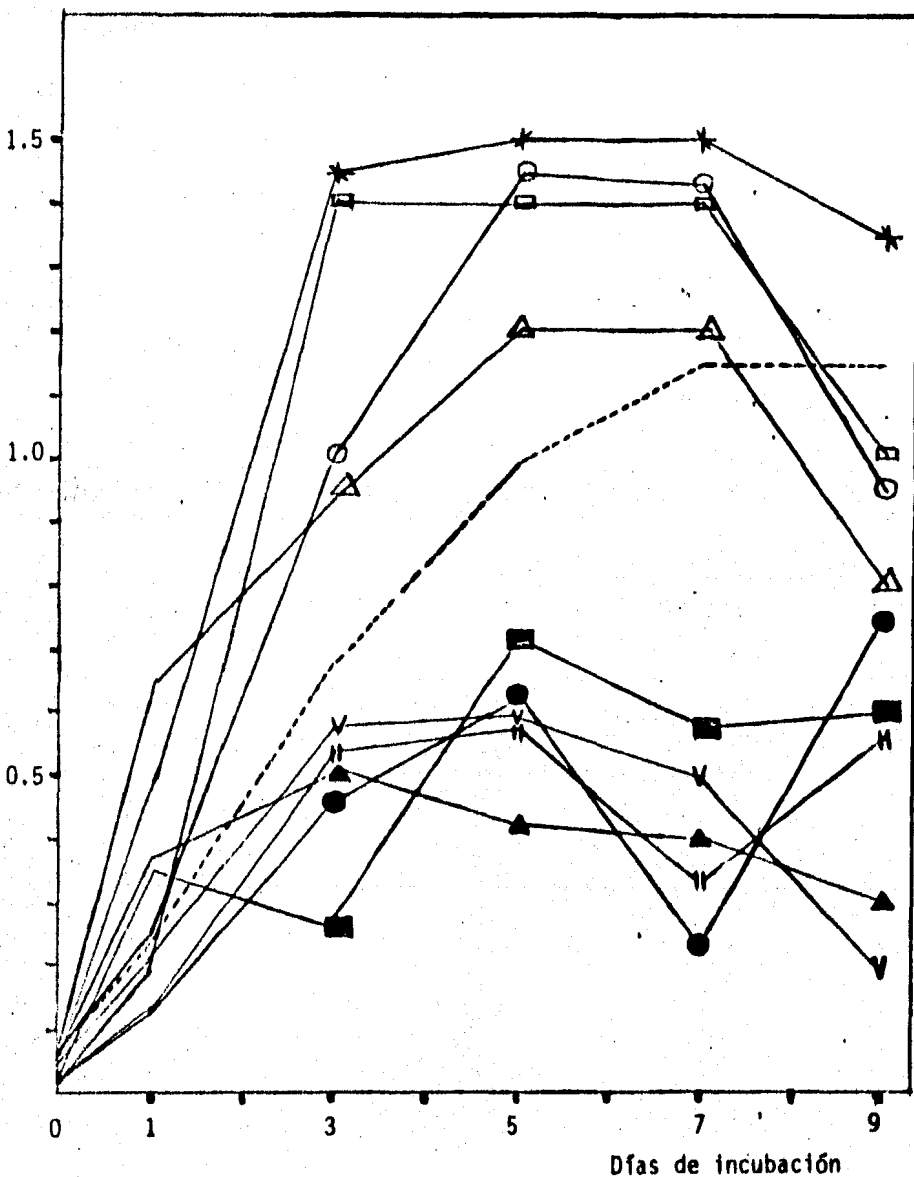


FIGURA IV-4 Efecto de las suplementaciones con: $(NH_4)_2SO_4$ (*), NH_4Cl (o), extracto de levadura (=) y peptona de soja (Δ); de la sustitución de $NaHCO_3$ por: $Ca(OH)_2$ (=), el $CaSO_4$ (Δ), del incremento de concentración de: $NaMoO_4$, 5 ppm (•) $NaMoO_4$, 10 ppm (•) y de KH_2PO_4 , 8 g/l (v) en el medio de cultivo Lipman (•) sobre el desarrollo de la cepa T, a 28°C midiendo la variación de la densidad óptica durante 9 días de incubación.

TABLA IV-5. EFECTO DE LAS MODIFICACIONES AL MEDIO LIPMAN SOBRE EL DESARROLLO DE LA CEPA T₁ A 28°C.

