

00566
/
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA METROPOLITANA

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FERMENTACION TRADICIONAL DEL GARI"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS

(ORIENTACION EN INGENIERIA DE ALIMENTOS)

p r e s e n t a

ING. MONICA ALICIA MERAZ RODRIGUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F. abril de 1991.



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 está 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 N D I C E

	Pag.
Resumen	1
Introducción	3
Generalidades	5
Objetivos	15
Capitulo I. Proceso de acidificación de la yuca.	17
I.1. Introducción	17
I.2. Inóculos utilizados.	17
I.3. Sistema de fermentación.	18
I.4. Escurrimiento durante la fermentación.	20
I.5. Fermentaciones naturales.	20
I.6. Selección del nivel de inóculo.	21
I.7. Inóculos tradicionales. Cinéticas de acidificación con pozol, yakult, masa fermentada y licor de fermentación.	26
I.8. Inóculos de cepas lácticas de colección. Cinéticas de acidificación con <i>Lactobacillus cellobiosus</i> (NRRL-B-184) y con <i>Lactobacillus plantarum</i> (APG Eurozym).	28
I.9. Consumo de los azúcares totales y reductores durante la fermentación para los diferentes inóculos utilizados.	29
I.10. Cinéticas naturales de acidificación adicionando glucosa.	30
I.11. Resumen de resultados: tiempos de acidificación y niveles de acidez alcanzados.	33
I.12. Capacidad amortiguadora del sistema de fermentación.	34
I.13. Ajuste de los datos experimentales de acidificación al modelo de Gompertz.	34
Capitulo II. Actividad amilolítica durante la fermentación ácida de la yuca.	39
II.1. Introducción.	39

II.2. Definición de la Actividad Amilolítica	39
II.3. Actividad amilolítica para yuca fresca y para fermentaciones inoculadas con masa fermentada y licor de fermentación.	40
II.4. Actividad amilolítica en fermentaciones inoculadas con cepas puras.	41
II.5. Determinación de los valores óptimos de temperatura y pH.	42
II.6. Determinación de los parámetros cinéticos.	42
II.7. Identificación de los azúcares liberados.	43
II.8. Identificación del origen de la actividad amilolítica.	43
Capítulo III. Fermentaciones sucesivas y ecología de la fermentación.	46
III.1. Introducción.	46
III.2. Fermentaciones sucesivas.	46
III.3. Metodología	48
III.4. Aislamiento de microorganismos.	48
III.5. Purificación de cepas aisladas.	49
III.6. Morfología de las colonias de los grupos encontrados.	49
III.7. Agrupación de las cepas aisladas en géneros.	50
III.8. Ecología microbiana en la fermentación natural de la yuca. Cuentas totales en placa.	51
Conclusiones	53
Trabajo a Futuro	54
Bibliografía	56
Anexos. Materiales y Metodología.	59
Anexo I. Metodología de la fermentación.	59
Anexo II. Ecología de la fermentación.	62
Anexo III. Actividad amilolítica.	67

RESUMEN

Se diseñó un método de procesamiento de la yuca similar a los métodos tradicionales señalados por Lancaster (1982), Ogunsua et al. (1983) y EteJere (1985), para obtener un producto similar al garí, cuyas características fisicoquímicas son pH de 4.0 y 0.85% de acidez titulable expresada como ácido láctico, alcanzadas después de 72 horas de fermentación. Debido a la variabilidad del patrón fermentativo encontrado en las fermentaciones naturales, se hizo una selección del nivel de inóculo, utilizando masa fermentada en niveles de 5, 7, 9, 10 y 20% en peso y se seleccionó 5% como el nivel mínimo de inoculación para reproducir la fermentación.

Posteriormente, se llevaron a cabo fermentaciones con inóculos tradicionales tales como pozol y yakult, masa y licor de fermentación y cepas puras de colección como *Lactobacillus plantarum* (APG Eurozym) reportada como altamente acidificante y utilizada para procesos de enlaido de vegetales y *Lactobacillus cellobiosus* (NRRL-B-184) reportada como amilolítica por Sribir y Chakrabarty (1984) en niveles de 5, 10 y 20% en peso. Igualmente se llevaron a cabo fermentaciones naturales adicionadas de glucosa solamente en 1, 2 y 3% en peso.

Para las cinéticas naturales y las inoculadas con pozol y yakult se requieren 72 horas de fermentación para obtener las condiciones deseadas de acidez y pH. Para las cinéticas inoculadas con licor y masa fermentada, se reduce este tiempo y la glucosa adicionada a fermentaciones naturales no mejora el tiempo de fermentación. Y para las fermentaciones a las cuales se les adicionaron inóculos de cepas puras tales como *L. cellobiosus* y *L. plantarum*, se obtienen los menores tiempos de fermentación.

Los datos cinéticos obtenidos se ajustaron al modelo de Gompertz (Draper, 1981), obteniéndose valores de $P_{\text{máx}}$ similares a los experimentales para cada uno de los sistemas de fermentación estudiados y las desviaciones cuadráticas promedio para todos los casos son de 2.5%.

El patrón de consumo de azúcares reductores, presenta para las fermentaciones inoculadas con licor y masa fermentada, así como para la fermentación natural, un aumento en la concentración de hasta 3 mg/g yuca fresca. Los sistemas inoculados presentan actividad amilolítica a las 8 horas de fermentación a pH de 5.3 aproximadamente y para la fermentación natural se tiene esta actividad desde el inicio del proceso, siendo la mayor de los tres sistemas. No se encontró actividad amilolítica para *L. cellobiosus* ni

actividad pectinolítica y sacarolítica alguna en estos sistemas de fermentación.

Posteriormente, se determinaron los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten, a 30° C y pH 6.0, que son las condiciones óptimas de actividad, por medio de la modificación de Hanes-Woolf obteniendo una Km de 5.516 mg almidón/ml y una Vmáx de 0.206 mg de reductores liberados/ml de extracto enzimático/minuto.

Se identificaron los azúcares liberados de la hidrólisis del almidón por cromatografía en capa fina, encontrando glucosa, maltosa y dextrinas además de fructosa y sacarosa, y por lo tanto es probable que la enzima principalmente involucrada sea una α -amilasa.

Para identificar el origen de la actividad amilolítica, se adicionaron antibióticos para inhibir la actividad bacteriana, en sistemas inoculados con 5% en peso de licor y en fermentaciones naturales.

Se encontró que la actividad amilolítica es similar en todos los sistemas de fermentación, por lo que probablemente la actividad proviene de la yuca que libera las enzimas al dañarse los tejidos durante la preparación de la raíz para someterla a fermentación.

Durante la fermentación de la yuca reinoculada de manera sucesiva con licor y masa fermentada al 5% en peso, se encontró una tendencia ligera al aumento en el nivel de acidificación conforme aumenta el número de reinoculaciones. Y se identificaron los microorganismos involucrados, por medio de técnicas microbiológicas clásicas de aislamiento, purificación y agrupación de las cepas en géneros, encontrando *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus* solamente. Para la fermentación natural se hicieron cuentas totales en placa encontrando que para el segundo día de fermentación las bacterias acidificantes, tanto cocos como bacilos predominan y las levaduras permanecen en un número casi constante a lo largo de la fermentación.

INTRODUCCION

Introducción

El gari es un alimento proveniente de la fermentación ácida de la yuca, cuyas características fisicoquímicas son pH de 4.0 y 0.85% de acidez, que se alcanzan después de 72 horas de fermentación. Posteriormente, la masa fermentada se tuesta para obtener una harina que se consume de manera cotidiana con los alimentos en varias regiones de África Occidental.

En torno al gari, se han realizado varios estudios tendientes a analizar los aspectos más fundamentales de la producción tradicional para la obtención de este alimento. En particular, los cambios bioquímicos producidos durante la fermentación tales como la acidificación, el establecimiento de una población microbiana acidificante, el valor nutricional y el grado de detoxificación, con el fin de conocer y mejorar el proceso mecanizándolo para proveer a la población que consume este producto de un alimento higiénico, en cantidad suficiente y con vida de anaquel más larga y sin riesgo de toxicidad.

En Nigeria particularmente, se ha profundizado en estudios referentes a la detoxificación de la yuca, ya que existen evidencias de que el contenido de cianuro residual en el gari está directamente ligado a la aparición de neuropatía atáxica en la población consumidora (Ogunsua *et al.*, 1983 y Lancaster, *et al.*, 1982).