MEDIOS	DENSIDAD OPTICA					
	Días de Incubación					
	0	1	3	5	7	9
Medio Lipman (Control)	0.04	0.12	0.90	1.20	1.00	0.95
<u>Suplementación con:</u>						
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.04	0.62	1.50	1.50	1.50	1.20
NH ₄ Cl	0.04	0.52	1.39	1.40	1.40	1.39
Extracto de levadura	0.06	0.95	1.20	1.00	0.95	0.70
Peptona de soya	0.06	0.80	0.90	0.85	0.85	0.47
<u>Sustitución de NaHCO₃ por:</u>						
Ca(OH) ₂	0.04	0.15	1.00	1.30	1.20	0.56
CaSO ₄	0.04	0.16	0.64	0.80	0.78	0.60
<u>Incremento de concentración en:</u>						
NaMoO ₄ (5 ppm)	0.04	0.10	0.95	1.20	1.00	0.98
NaMoO ₄ (10 ppm)	0.04	0.20	0.99	1.20	1.00	0.66
KH ₂ PO ₄ (0.8 g/l)	0.05	0.13	1.00	1.19	0.97	0.61

Nota: Valores promedio de las lecturas de dos matraces, la diferencia entre las diferentes lecturas no era superior a 0.04.

Densidad
óptica

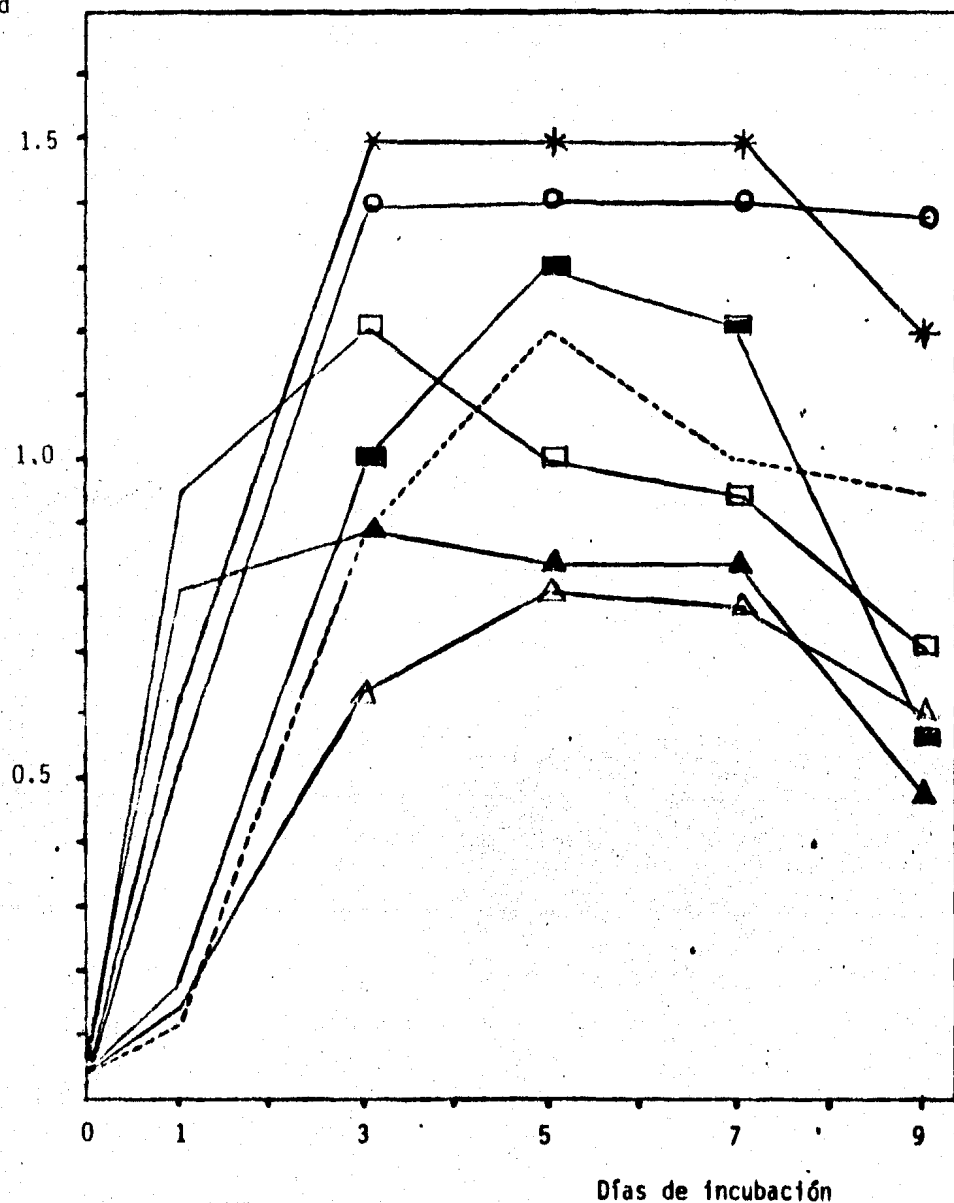


FIGURA IV-5. Efecto de las suplementaciones con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (*), NH_4Cl (o), extracto de levadura (■) y peptona de soya (Δ), de la sustitución del NaHCO_3 por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (□) y el CaSO_4 (Δ) en el medio Lipman sobre el desarrollo de la cepa T_1 a 28°C , midiendo la variación de la densidad óptica durante 9 días de incubación.