En lo que se refiere a los demás aspectos, como la evolución de la acidificación, la microbiología y la ecología de la fermentación, el aumento en la concentración de azúcares reductores y la producción de sabores y olores característicos del producto, existe información que suele ser escasa y contradictoria.

Se ha reportado en la literatura que en la fermentación del gari intervienen principalmente microorganismos tales como bacterias lácticas, pero no se tiene información de los microorganismos que prevalecen en el proceso fermentativo.

También, se reporta que durante la fermentación del gari existe un aumento en la concentración de azúcares reductores relacionado con los cambios de pH, sin embargo, se desconoce el origen de estos.

Se tiene un desconocimiento real de las características del producto y éstas sólo las conocemos por la literatura como son: olor y sabor ácido, una estructura final granular y cremosa con un contenido de humedad menor al inicial debido a la liberación de licor durante la fermentación.

De la información anterior se desprende que aunque el gari es un alimento de consumo cotidiano y se elabora actualmente en forma mecanizada, falta un

conocimiento básico del proceso de acidificación y del papel que los microorganismos desempeñan en este para mejorar las condiciones de fermentación.

El estudio y entendimiento de las fermentaciones tradicionales, ayuda a mejorar el proceso de fermentación y lleva al desarrollo de nuevos productos basados en fermentaciones tradicionales, dando como resultado productos con mejor calidad microbiológica, toxicológica y organoléptica.

GENERALIDADES

EL GARI NIGERIANO

Procesos Tradicionales de Preparación de Yuca en Africa.

En Africa Occidental se consumen de forma cotidiana alimentos que resultan de fermentaciones lácticas y acéticas por bacterias y levaduras, fermentaciones alcohólicas por hongos y levaduras o de combinaciones de ambas. La gran mayoría de estos alimentos aún son preparados por procesos basados enteramente en técnicas tradicionales y con utensilios fabricados con materiales tales como madera, fibras vegetales, barro y huesos de animales. Estos productos incluyen bebidas alcohólicas, productos lácteos, cereales, condimentos, raíces y tubérculos.

La yuca (*Manihot*, spp.), entre estos últimos es un alimento básico en esta región ya que representa una fuente importante de carbohidratos, aunque con bajo contenido proteico.

Esta raíz tiene una corteza exterior fibrosa y un centro generalmente blanco y rico en almidón hasta en 35%, contiene aproximadamente 62% de agua, 1% de proteína deficiente en aminoácidos esenciales y 1% de materia mineral, es relativamente rica en calcio y vitamina C. Se le describe como "dulce" o "amarga" asociando estos términos a la toxicidad de la raíz por el contenido de glucósidos cianogénicos. La concentración de cianuro expresada como HCN puede variar entre 15 y 400 mg/kg de materia fresca y el contenido suele variar específicamente con las condiciones ambientales de cultivo y la variedad de la raíz, así como con la distribución del cianuro dentro de la raíz misma, ya que la concentración de los glucósidos es menor en el centro y aumenta hacia el exterior siendo a veces mayor en la cáscara que en las partes internas.

Algunas de las técnicas de procesamiento de la yuca, como es la fermentación ácida y la posterior producción de harinas, son autóctonas de las zonas selváticas de América del Sur y de Brasil, de donde se introdujeron a Africa por el intercambio de esclavos en el siglo XVI. En Brasil se fabrica harina de yuca remojando los tubérculos enteros en agua de 3 a 8 días y algunas veces durante más tiempo. El remojo puede llevarse a cabo en agua corriente en la orilla de los ríos o en recipientes, a los cuales en ocasiones se les

añade un pedazo de la yuca previamente fermentada para promover el proceso de acidificación. Las raíces se ablandan y pueden ser prensadas con la mano y se obtiene, después de secar, una harina de color amarillento y de textura gruesa llamada *farinha dagua* o *farinha puba*, con sabor ácido.

En África se adoptaron los procesos tradicionales de América del Sur, derivandose una amplia diversidad de técnicas de procesamiento de la yuca, obteniendose así una gran cantidad de productos que constituyen una parte básica de la dieta en este continente. Actualmente se consumen de manera cotidiana una gran variedad de productos que provienen de la fermentación ácida de la yuca, tanto en forma de pastas, papillas o harinas. El procesamiento de la yuca en forma de pasta es un método característico de África poco conocido en América del Sur, en donde se tiene solamente la producción de harinas.

Los procesos para la preparación de la yuca incluyen pasos que ayudan en la detoxificación de la raíz por la liberación del ácido cianhídrico. Estos son normalmente el remojado en donde se presenta la fermentación láctica o la fermentación de la masa sin remojo previo, además del secado, hervido y tostado que son métodos comunes en la preparación de alimentos amiláceos.

En la siguiente tabla, extraída de Lancaster (1982), se resumen estos procesos y se hace una clasificación tentativa de las técnicas tradicionales a las que se somete la yuca para su consumo:

Tabla 1. Procesos tradicionales de preparación y detoxificación de la yuca.

1. Técnicas aplicadas no específicas para la detoxificación
 - 1.1. Totalmente no procesada (e.g. consumida cruda)
 - 1.2. Técnicas de cocción simple
 - 1.2.1. Hervido o cocción al vapor, etc.
 - 1.2.2. Asado, horneado
 - 1.2.3. Freído
 - 1.3. Secado al sol
 - 1.3.1. Sin procesamiento posterior
 - 1.3.2. Con procesamiento posterior
 - 1.3.2.1. Diferentes tipos de molienda, desmenuzado, etc.
 - 1.4. Secado con aire caliente (subdividido como 1.3.)
2. Técnicas especiales para detoxificación
 - 2.1. Detoxificación por solución
 - 2.1.1. Remojado de las raíces completas o de pedazos grandes

- 2.1.1.1. Remojado en agua estática
- 2.1.1.2. Remojado en agua corriente
- 2.1.1.3. Remojado en agua salada
- 2.1.2. Remojado después del desmenuzado (Subdividido como 2.1.1.)
- 2.1.3. Hervido
 - 2.1.3.1. Hervido simple
 - 2.1.3.2. Hervido sucesivo con cambios de agua
- 2.1.4. Procesos de extracción en húmedo del almidón
 - 2.1.4.1. Extracción del almidón sin gelatinización posterior
 - 2.1.4.2. Extracción del almidón con gelatinización posterior
- 2.2. Detoxificación por fermentación
 - 2.2.1. Fermentación natural
 - 2.2.1.1. Fermentación seguida sólo por lavado
 - 2.2.1.2. Fermentación seguida de lavado y tratamiento térmico
 - Tostado
 - Cocción con vapor
 - Secado con aire caliente
 - 2.2.2. Fermentaciones con uso de una preparación anterior (subdividido como 2.2.1.)

En Africa Occidental las raíces de yuca enteras se remojan en agua durante 3 ó 4 días y posteriormente se pelan y se reducen a una pasta por medio de morteros de madera o con piedras. Normalmente la pasta se cuece, envolviéndola en hojas de plátano y dándole una forma determinada.

A partir de este proceso básico y con algunas variantes se tienen productos conocidos como el *foo-foo* y el *udep utim* o *akpu* que se consumen con sopas, en Nigeria. En Camerún se produce a partir de esta pasta, el *bāton du manioc* que mide de 30 a 60 cm y bolas conocidas como *chickwange*. En Mozambique se preparan las *chicangas* mezclando la pasta de yuca con otros ingredientes como cebollas, *gindungo* y sal antes de envolverlas en hojas y cocerlas.

En Costa de Marfil, el producto fermentado más popular es el *attieke*, que se prepara pelando las raíces, remojándolas en agua y molliéndolas para obtener una pasta que se deja fermentar dos días en sacos de yute y exprimiendo el jugo de la yuca, la pasta fermentada se desmenuza y se cuece con vapor. El producto final tiene un sabor fuerte ácido y se consume con leche o carne y vegetales. También en Africa Occidental se obtienen harinas secando estas pastas al sol, dando productos como el *lafun* de Nigeria y el *fuba* de Angola.

El Gari Nigeriano.

Similares a las anteriores se tiene el gari, objeto de este estudio, un producto proveniente de la fermentación ácida de la yuca y del tostado posterior de la masa fermentada, para obtener una harina de sabor ácido, consumido en Nigeria por el 90% de la población como componente de los alimentos cotidianos de las personas de bajos recursos, contribuyendo en promedio hasta en el 60 % de la ingesta diaria de calorías. Se consume igualmente en Ghana y también se prepara en Camerun, Sierra Leona, Guinea, Benin y Togo.

El gari se consume principalmente en forma de harina como *eba*, un alimento que se prepara en agua hirviendo para promover el hinchamiento del almidón y después se amasa hasta obtener una masa plástica, de la cual se hacen pequeñas bolas que se cocinan con caldo de vegetales, aceite de palma y carne de res o pescado. También se consume adicionándole agua y sal o azúcar, haciendo que los gránulos se hinchen individualmente, o mezclándola con leche y azúcar para bebida o simplemente la harina mezclado con coco. También se mezcla con aceite de palma y con carne de res o pescado y se consume en forma de pasta (Lancaster, 1982 y Ogunsua *et al.*, 1983).

Proceso Tradicional del Gari.

El proceso tradicional para la elaboración del gari es similar al de la *farinha da mandioca* de Brasil, pero en el caso del gari la fermentación es más importante, ya que imparte las características propias de sabor y olor. Se inicia pelando la yuca para eliminar la piel exterior de color café y la capa más externa cercana a la piel. Las raíces peladas y lavadas se reducen a partículas muy pequeñas por medio de rallado en utensilios tradicionales de piedra o de madera. Esta masa se introduce en una bolsa de algodón o de yute en donde se lleva a cabo la fermentación de manera natural, que dura de 3 a 4 días y excepcionalmente hasta 10. Durante ésta, es necesario exprimir la masa entre tablas o piedras o atando la bolsa a un poste de tal forma de promover la liberación del licor formado que en ocasiones se utiliza para la recuperación del almidón (Lancaster, 1982; Ogunsua *et al.*, 1983 y Etejere, 1985).

La expresión de la masa para liberar el licor, promueve el "lavado" o pérdida de algunos minerales, como el 69% del fósforo, 65% de magnesio, 76% de potasio, 50% de sodio y se reduce la cantidad absoluta de aminoácidos.

Así, la yuca alcanza después del escurrimiento una calidad química de 3% y el valor biológico final obtenido por el consumo de este producto es de 2% (Ezeala, 1984). Igualmente, se destruye en su mayor parte la vitamina C presente originalmente en la yuca fresca y se pierde también hasta el 70% de los carbohidratos solubles disponibles (Ogunsua et al., 1983).

La fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente, que puede variar entre 25° y 30° C. por poblaciones heterogéneas de bacterias lácticas y en ocasiones por hongos. La masa de yuca en fermentación debe alcanzar un pH final aproximadamente de 4.0 ± 0.15 , 0.85% de acidez total titulable expresada como ácido láctico y una humedad final después de la fermentación de alrededor del 50% por la liberación del licor producido. Normalmente, en las etapas finales de la fermentación el sustrato se agita, ya que esto promueve la aparición de *Geotrichum candidum* que favorece la producción del aroma característico del producto con la formación de ésteres y aldehídos (Ogunsua et al., 1983).

El proceso fermentativo involucra un proceso simultáneo de detoxificación por medio de la enzima linamarasa, presente de manera natural en la yuca y que actúa cuando el pH es aproximadamente 5.0. La enzima hidroliza los glucósidos cianogénicos linamarina y lotoaustralina dando como resultado HCN que es soluble en agua y volátil (Lancaster, 1982 y Ogunsua et al., 1983).

Posteriormente, esta pulpa semiseca se pasa por mallas fabricadas con bambú para eliminar las fibras más gruesas, quedando solamente granos finos de la masa fermentada. Estos se tuestan en recipientes de hierro a alta temperatura con o sin la adición de aceite de palma hasta que toman una estructura quebradiza y ligera. Durante este proceso, llamado garificación, la masa se seca hasta alrededor de un 20% de humedad y se tiene una semidextrinización del almidón, dando a la harina así obtenida un poder de hinchamiento 300 veces mayor que el del almidón original y se pasa por una malla para eliminar los granos más gruesos y se almacena (ver diagrama 1).

Microbiología de la Fermentación.

La fermentación tradicional efectuada por las comunidades que consumen garí se lleva a cabo de manera muy rudimentaria, como se describió anteriormente y sin la inoculación directa del sustrato. Se piensa que los microorganismos que llevan a cabo la fermentación provienen de la cáscara de la yuca, de la manipulación de las raíces y de los utensilios utilizados en la elaboración de este producto, como los sacos de algodón o yute, los palos

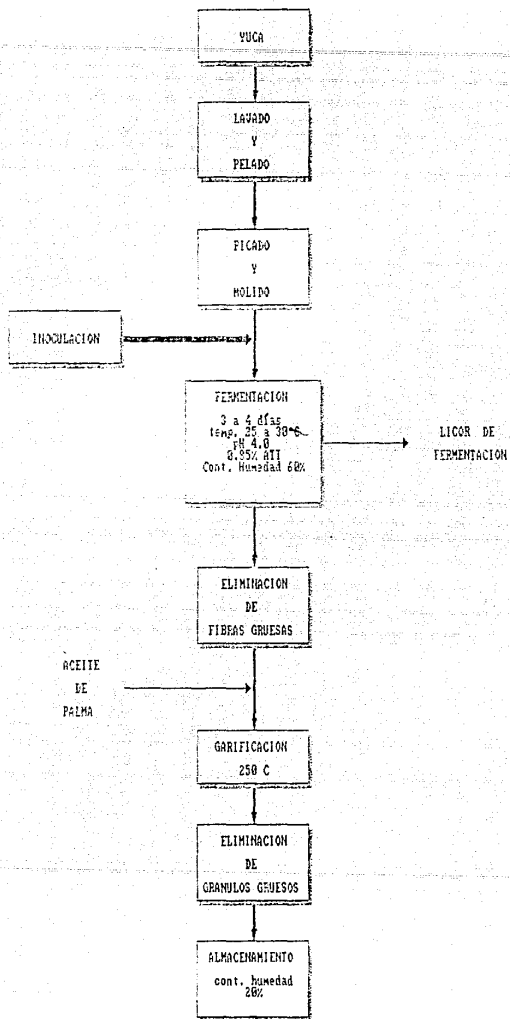


Diagrama 1. Proceso tradicional del gari.

y las piedras para presionar la masa, las mallas para separar las fibras gruesas, etc.

En la literatura se encuentran muy pocos reportes respecto a los microorganismos involucrados en la fermentación natural del gari. Algunos autores reportan que los microorganismos que aparecen en el proceso de fermentación son *Corynebacterium* y *Geotrichum candidum*, que son responsables de la producción de ácido y del sabor característico del gari (Collard y Levi, 1959).

Ngaba y Leé (1979), señalan que *Lactobacillus plantarum* es el responsable del olor a gari y en cultivo mixto, los responsables son *L. plantarum* y *Streptococcus* spp. Okafor (1977), reporta una variedad de microorganismos aislados de la fermentación como *Lactobacillus*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium* y *Leuconostoc*, de entre los cuales permanecen hasta el final de la fermentación en gran número los *Leuconostoc* y levaduras y aparentemente los *Lactobacillus* no desarrollan un papel preponderante durante ésta, ya que no están presentes en cantidades significativas y sugiere que son los microorganismos que permanecen en mayor número durante la fermentación los responsables del sabor y olor característico.

Componentes del Olor y Sabor del Gari.

Se atribuye la producción de sabores en este producto a las bacterias lácticas presentes durante una primera etapa de la fermentación y la presencia de aldehídos y ésteres desarrollados durante una etapa posterior en donde el microorganismo activo es *Geotrichum candidum* (Collard y Levi, 1959). Okafor y Uzuegbu (1987), realizaron estudios sobre los microorganismos predominantes en la fermentación de la yuca y analizaron el efecto de estos sobre las características organolépticas del producto, como aroma, sabor, color y textura; encontrando que *Corynebacterium manihot* y *Lactobacillus plantarum* dieron el gari más aceptable, así como una mezcla de éstos con *Geotrichum candidum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus faecium*. Encontraron que el metil lactato estaba presente en estos garis, mientras que el n-metil-butirato tenía efectos adversos sobre estas características.

En otros estudios, Dougan, et al. (1983) identificaron por cromatografía los compuestos responsables del olor y sabor en yuca fresca y en yuca fermentada y tostada, o gari. Comparativamente, se tiene un aumento importante en la producción de volátiles debidos a la fermentación y el análisis abarca desde compuestos azufrados, HCN y ácidos orgánicos hasta compuestos volátiles. Pero

no se aclara durante qué etapa de la fermentación aparecen ni qué microorganismos son responsables de su producción, aunque pudiera deberse a la actividad de bacterias lácticas y de *Geotrichum candidum* sobre el sustrato. Se menciona también, que las pirazinas y otros compuestos relacionados son más numerosos para gari y se forman por la reacción de Maillard que se lleva a cabo durante el proceso de garificación, y le dan al producto el olor característico final.