TABLA IV-6. EFECTO DEL NIVEL DE SUPLEMENTACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Y EXTRACTO DE LEVADURA EN EL MEDIO LIPMAN SOBRE EL DESARROLLO DE LA CEPA T, DURANTE 8 DIAS DE INCUBACION A 28°C.

SUPLEMENTO		DENSIDAD OPTICA						
		Días de Incubación						
		0	2	3	4	5	6	8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/l	0.11	0.17	0.62	1.40	1.40	1.50	1.45
		0.08	0.20	0.60	1.20	1.45	1.50	1.45
	5 g/l	0.16	0.50	1.20	1.21	1.30	1.40	1.35
		0.15	0.50	1.20	1.20	1.30	1.40	1.40
Extracto de levadura	1 g/l	0.11	0.75	1.10	1.20	1.21	1.40	1.35
		0.13	0.75	1.20	1.20	1.21	1.40	1.30
	5 g/l	0.14	1.20	1.40	1.40	1.50	1.50	1.50
		0.14	1.20	1.40	1.40	1.50	1.50	1.50

Cada valor representa el promedio de dos lecturas obtenidas para un matraz con una diferencia no mayor de 0.1 entre ellas.

TABLA IV-7. EFECTO DE LA ADICION DE VITAMINAS AL MEDIO LIPMAN SUPLEMENTADO CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ SOBRE EL DESARROLLO DE LA CEPA T₆ A 28°C.

SUPLEMENTO $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l	DENSIDAD OPTICA						
	Días de incubación						
	0	2	4	5	6	7	8
Sin vitaminas	0.12	0.50	1.40	1.50	1.50	1.45	1.40
Con vitaminas (0.2 g/l)	0.21	0.24	1.40	1.50	1.50	1.50	1.50

Promedio de dos lecturas para un sólo matraz con una diferencia no mayor de 0.1 entre ellas.

TABLA IV-8. EFECTO DEL NIVEL DE SACAROSA EN EL MEDIO LIPMAN SUPLEMENTADO CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1g/l) SOBRE EL DESARROLLO DE LA CEPA T₄ A 28°C.

CONCENTRACION DE SACAROSA g/l	DENSIDAD OPTICA				
	Días de incubación				
	0	2	4	6	8
5	0.05	0.15	1.30	1.40	1.25
	0.04	0.18	1.20	1.40	1.15
10	0.06	0.13	0.85	1.5	1.45
	0.05	0.14	1.20	1.5	1.40
15	0.04	0.18	1.00	1.20	1.10
	0.04	0.18	1.00	1.20	1.00
20	0.04	0.28	0.95	1.15	1.10
	0.05	0.23	0.90	1.15	1.00

Cada valor representa el promedio de dos lecturas para cada matraz con una diferencia no mayor de 0.1 entre ellas.

TABLA IV-9. EFECTO DE LA ADICION DE LAS SALES MINERALES DEL MEDIO LIPMAN Y DEL SULFATO DE AMONIO (1g/l) SOBRE EL INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEINA EN EL MEDIO DE PLATANO MOLIDO CON CASCARA DURANTE 5 DIAS DE FERMENTACION A 28°C Y SIN INOCULACION.

MEDIO DE PLATANO MOLIDO CON CASCARA	CONTENIDO DE PROTEINA (% EN BASE SECA)	
	INICIAL	FINAL
Sin suplemento	5.18	6.98
Suplementado con las sales minerales Lipman	5.26	7.29
Suplementado con las sales minerales Lipman y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.12	8.48

Valores promedio de dos determinaciones de un sólo frasco con una diferencia no mayor de 0.02 entre ellos.

TABLA IV-10. CAMBIO DEL CONTENIDO DE PROTEINA DURANTE LA FERMENTACION A 28°C DEL MEDIO DE PLATANO SUPLEMENTADO CON LAS SALES MINERALES DEL MEDIO LIPMAN Y EL $(NH_4)_2SO_4$ CON Y SIN INOCULACION CON LA CEPA T₆.