Ohochuku y Ballantine (1983), identifican una serie de compuestos responsables de olores desagradables desarrollados durante la fermentación de la yuca sumergida en agua, que aparentemente se utiliza algunas veces para producir gari. Se encuentra el ácido propanóico, acético y butanóico como los principales responsables del olor desagradable y se señala que *Bacillus butyricus* libera estos compuestos a partir de la fermentación de carbohidratos, aunque no se confirma si este microorganismo está presente durante la fermentación pero se sabe que son debidos a la acción de una población heterogénea sobre el sustrato.

Cereda y Almeida (1985), identificaron los ácidos orgánicos formados durante la fermentación ácida comercial del almidón de yuca, encontrando ácido propiónico, butírico, acético, fórmico, succínico y láctico, sin atribuir la formación de estos compuestos a ningún microorganismo en particular.

Azúcares Presentes Durante la Fermentación de la Yuca y Actividad Enzimática.

Las diferentes variedades de yuca tienen un contenido determinado de azúcares reductores, que puede ser de dos a tres veces menor que el contenido de almidón (de Battesti, 1981). La población de microorganismos que llevan a cabo la fermentación, se establece inicialmente consumiendo los azúcares reductores disponibles presentes en la yuca, tales como la glucosa y produciendo acidez.

Sin embargo, durante la fermentación ácida de la yuca se ha reportado un aumento en los azúcares reductores de el doble de la concentración, desde un contenido inicial de 3.1 mg/g yuca fresca hasta 6.2 mg/g durante las primeras 24 horas de fermentación y que coincide con la disminución del pH del medio a 5.0 (Ogunsua et al., 1983).

Esta reportado en la literatura la existencia de enzimas amilolíticas, celulolíticas y pectinolíticas como pectinesterasas y poligalacturonasas, propias de la yuca, que se liberan al dañarse los tejidos de la raíz y actúan sobre ésta causando ablandamiento, pérdida de la estructura por degradación y

finalmente descomposición. Las enzimas presentan una actividad inicial pronunciada que disminuye en un lapso de 8 días de almacenamiento a 30° C (Padjama, Balagopal y Potty, 1982). Igualmente, está reportada la presencia de enzimas tales como invertasa ácida, fenilalanina-amonioliasa y peroxidasa, cercanas a los tejidos dañados (Uritani, Data y Tanaka, 1982).

También se tienen reportes de bacterias con capacidad amilolítica que están presentes durante la fermentación ácida de la yuca tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus cereus* (Olukayode y Olusola, 1987); y otras que intervienen en el ensilado de forrajes o están involucradas en la fermentación de desechos vegetales, tales como *Lactobacillus cellobiosus* (Sribir y Chakrabarty, 1984 y 1986), *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura y Crowell, 1981 y Nakamura, 1981). Se menciona que las enzimas amilolíticas son liberadas en las últimas etapas del crecimiento de las bacterias (Sribir y Chakrabarty, 1984) y se ha encontrado que estas fracciones enzimáticas tienen alta actividad amilolítica estando relacionada al descenso gradual del pH durante la fermentación (Olukayode y Olusola, 1987), aunque estos estudios no abarcan el efecto de la actividad amilolítica de estos microorganismos sobre el proceso fermentativo.

En la fermentación ácida de la yuca no se reportan cambios estructurales importantes como los que causarían las enzimas pectinolíticas o celulolíticas, por lo que las amilasas son las enzimas que más interés han despertado, ya que se piensa que los azúcares reductores, cuya concentración aumenta considerablemente durante la fermentación provienen del almidón.

Sin embargo, no se ha estudiado este fenómeno y no se puede decir si la posible actividad enzimática proviene de los microorganismos o del sustrato que libera las enzimas debido al daño producido en el tejido por el rallado, siendo el proceso acidificante favorecedor de la actividad enzimática.

Finalmente, cabe mencionar que actualmente se ha logrado la mecanización del proceso principalmente en Nigeria y Sierra Leona y se han instalado pequeñas plantas en poblados pequeños y en villas para la producción de garí. Esta mecanización incluye la utilización de "semilla" para acelerar la acidificación de la masa y disminuir el tiempo de fermentación. Esta "semilla" puede ser la masa fermentada o el licor liberado durante una fermentación de tres días adicionados en una proporción de 1 kg de semilla por 45 kg de yuca fresca; ambos conteniendo un número relativamente alto de microorganismos que producen ácido. En estas plantas se lleva a cabo la garificación de la masa fermentada, en equipos que promueven una gran transferencia de calor y baja transferencia de masa, obteniéndose la

gelatinización y el hinchamiento del almidón.

Posteriormente, el gari gelatinizado y semiseco, se muele en molinos de martillos y se somete a secado en donde, al contrario de la garificación se tiene una gran transferencia de masa y baja transferencia de calor. De esta forma se obtiene una harina con un contenido de humedad final de 8 a 10%, que la hace no susceptible a la proliferación de hongos contaminantes tales como *Aspergillus flavus* proveyendo a la población consumidora de un producto más higiénico y con mayor vida de anaquel. Finalmente, el producto se empaca en bolsas de plástico y se vende (Lancaster, 1982 y Ogunsua et al., 1983).

OBJETIVOS.

OBJETIVOS

Es de interés en este trabajo, reproducir la fermentación ácida de la yuca para producir un producto tipo gari, con las características fisicoquímicas propias de éste como pH 4.0 y 0.85% de acidez, siguiendo una metodología similar a la tradicional con el fin de estudiar el proceso de acidificación, el patrón fermentativo en fermentaciones sucesivas, la capacidad amilolítica del sistema y la ecología de la microflora involucrada. Se propone, como primera alternativa, llevar a cabo fermentaciones naturales sin la adición de inóculo, en las que se desarrollen los microorganismos presentes de manera natural en la yuca, o que fueron adquiridos a través de la manipulación de las raíces, que corresponderán a una flora heterogénea y que tendrá la capacidad de acidificar el sustrato, modificando el sabor y el olor original. Es deseable que los microorganismos involucrados en la fermentación tengan las siguientes características: rápida utilización del sustrato, tolerancia a bajo pH y capacidad amilolítica relevante.

Debido a la naturaleza tradicional de la fermentación, en este trabajo no se persigue optimizar el tiempo de fermentación. Sin embargo, se considera importante que este no sea muy largo y que la población de microorganismos sea constante en cuanto a variedad, para obtener un producto con las mismas características y con la menor variabilidad posible, especialmente en lo que se refiere a la acidez final alcanzada que debe corresponder a la acidez característica del gari y al aroma producido, que no debe ser desagradable.

Se definirán las características de la fermentación, las cuales están en función de las propiedades finales del producto deseado, tales como el pH y el nivel de acidez alcanzado así como el nivel y tipo de inóculo necesario para hacer reproducible la fermentación.

Para promover la acidificación, de tal forma que la población que se establezca este formada principalmente de bacterias acidificantes, se utilizarán varios inóculos tradicionales tales como la masa fermentada y el licor liberado provenientes de una fermentación natural de tres días de la misma yuca, así como pozol blanco, una bebida tradicional del Estado de Chiapas y yakult, un producto láctico comercial cuyo microorganismo activo es *Lactobacillus casei*. También se utilizarán cepas puras de bacterias lácticas de colección como *Lactobacillus cellobiosus* (NRRL-B-184) reportado como amilolítico por Sribir y Chakrabarty (1984) y *Lactobacillus plantarum* (APC Eurozym) utilizada por su alta capacidad acidificante en ensilados vegetales y aditivos como glucosa.

Es necesario determinar la secuencia de los microorganismos presentes responsables de la fermentación natural, relacionando estos fenómenos con el cambio de pH. Se considera necesario determinar qué tipo de población microbiana se establece en fermentaciones sucesivas, aislándolos e identificándolos con técnicas microbiológicas clásicas, determinando cuáles son los responsables de la acidificación y cuáles son responsables de la actividad amilolítica del sistema, cuando este sea el caso.

Se tiene un interés particular en la actividad amilolítica de la fermentación, ya que se ha reportado en la literatura un aumento de azúcares reductores durante las primeras 24 horas de fermentación y cuando el pH es 5.0, desde un contenido inicial de 3.1 mg de azúcares/g de yuca fresca hasta 6.2 mg/g, que probablemente provienen del almidón (Steinkraus, 1983). Considerando que esta actividad pueda provenir de las enzimas propias del sustrato como señala Padjama, *et al.*, (1982) y Uritani *et al.*, (1982) y/o de los microorganismos involucrados en la fermentación (Olukayode y Olusola, 1987; Lindgren y Refai, 1984; Nakamura, 1981 y Nakamura y Crowell, 1981), la liberación y el consecuente aumento en la concentración de azúcares, promovería el establecimiento de una población microbiana que produce ácido y otros compuestos que le dan al producto características propias.

Es importante determinar la procedencia de la actividad amilolítica y hacer un seguimiento del aumento de los azúcares reductores y de la actividad de las enzimas presentes durante el periodo de fermentación, correlacionando estos fenómenos con el cambio de pH y finalmente, analizar el tipo de azúcares reductores liberados, como una forma preliminar de identificación de las posibles enzimas involucradas.

CAPITULO I

PROCESO DE ACIDIFICACION DE LA YUCA

I.1. Introducción.

Debido a que la fermentación natural es variable en cuanto a pH y contenido de acidez, es necesario definir un nivel de inóculo para hacer reproducible el proceso de acidificación.

Con la utilización de inóculos tales como la masa de yuca fermentada y el licor, la fermentación se hace reproducible y las características son menos variables. Y con la adición de cepas puras como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus cellobiosus* los tiempos de fermentación se acortan drásticamente.

El patrón de consumo de azúcares es similar en todas las fermentaciones, pero en aquellas con bajos contenidos de acidez, se tiene un aumento notable en la concentración de azúcares reductores.

Al ajustar los datos cinéticos al modelo de Gompertz, se tiene que el valor de la constante de producción de ácido aumenta conforme aumenta la capacidad de acidificación de los inóculos y el modelo es capaz de predecir la máxima concentración de ácido obtenida.

I.2. Inóculos Utilizados.

Para promover la acidificación de la yuca fresca y comparar con la fermentación natural, se utilizaron diferentes inóculos, entre ellos, inóculos provenientes de productos fermentados tradicionales tales como:

- masa fermentada de yuca,
- licor de fermentación,
- pozol blanco proveniente del Estado de Chiapas y
- yakult, un producto láctico comercial cuyo microorganismo activo es *Lactobacillus casei*,

cepas lácticas de colección como:

- *Lactobacillus cellobiosus* (NRRL-B-184) y
- *Lactobacillus plantarum* (APG Eurozym)

y glucosa en niveles de 1, 2 y 3 % en peso.

Todos los inóculos utilizados tenían un pH de 4.0 ± 0.15 ; un % de acidez total titulable (% ATT) de 0.7 a 1.0 y los niveles de inoculación utilizados fueron de 5, 7, 9, 10 y 20% en peso, utilizando masa fermentada inicialmente para definir el nivel de inóculo apropiado para reproducir la fermentación con poca variabilidad.

Posteriormente, se hicieron fermentaciones con pozol y yakult aplicando 5% en peso de inóculo para comparar las cinéticas de acidificación con las de masa fermentada. Para todos los demás inóculos, tales como licor de fermentación y cepas lácticas de colección, se utilizaron niveles de inoculación de 5, 10 y 20% en peso. También se realizaron fermentaciones adicionando glucosa a la yuca fresca no inoculada en niveles de 1, 2 y 3% en peso para observar el efecto sobre el proceso natural de acidificación.

Los inóculos de cepas lácticas puras se cultivaron en caldo MRS y se adicionaron pesando el caldo necesario hasta alcanzar el nivel de inóculo deseado. La metodología de obtención, aplicación y conservación de inóculos está descrita en el Anexo I.B y la composición del medio de cultivo se describe en el Anexo II.A.

I.3. Sistema de Fermentación

Para todos los experimentos realizados, se utilizó yuca fresca proveniente de los Estados de Tabasco, Morelos y Veracruz, sobre la que no se tenía control respecto a la variedad debido a la escasez de la yuca en la ciudad ya que es un cultivo de temporada, abundante en los meses de octubre a febrero. Se utilizaron camotes jóvenes de cáscara rosa-café de centro blanco y sin fibras, lavados, pelados y molidos hasta una consistencia de masa. Esta masa, fresca o inoculada, se introducía en columnas de vidrio de 20 cm de longitud por 1.5 cm de diámetro tapadas en la parte superior. En la parte inferior se colocó un tubo de ensaye para coleccionar el licor que escurre durante la fermentación (ver diagrama 2). Este sistema establece condiciones de fermentación apropiadas para bacterias lácticas, como semi-anaerobiosis y provee la posibilidad de escurrimiento del licor y su colección.

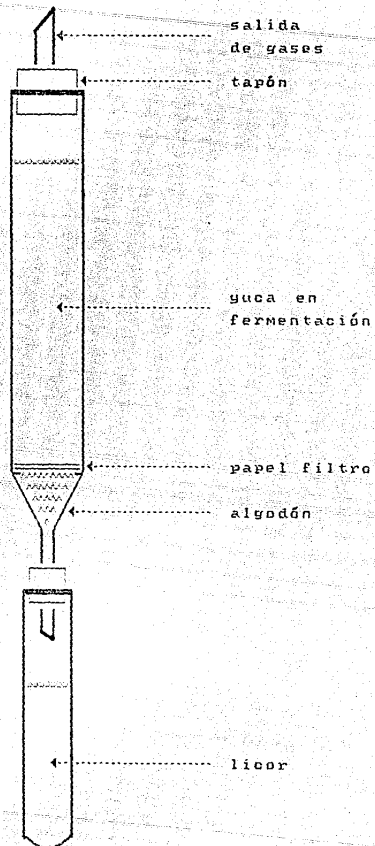


Diagrama 2. Sistema de fermentación.

La metodología de la fermentación se encuentra explicada en detalle en el Anexo I.C., así como el seguimiento de la fermentación y la toma de muestras. Las técnicas de análisis se tomaron del manual de Schettino, et al. (1988) para la fermentación sólida de la yuca.

I.4. Escurrimiento durante la Fermentación.

Durante todas las fermentaciones se tuvo el escurrimiento del licor de fermentación, que no depende del tipo de inóculo utilizado, sino de la humedad inicial de la yuca que se somete a fermentación, ya sea natural o inoculada y del tipo de yuca utilizada. Es decir, si la yuca es blanca habrá más licor que si es amarilla, si los camotes son suaves o fibrosos, etc.

El escurrimiento es debido probablemente al daño de los tejidos de la yuca al prepararla para fermentación. Inicialmente, se pensó que era debido a cierta actividad pectinolítica, sin embargo, se comprobó que ésta actividad enzimática no está presente en estos sistemas fermentativos como se indica en el Capítulo II. La cantidad de licor recuperado es de aproximadamente 12 a 15 ml por 35 g de yuca en un periodo de 20 a 25 horas de fermentación.

El escurrimiento tiene como consecuencia el "lavado" de nutrientes tales como azúcares disponibles y minerales como reporta Ezeala (1984), así como de microorganismos que en el licor probablemente se encuentran en cantidades más altas (Ogunsua, et al. 1983).

I.5. Fermentaciones Naturales.

El proceso de acidificación durante la fermentación natural de la yuca mostró variabilidad en lo que se refiere al pH inicial del sustrato que fue de 6.2 a 6.5 y excepcionalmente de 7.0; en el contenido inicial de azúcares reductores que se encontró alrededor de 2.5 mg/g de yuca fresca y de azúcares totales que varió desde 9.0 a 21 mg/g de yuca fresca así como en los tiempos de fermentación requeridos para alcanzar la condición de gari que varió de 64 a 72 horas y en consecuencia el pH y nivel de acidificación final alcanzado, debido a la variación de los diferentes lotes de yuca utilizados en este trabajo.

El proceso de acidificación natural es más lento que cuando se adicionan inóculos directamente y en ocasiones inclusive, no se presenta debido probablemente a la variación de la microflora presente y en el caso de camotes muy viejos y con gran contenido de fibras, por la ausencia de

carbohidratos disponibles.

Cabe aclarar que el proceso de conservación de la yuca fresca por congelación descrito en el Anexo I.A. tiene cierto efecto sobre ésta, ya que cuando estos lotes se mantenían en conservación durante más de cuatro semanas perdían la capacidad de acidificación natural y la actividad amilolítica.