MEDIO DE PLATANO SUPLEMENTADO	CONTENIDO DE PROTEINA (% EN BASE SECA)					
	Días de Incubación					
	0		8		16	
Con inóculo	$X_1 = 6.45$ $X_2 = 6.11$	$\bar{X} = 6.28$	$X_1 = 8.91$ $X_2 = 8.48$	$\bar{X} = 8.69$	$X_1 = 8.74$ $X_2 = 8.91$	$\bar{X} = 8.82$
Sin inóculo	$X_1 = 6.28$ $X_2 = 5.94$	$\bar{X} = 6.11$	$X_1 = 10.35$ $X_2 = 10.35$	$\bar{X} = 10.35$	$X_1 = 10.18$ $X_2 = 9.93$	$\bar{X} = 10.05$

Cada valor (X_1 ; X_2) representa el promedio de dos determinaciones para un frasco con una diferencia no mayor de 0.5 entre ellos.

TABLA IV-11. EFECTO DE LA COMPOSICION DEL MEDIO Y DEL TIPO DE FERMENTACION (NATURAL O INOCULADA) SOBRE EL CAMBIO DEL CONTENIDO DE PROTEINA.

COMPOSICION DEL MEDIO	CONTENIDO DE PROTEINA (% EN BASE SECA)											
	MEDIO NO ESTERILIZADO								MEDIO ESTERILIZADO			
	SIN INOCULACION				CON INOCULACION				CON INOCULACION			
	Días de Incubación				Días de Incubación				Días de Incubación			
	0	5	9	13	0	5	9	13	0	5	9	13
1. Plátano sólo	5.06	7.24	10.35	10.40	6.17	8.84	12.32	13.56	5.90	6.12	7.25	6.09
	-	7.09	10.06	10.24	-	9.85	11.95	13.15	-	6.04	7.25	5.91
2. Plátano suplementado con las sales Lipman	5.16	7.66	11.06	9.91	5.43	10.06	10.39	10.87	6.15	7.24	7.75	7.20
	-	7.53	10.48	9.02	-	11.15	11.10	11.00	-	7.00	7.56	7.26
3. Plátano suplementado con sales Lipman y 1g/l (NH ₄) ₂ SO ₄	5.76	10.88	10.15	14.50	5.97	8.19	10.94	12.24	6.74	7.72	7.83	8.06
	-	10.72	10.15	14.12	-	7.95	10.84	12.08	-	7.51	7.71	7.76

Valores promedio de dos determinaciones para un frasco con una diferencia no mayor de 0.5 entre ellas.

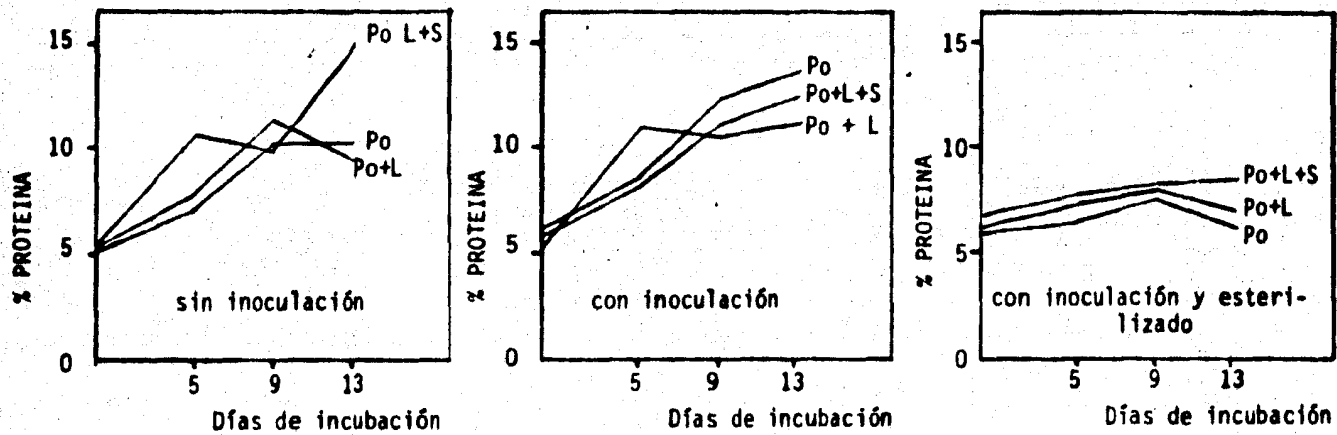


FIGURA IV-6 Variación del contenido de proteína en el medio de plátano (Po) y suplementado con las sales minerales Lipman solas (Po+L) o adicionadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Po+L+S).

2

TABLA IV-12. CONTENIDO DE PROTEINA (Y SU DIGESTIBILIDAD) EN EL MEDIO DE PLATANO FERMENTADO A 28°C DURANTE 13 DIAS POR LA ACCION DE LA MICROFLORA NATURAL, LA INOCULACION CON LA CEPA T₄ Y CON LAS ZOOGLEAS Y LA *Beijerinckia indica*.

TIPO DE INOCULACION	CONTENIDO DE PROTEINA (% en base seca)				DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEINA (%)	
	Días de Incubación				Días de Incubación	
	0	5	9	13	0	13
Sin inoculación	60.9	9.02	11.40	14.48	15.25	22.40
	-	10.00	13.04	15.05		
Con la Cepa T ₄	6.99	8.18	10.73	12.31	-	42.11
	-	8.75	11.64	13.11		
Con las Zoogreas	7.12	8.80	12.54	12.69	-	36.79
	-	8.48	11.09	11.54		
Con Beijerinckia Indica	7.18	9.09	10.78	12.37	-	N.D.
	-	N.D.	10.54	11.99		

Cada valor representa el promedio de dos determinaciones para un frasco con una diferencia no mayor de 0.5 entre ellas.

N.D. No se determinó.

TABLA IV-13. PARAMETROS BIOQUIMICOS DE LA FERMENTACION SIN Y CON INOCULACION DEL MEDIO DE PLATANO SUPLEMENTADO CON LAS SALES MINERALES Y EL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ DURANTE 13 DIAS A 28°C.

DETERMINACIONES (g/l)	SIN INOCULACION				INOCULADO CON CEPA T ₄				INOCULADO CON ZOOGLEAS			
	Días de incubación				Días de incubación				Días de incubación			
	0	5	9	13	0	5	9	13	0	5	9	13
Acido láctico	27.60	34.70	42.02	46.86	9.13	20.18	33.92	38.78	15.87	19.82	19.89	48.58
Acido acético	3.63	5.17	10.98	2.48	4.68	7.22	24.86	28.0	1.07	27.66	36.06	18.39
Acido propiónico	0.14	1.16	0.02	0.03	0.91	1.29	0.18	-	-	-	0.14	0.01
Acido butírico	0.16	1.18	0.01	0.04	0.66	0.01	0.05	-	-	-	-	-
Etol	0.04	0.10	0.21	0.05	0.12	2.17	0.88	1.23	1.28	5.44	0.87	0.05
pH	6.4	4.0	3.9	3.9	6.1	4.2	3.8	3.8	6.1	4.1	3.8	4.0

Nota: Los valores presentados son el promedio de tres determinaciones para cada muestra.

V. DISCUSION.

A través de los experimentos realizados durante el presente trabajo, se ha podido encontrar una metodología para aumentar por fermentación sólida, el contenido de proteína de los desperdicios de plátano maduro con el objeto de elaborar un alimento animal destinado principalmente a monogástricos. En la literatura se había reportado el empleo de *Aspergillus niger* para enriquecer proteínicamente por fermentación sólida el contenido de proteína de ciertos desperdicios almidonosos como la yuca, la papa, el plátano macho (J.C. Senez, 1980), pero hasta la fecha ninguna cepa bacteriana había sido utilizada con este fin y menos con los desperdicios azucarados de frutas. En este proyecto se propuso y se logró enriquecer por fermentación sólida empleando cepas bacterianas, el contenido de proteína de los desperdicios de plátano maduro integral.

Para ello se usaron cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno provenientes de los tíficos (Sección III-1). En la primera parte del proyecto se determinaron experimentalmente las condiciones ideales para el crecimiento óptimo de estas cepas y, posteriormente, se adaptaron los resultados obtenidos a la fermentación del medio de plátano.

La capacidad de las cepas bacterianas de los tíficos para asimilar la sacarosa, la glucosa, la celulosa y el almidón, fue estudiada. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar dos cepas, la T₁ y la

T₄. Seguidamente se buscó optimizar su crecimiento modificando el me dio basal Lipman encontrándose para ellos un nivel de crecimiento mayor al suplementarlo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/l). Para ambas cepas el valor de densidad óptima máximo fue de 1.5. No habiendo detectado una diferencia en el comportamiento de estas dos cepas se seleccionó definitivamente la cepa T₄ que fue identificada posteriormente como *Klebsiella oxytoca* (comunicación personal de C. Salinas. Instituto de Biología, UNAM). En el medio suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l se probaron los efectos de la adición de vitaminas y de diferentes concentraciones de sacarosa buscando obtener todavía un mayor crecimiento de esta cepa. En el primer caso no se notó ningún efecto superior y, en el segundo, a una concentración de sacarosa mayor de 10%, el crecimiento tendía a disminuir. Tampoco se pudo incrementar el desarrollo de la cepa al emplear cantidades mayores de suplementos [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o extracto de levadura (5 g/l)]. Una vez establecidas las condiciones de máximo cre cimiento para la cepa T₄, es decir medio basal Lipman suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l se planteó adecuar el medio de plátano a las características exigidas por la fermentación sólida.