A continuación, en la figura 1 se muestra una cinética puntual para la fermentación natural de yuca fresca, donde puede verse que la fermentación se inicia a un pH de 6.3 y 0.075% ATT, rebasa la fase lag en 16 horas y en 72 horas no alcanza la condición de gari, a pesar de que los azúcares solubles totales se consumen constantemente, agotándose al finalizar el tiempo de fermentación.

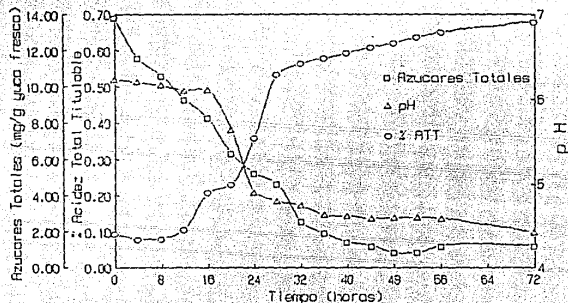


Fig. 1. Cinética de acidificación pH (Δ), % ATT (\circ) y de consumo de azúcares totales (\square) durante la fermentación natural de la yuca a 30°C.

1.5. Selección del Nivel de Inóculo.

Para la selección del nivel de inóculo se utilizó solamente masa fermentada en niveles de inoculación de 5, 7, 9, 10 y 20% en peso y en la figura 2.A. puede notarse que aunque las cinéticas para los diferentes niveles de inoculación se inician a pH ligeramente diferentes, siendo el más bajo de 5.2 para 20%, el proceso de acidificación para todos los niveles se lleva a cabo de manera similar, presentándose una tendencia de acidificación prácticamente indistinguible entre niveles después de 24 horas de fermentación, periodo en el que el pH decae completamente sin que se presenten cambios importantes en los días posteriores.

En el análisis de varianza para estas corridas experimentales, con un nivel de confianza de 0.95, no se encuentra diferencia significativa entre niveles más que entre 5 y 20% y 10 y 20%, pero no así entre 5, 7, 9 y 10%.

En el caso de las cinéticas de acidificación en donde la acidez esta expresada como % ATT (figura 2.B.), se observa que no existen diferencias importantes entre los niveles 5, 7, 9 y 10%, ya que se inician con un contenido de ácido de alrededor de 0.13 y la acidificación es similar entre niveles durante las primeras 48 horas, que es también el intervalo de tiempo durante el cual se alcanza el % de ácido cercano al del gari.

En el caso del nivel de inóculo más alto, o sea 20%, el proceso se inicia a 0.27% de acidez y durante toda la fermentación la curva de acidificación se diferencia mucho de los niveles más bajos, manteniendo siempre un contenido de ácido más alto. Para estas corridas experimentales, el análisis de varianza indica nuevamente que no existen diferencias significativas entre los niveles de inoculación 5, 7, 9 y 10%, pero si existe diferencia significativa entre cualquiera de estos niveles y 20%, encontrando la mayor diferencia entre 5 y 20%.

Sin embargo, en la figura 2.C. se presenta graficada la acidez producida (ver Anexo I.D) para todos los niveles de inoculación utilizados. Se nota que el proceso de producción de ácido durante las primeras 24 horas es similar para todos y solamente se tienen diferencias en el ácido producido al finalizar el tiempo de fermentación. Para estos datos el análisis de varianza indica que no hay diferencia significativa entre niveles.

Al comparar estas cinéticas con una fermentación natural se observa que la inoculación directa de la yuca fresca promueve y acelera el proceso de acidificación, disminuyendo el tiempo para alcanzar las condiciones requeridas de pH y acidez.

A partir de estas corridas experimentales, al comparar el efecto de los niveles de inoculación sobre el proceso fermentativo y tomando en cuenta los datos de acidificación reportados por Ogunsua, et al. (1983), así como los resultados del análisis estadístico se seleccionó 5% como el nivel de inoculación apropiado para reproducir el proceso fermentativo similar al del gari.

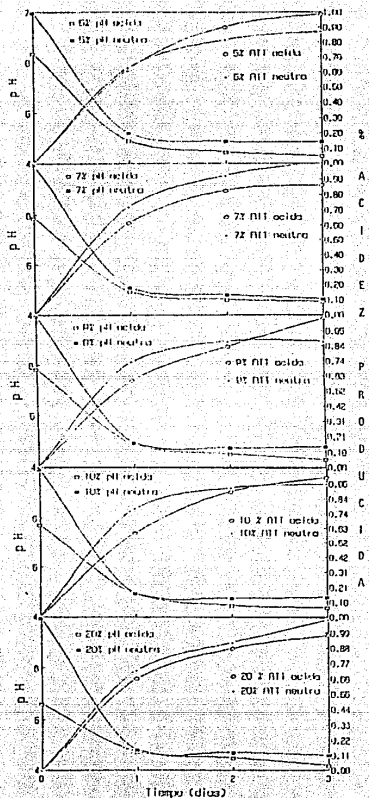


Fig.3.A.,B.,C.,D. y E. Cinéticas de pH y % ATT para la fermentación de la yuca a 30° C con dos condiciones iniciales de fermentación: ácida y neutra, inoculando con masa fermentada en niveles de inoculación de 5, 7, 9, 10 y 20% en peso.

Cabe mencionar que con la inoculación también se encontró menor variabilidad en las características finales de acidez y pH del producto y en el aroma desarrollado, que era agradable, ligeramente ácido y ligeramente afrutado. No se notó un cambio notable en el color y la textura de la masa fermentada, más que una disminución en el contenido de humedad debido al escurrimiento del licor de fermentación, obteniéndose un contenido final de 50% aproximadamente.

Ya que la inoculación a diferentes niveles da como resultado condiciones iniciales de pH y de acidez diferentes para cada nivel, además de promover el proceso fermentativo, se consideró importante definir el efecto del pH inicial sobre la fermentación.

En este sentido se llevaron a cabo corridas experimentales con los mismos niveles de inóculo 5, 7, 9, 10 y 20% y con el mismo inóculo, masa fermentada, considerando dos condiciones iniciales de fermentación: una condición inicial neutra a pH 7.0, que se obtenía adicionando NaOH 2N a la masa de yuca y una condición inicial ácida, al pH naturalmente alcanzado por la adición de inóculo que varía para los diferentes niveles desde 6.2 para 5% hasta 5.3 para 20%.

Para observar las diferencias en el proceso de acidificación entre condiciones y niveles, la acidez en las figuras que se presentan a continuación, esta expresada como la acidez producida (figuras 3.A., B., C., D. y E.).

En estas puede apreciarse que las cinéticas de cambio de pH y producción de ácido, siguen el mismo patrón fermentativo para todos los niveles, por lo que se considera que un pH inicial diferente al alcanzado con el nivel de inóculo deseado no tiene gran influencia en el proceso de acidificación, y que es la adición del inóculo el principal factor que promueve la fermentación.

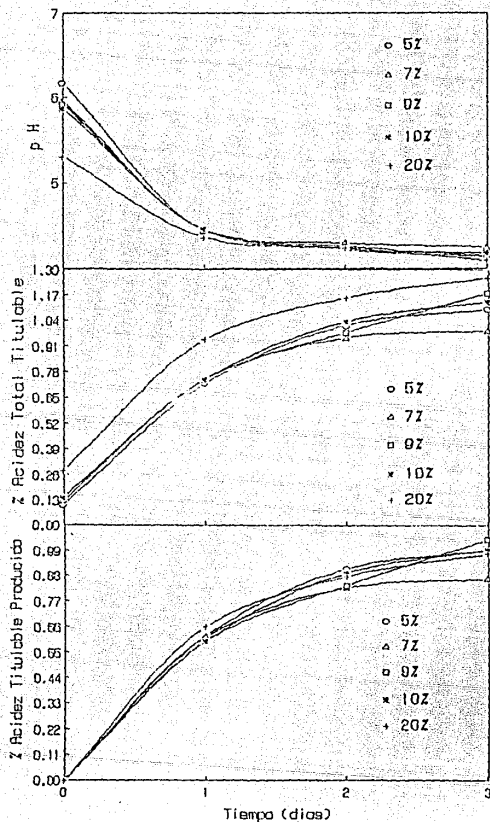


Fig.2.A., B. y C. Cinéticas de pH, % ATT y % Acidez Producida para la fermentación de la yuca a 30° C inoculando con masa fermentada en niveles de 5 (○), 7 (△), 9 (□), 10 (*) y 20% (+) en peso.