Se comenzó por resolver unos problemas relacionados con el material de fermentación y con el sustrato que tendía a separarse en dos capas durante la fermentación espontánea logrando evitar esta dificultad con la agitación constante del medio. Después de reunir todos los aspectos relevantes se montó un experimento que englobaba todos ellos. Así se prepararon 3 medios de plátano: plátano sólo, plátano adiciona do de sales minerales Lipman (se consideraba un litro de medio de plá-

tano como equivalente a un litro de medio Lipman) y plátano suplementado con sales minerales Lipman y sulfato de amonio. Estos medios fueron fermentados con y sin inoculación; al mismo tiempo se estudió el efecto de la inoculación en estos mismos medios pero esterilizados para saber si la microflora natural ayudaba o cooperaba en la elevación del contenido de proteína.

De este experimento se pudieron encontrar dos posibilidades para enriquecer proteínicamente los desperdicios de plátano maduro: una, la fermentación del plátano integral sin inóculo y suplementado con las sales minerales Lipman y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la otra posibilidad consistiendo en inocular el plátano con una cepa bacteriana fijadora de nitrógeno aislada de los tíficos, que fue la cepa T₄.

Finalmente, utilizando como control el medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el sulfato de amonio, se comparó el efecto de la inoculación con las zoogreas (Sección II-2), con *Beijerinckia indica* y con la cepa T₄. Una vez más, el mayor aumento en el contenido de proteína se obtuvo en el medio control y no en el medio inoculado con las zoogreas como se esperaba.

Se determinó la digestibilidad *in vitro* de la proteína para las diferentes fermentaciones y con ella, se justificó la conveniencia de la inoculación con la cepa T₄, ya que en esta forma se tuvo la mayor digestibilidad, 41%, por un valor de 32.11% para la fermentación espontánea. La digestibilidad del plátano sin fermentar fue de 15%.

La fermentación producida fue de tipo heteroláctico ya que se obtuvieron tanto en el medio de plátano sin inoculación como con inoculación (cepa T, o zoogreas) mayores cantidades de ácido láctico como de ácido acético (Tabla IV-13). El nivel de ácido láctico obtenido le proporciona al producto ciertas cualidades (sanidad, conservación fácil y buen olor) como para ser utilizado en la nutrición animal.

En resumen, las principales observaciones y explicaciones que se pudieron deducir de los experimentos realizados en este proyecto, fueron las siguientes:

- 1.- El límite de crecimiento alcanzado con la cepa T, no supera en ningún momento, un valor de densidad óptica de 1.5 lo que da a pensar que hay algo que inhibe el crecimiento de esta cepa a este nivel.
- 2.- Como la inoculación de los medios de plátano se hizo con 86 mg de células (determinado por el método millipore) se piensa que con una mayor cantidad de inóculo, la elevación del contenido de proteína podría ser superior.
- 3.- En el producto fermentado con las zoogreas, mezcla de bacterias fijadoras de nitrógeno y de levaduras, no se obtuvo el mayor incremento en el contenido de proteína como se esperaba; posiblemente, hay también un antagonismo entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las levaduras de las zoogreas como se detectó en el pozol*.
- 4.- La microflora normal del plátano ayudó a que se llevase mejor la

*Herrera T. y M. Ulloa, 1981).

fermentación y reveló ser necesaria en ese proceso ya que con la esterilización del medio se produjo el menor incremento en el contenido de protefna de 6 a 8% aproximadamente.

- 5.- El máximo aumento en el contenido de protefna se obtuvo siempre en el medio de plátano suplementado con las sales minerales Lipman y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- 6.- Se obtuvo para la fermentación del plátano maduro, sin suplementación, un incremento en el contenido de protefna mayor que el obtenido por Le Dividish y col. (1976) en el ensilaje del mismo producto. Los factores involucrados pueden ser:
 - a) diferentes grados de madurez de los desperdicios de plátano. Ellos utilizaban desperdicios de plátano maduro mientras que en el presente proyecto se utilizó plátano sobremaduro.
 - b) Drenaje de agua en el ensilaje lo que ocasionaba pérdida de nutrientes.