I.7. Inóculos Tradicionales. Cinéticas de Acidificación con Pozol, Yakult, Masa Fermentada y Licor de Fermentación.

Al determinar el nivel mínimo de inoculación necesario para reproducir el patrón fermentativo similar al del gari, se creyó necesario corroborar el efecto de este nivel de inoculación en yuca utilizando otro tipo de inóculos tradicionales tales como pozol y yakult.

En la figura 4. se muestra la cinética de acidificación (% ATT) y el cambio de pH en fermentaciones de 3 días inoculando con yakult y con pozol a un nivel de inoculación de 5% en peso. Observando las curvas de acidificación se hace evidente que se inician prácticamente a los mismos niveles de acidez, es decir, 0.12% de ATT y pH de 6.2; y al finalizar el tiempo de fermentación ambas alcanzan un pH final de 4.2 aproximadamente y 0.8% de ATT. El efecto de la adición de estos inóculos es comparable al efecto de la inoculación con 5% en peso de masa fermentada.

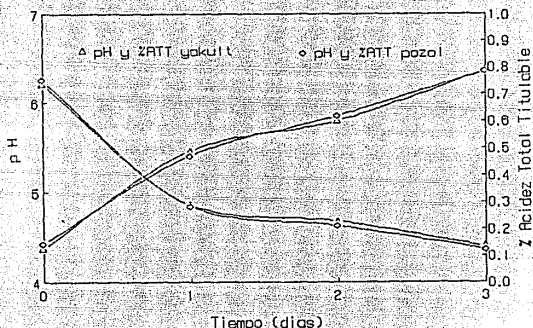


Fig. 4. Cinética de acidificación de yuca a 30° C inoculada con 5% en peso de yakult (Δ), cuyo microorganismo activo es *Lactobacillus casei* y pozol (\diamond) proveniente del Edo. de Chiapas.

Al comprobar el efecto del nivel de inóculo seleccionado y para obtener información más precisa de las cinéticas inoculadas con los inóculos normalmente utilizados en la producción del gari en Nigeria, como son la masa de yuca previamente fermentada y el licor liberado de la fermentación (Ogunsua et al., 1983) se llevaron a cabo cinéticas puntuales de acidificación utilizando los niveles de inoculación de 5, 10 y 20% en peso.

La inoculación de la yuca fresca con masa fermentada previamente de manera natural, presenta una fase lag de 4 horas para 5% de inóculo, de 4 horas para 10% y de 2 horas para 20%. La condición de gari se alcanza a las 72, 48 y 32 horas, respectivamente (figuras 5.A. y 5.B.)

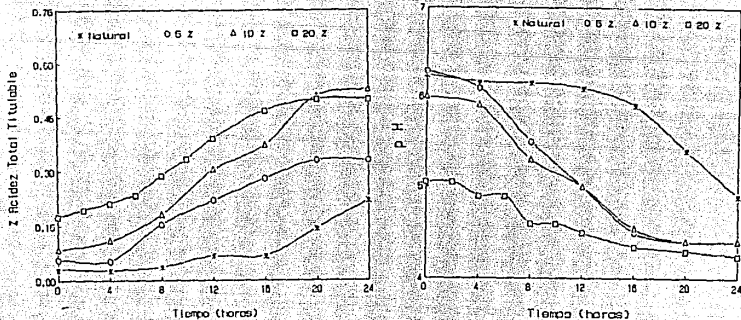


Fig. 5.A., 5.B. Cinética de acidificación de yuca a 30°C utilizando masa fermentada como inóculo en niveles de 5 (o), 10 (Δ) y 20% (□) en peso, comparando con un fermentación natural (*).

Utilizando licor como inóculo para la fermentación, se tiene que las fases lag para 5, 10 y 20% de inoculación duran 4, 4 y 2 horas respectivamente. La condición de gari se alcanza a las 24 horas de fermentación para 5%, a las 20 horas para 10% y a las 16 horas para 20% (figuras 6.A. y 6.B.)

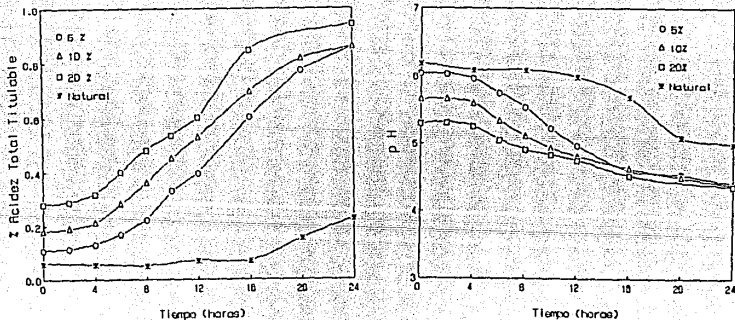


Fig. 6.A., 6.B. Cinética de acidificación de yuca a 30°C utilizando licor de fermentación como inóculo en niveles de 5 (o), 10 (Δ) y 20% (□) en peso, comparando con una fermentación natural (*).

Comparando el proceso fermentativo para ambos inóculos, se nota que el tiempo de fermentación para alcanzar la condición de gari se acorta considerablemente para el licor, requiriendo tan sólo de 24 horas, que coincide con lo señalado por Ogunsua, et al. (1983). Esto probablemente es debido a que durante el escurrimiento también se tiene el "lavado" de microorganismos aumentando el número relativo de estos presentes en el licor y de esta forma acelerando el proceso.

I.8. Inóculos de Cepas Lácticas de Colección. Cinéticas de Acidificación con *Lactobacillus cellobiosus* (NRRL-B-184) y con *Lactobacillus plantarum* (APG Eurozym).

Inoculando con *L. cellobiosus* se presenta la fase lag de 3 horas para 5%, 3 horas para 10% y 2 horas para 20%, registrándose una acidificación rápida al concluir esta fase. Con el uso de este inóculo, la condición de gari se alcanza en 12, 10 y 7 horas, respectivamente (figuras 7.A. y 7.B.).

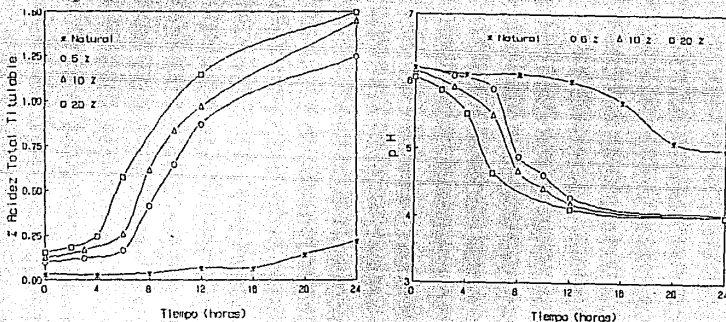


Fig.7.A.,7.B. Cinética de acidificación de yuca a 30°C utilizando *L. cellobiosus* (NRRL-B-184) como inóculo en niveles de 5% (○), 10% (△) y 20% (□) en peso comparando con una fermentación natural (*).

En el caso de *L. plantarum*, las fases lag fueron de 3, 3 y 2 horas para 5, 10 y 20% de inóculo, respectivamente. La condición de gari se alcanzó en 8 horas para 20%, 10 horas para 10% y 18 horas para 5%. Se observa en las figuras 8.A. y 8.B. un proceso de acidificación particular, ya que después de concluida la fase de acidificación rápida, el proceso decae ligeramente y vuelve a aumentar. Esto se explica en la siguiente sección por el patrón de consumo de azúcares.

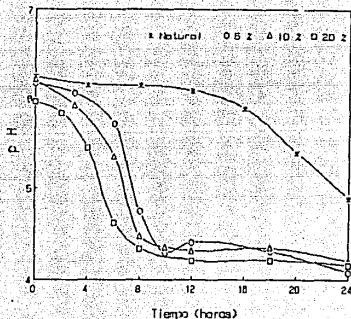
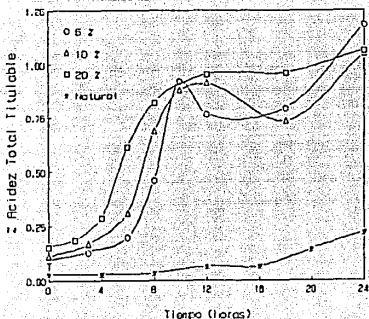


Fig. 8.A., 8.B. Cinética de acidificación para yuca a 30° C utilizando *Lactobacillus plantarum* (APC Eurozym) como inóculo en niveles de 5 (O), 10 (Δ) y 20% (□) en peso, comparando con una fermentación natural (*).