El trabajo de C. Wacher consistió esencialmente en aislar de la cáscara de plátano sobremaduro un hongo identificado como *Mucor pusillus* y que fue utilizado para la inoculación de un medio con la siguiente composición:

Carbohidratos totales de plátano	45 g/ L
Urea	3.5 g/L
KH_2PO_4	0.5 g/L
pH =	3.5

llegándose a triplicar el contenido de proteína inicial durante la fermentación (85 horas).

Una comparación con los resultados obtenidos por C. Wachter (Tabla V-1) revela que el método empleado en nuestro proyecto conduce a una mayor eficiencia en el enriquecimiento proteico de los desperdicios de plátano, y a una mayor productividad; además se requiere un menor volumen de fermentación por Kg de plátano y sin aereación. En términos de costo resulta también ser más económico.

**TABLA V-1. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR C. WACHER
(COLUMNA 1) CON LOS OBTENIDOS EN EL PRESENTE PROYECTO.
(COLUMNA 2).**

Resultados	Columna 1	Columna 2
Producto seco (Plátano + biomasa) g/ l	16.6	140
Protefna cruda del producto seco (%)	32.7	14.5
Protefna obtenida g/ l	5.42	20.30
Productividad g prot/l/h	0.063	0.067
Volumen de fermen- tación por Kg de plátano (l)	4	1.4

VI. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

El objetivo del presente trabajo fue alcanzado. Se logró desarrollar una metodología realmente sencilla y barata que permitió enriquecer proteínicamente los desperdicios de plátano maduro en condiciones no asépticas, que por lo tanto es factible de implementarse en zonas rurales. El nivel de ácido láctico obtenido garantiza cierta higieneidad al producto permitiendo su uso como un alimento animal.

Para definir y optimizar la totalidad de las variables de este proceso se sugiere repetir las condiciones que resultaron en el mayor incremento del contenido de proteína para asegurar estadísticamente si hay diferencia significativa entre ellas. Se debe asimismo probar el efecto de un inóculo más concentrado y de temperaturas superiores a 28°C en la fermentación del medio de plátano.

Enseguida se buscará adaptar esta metodología a otros desperdicios azucarados.

Se determinará la digestibilidad de la proteína *in vivo* con animales de laboratorio.

Se llevará el proceso, ya definido, a escala piloto para probar el alimento con animales monogástricos de granja.

Esperando que se encuentren todas las formas para mejorar la calidad del producto, se vota por su producción a gran escala para así con-

tribuir a la solución de la escasez y alto costo de la proteína animal principalmente en los países tercermundistas.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- Aiba S., A.E. Humphrey, N.F. Millis. 1973. Biochemical Engineering. 2nd. Ed. University of Tokyo Press. Japan.
- Altschul A.A.M. 1974. New Protein Foods. A series of monographs, Vol. 1A. Academic Press.
- Anderson D.C. 1978. Use of cereal residues in beef cattle production systems. J. Anim. Sci. 46:849.
- Ateheson J.E. 1976. Agricultural residues and other nonwood of plant fibers. Science, 191:768.
- Ayres John C., J. Orvin Mundt, William S. Sandine. 1977. Microbiology of Foods. W.H. Freeman Company, U.S.A.
- Defigueiredo Splittstoesser, 1976. Food Microbiology Public Health & Spoilage Aspects. AVI Publishing Co.
- Elizabeth J.B., W.R. Stanton y Ann Wallbridge, 1969. Fermentation methods for protein enrichment of Cassava. Biotechnology and Bioengineering Vol. XI, 1271:1284.
- Frazier W.C. 1967. Food Microbiology. 2nd. Ed. McGraw Hill Book Co. U.S.A.
- Goering T.J. 1980. Los tubérculos: potencial alimentario y energético. Rev. Finanzas y Desarrollo. México.

- Herrera T., C. Salinas Ch. y S. Palacios. 1984. (Trabajo por publicarse). Estudio de cepas de *Klebsiella oxytoca* (Flügge) Lautrop. Fijadores de nitrógeno, aisladas de las zoogreas llamadas "típicos". Instituto de Biología, Depto. de Botánica, UNAM.
- Herrera T., J. Taboada y M. Ulloa. 1974. Fijación de nitrógeno en el Tesgüino y el Pulque. An. Inst. Biol. UNAM, Ser. Biol. Exp. (1):77-78.
- Herrera T. y J. Taboada. 1971. Estudio sobre inhibidores de la fijación de nitrógeno en *Agrobacterium azotophilum*. An. Inst. Biol. UNAM, Ser. Biol. Exp. (1):23-30.
- Herrera T. y M. Ulloa. 1975. Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunos patógenos del hombre. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 17:143-147.
- Hesseltine C.W. 1972. Solid state fermentation. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XIV. 517-532.
- Jnanendra K. Bhattacharjee, 1973. Microorganisms as potential source of food. Dept. of Microbiology. Miami University. U.S.A.
- Kargi F., M.L. Shuller. 1980. Continuous aerobic conversion of poultry waste into single-cell protein. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXII, 1567-1600.
- Le Dividish J., A.L. Aumaire, B. Seve. 1976. Utilization of tropical plants rich in starch for pig feeding. Institut National de la Recherche Agronomique. France.

- Le Dividish J., F. Geoffroy, I. Cenope and M. Chenost. 1976. Using waste bananas as animal feed. *World Animal Rev.* 20:22-30.
- Le Dividish J., B. Seve et F. Geoffroy. 1970. Preparation et utilisation de l'ensilage de banane en alimentation animale. *Ann. Zootech.* 25:313-323.
- Muller H.G. 1980. Fermented cereal products of tropical Africa. University of Leeds, Leeds LS2 9JT United Kingdom.
- Ngaba P.R. and J.S. Lee. 1979. Fermentation of cassava. Institute of Food Technologists, USA.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1970. 11th. Ed.
- Palmer J.K. 1971. The Bananas. The Biochemistry of Fruits and their products. Vol. III. Academic Press, New York.
- Pederson, 1979. Microbiology of Food Fermentations. AVI Publishing Co.
- Peppler H.J., D. Perlman. 1979. Microbial Technology, 2nd. Ed. Microbial Processes. Vol. 1. Academic Press.
- Peppler H.J., D. Perlman. 1979. Microbial Technology. 2nd. Ed. Fermentation Technology, Vol. 2. Academic Press.
- Pigden W.J. 1977. Utilization of waste for food production using animals: Application to human nutrition. *Nutrition and Food Science*, Vol. 2. Ed. by Santos W., N. Lopez, J.J. Barbosa and J.C. Valente, p. 143.

- Poland G.L., J.T. Manion, M.W. Brenner, P.L. Harris. 1938. Sugar changes in the banana during ripening. *Ind. and Eng. Chem.*, 30:340-342.
- Prescott S.C. and C.G. Dunn. 1962. *Industrial Microbiology*, 3rd. Edition. McGraw Hill Book Co., New York.
- Sasson A. 1970. Le rôle des microorganismes dans la Biosphère et l'avenin de la microbiologie appliquée. Institut Scientifique Chérifien, Maroc.
- Saunders R.M. et al. 1973. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. *J. Nutr.* 103:530.
- Senez J.C., M. Rimbault and P. Deschamps. 1980. Protein enrichment of Starchy substrates for animal feeds by solid-state fermentation. *World Animal No.* 35, 36-39.
- Simmonds, N.W. 1966. *Bananas*. 2nd. Ed. Longmans, Green and Co. Ltd., London.
- Singh M., Kumar V. 1979. Sulphur phosphorus and Molybdenum interactions on the concentration and uptake of Molybdenum plants Glycine-Max. Dept. Soils, Haryana Agric. Univ. India.
- Stanton W.R. 1978. Microbiological utilization of agro-industrial wastes in the tropics. *Process Biochemistry*, Vol. 13.

- Taboada J., T. Herrera y M. Ulloa. 1972. Prueba de la reducción del acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del pozol. Rev. Lat-amer. Quim. 2:108-119.
- Taboada J., M. Ulloa y T. Herrera. 1973. Fijación de nitrógeno *in vitro* con *Agrobacterium azotophilum* en diversos sustratos, principalmente tierra y derivados de la industria azucarera. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 15:143-146.
- Taboada J. 1972. Efecto de aminoácidos sobre la fijación de nitrógeno por *Agrobacterium azotophilum*. An. Inst. Biol. UNAM, Ser. Biol. Exp. (1):35-42.
- Ulloa M. y T. Herrera. 1981. Estudio de *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras que constituyen parte de las Zoogreas llamadas tibicos en México. Biol. Soc. Méx. Mic. 16
- Ulloa M. 1974. Mycofloral sucesion in pozol from Tabasco, México. Biol. Soc. Mex. Mic. 8. 17-48.
- Wachter, M.C. 1981. Estudio de la utilización de hongos termofílicos en el enriquecimiento proteico de desperdicios de pulpa de plátano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- William S., Y.Y. Lee and W.B. Anthony. 1980. Lactic acid fermentation of crude sorghum extract. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXII, 757-777.