I.9. Consumo de los Azúcares Totales y Reductores Durante la Fermentación para los Diferentes Inóculos Utilizados.

El patrón de consumo de los azúcares disponibles totales durante la acidificación de la yuca es siempre descendente como puede verse claramente en la figura 9.A., aunque no llegan a agotarse totalmente, cuando se utiliza como inóculo licor de fermentación y en la figura 9.B. masa fermentada.

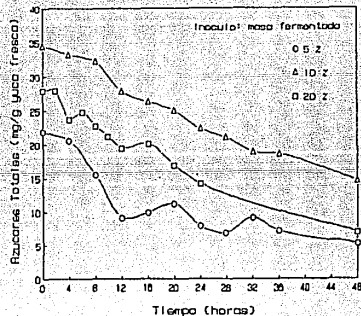
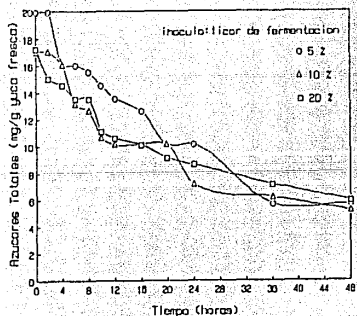


Fig. 9.A., 9.B. Cinética de consumo de azúcares totales para fermentación de yuca a 30° C inoculada con licor de fermentación y masa fermentada.

Sin embargo, para los azúcares reductores se tiene un aumento en la concentración entre las 4 y 8 horas para 5, 10 y 20% en peso de masa fermentada y a las 16 horas para la fermentación natural, como puede verse en la figura 9.C. Y en el caso de las fermentaciones inoculadas con licor a los mismos niveles (figura 9.D), el aumento se presenta a las 8 horas, indicando la actividad amilolítica en estos sistemas de fermentación, que se trata en detalle en el Capítulo II.

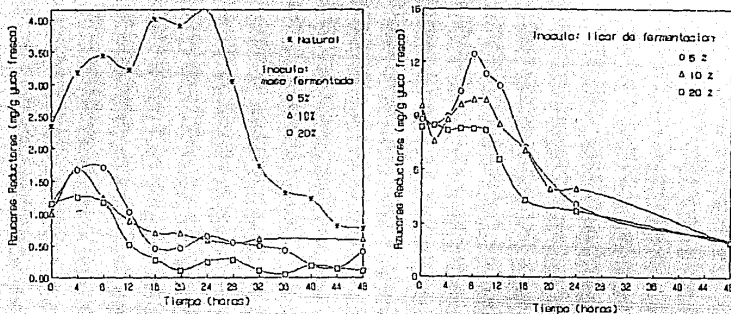


Fig.9.C y 9.D. Cinética de azúcares reductores para la fermentación de la yuca a 30° C inoculada con masa fermentada y con licor de fermentación.

Para los inóculos como *L. cellobiosus* y *L. plantarum* con sus respectivos niveles de inoculación, el patrón de consumo de azúcares totales es similar al mostrado anteriormente, pero no se presenta el aumento en azúcares reductores (figuras 9.E., F., G. y H.).

I.10. Cinéticas Naturales de Acidificación adicionando Glucosa.

En las cinéticas hechas con yuca fresca adicionando glucosa en niveles de 1, 2 y 3% en peso, no se aprecia una diferencia significativa entre niveles (fig 10.A., 10.B.y 10.C). El pH desciende de manera similar para los tres casos, teniéndose el máximo entre las 8 y las 12 horas y posteriormente la curva se estabiliza hasta alcanzar un valor mínimo de 4.2.

En el caso de la acidez, se nota una fase lag de 8 horas y rebasando este periodo se tiene un ascenso continuo en el contenido de ácido, alcanzando en 48 horas un nivel de acidez que varía entre 0.65 y 0.8%.

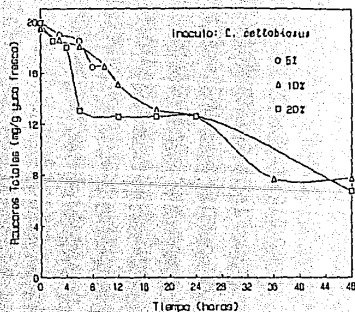
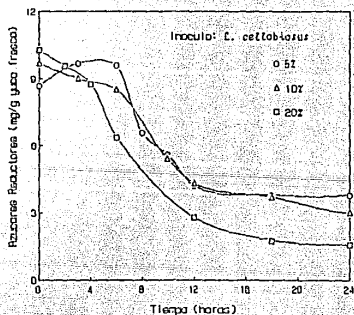


Fig. 9.E. y 9.F. Consumo de azúcares reductores y azúcares totales para *Lactobacillus cellobiosus* en niveles de inoculación de 5 (○), 10 (△) y 20% (□) en peso.

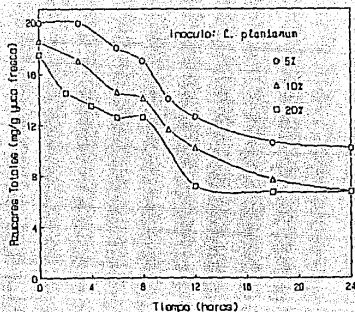
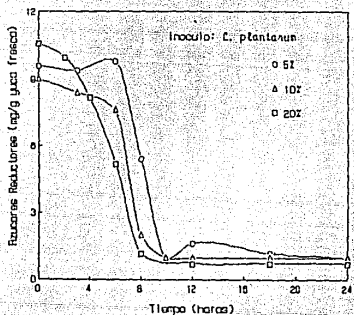


Fig. 9.G. y 9.H. Consumo de azúcares reductores y azúcares totales para *Lactobacillus plantarum* en niveles de inoculación de 5 (○), 10 (△) y 20% (□) en peso.

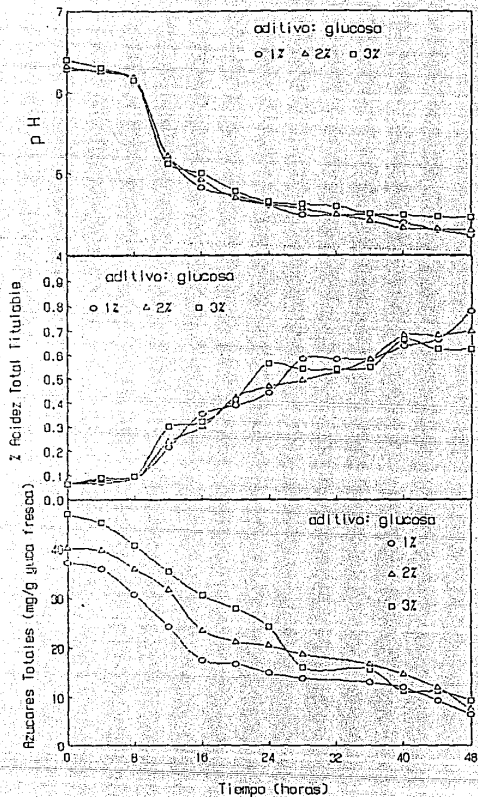


Fig.10.A,B. y C. Cinética de pH, % Acidez Titulable y consumo de azúcares totales para la fermentación natural de la yuca a 30° C a la que se adicionó glucosa en tres niveles 1 (○), 2 (△) y 3% (□) en peso.

El patrón de consumo de azúcares es similar para los tres casos, no encontrando diferencias importantes más que en los valores iniciales de contenido de azúcares totales. En 48 horas se alcanza un valor final entre 9.0 y 12.0 mg/g de yuca fresca, que continúan consumiéndose. Es notable que aún con la adición de glucosa, no se tiene una acidificación mayor que la encontrada con la aplicación de otros inóculos, y el patrón de acidificación es similar. Probablemente el factor controlante sea el ácido producido presente, que inhibe la utilización de los carbohidratos disponibles, así como la baja población microbiana existente en una fermentación natural.

I.11. Resumen de Resultados: Tiempos de Acidificación y Niveles de Acidez alcanzados.

En la tabla siguiente se muestran resumidos los tiempos aproximados de fermentación y de duración de fases lag de los diferentes inóculos y niveles descritos anteriormente, así como los valores de pH y % ATT alcanzados al finalizar el tiempo de fermentación.

TABLA 2. Comparación de Tiempos para alcanzar la condición de gari en la fermentación de la yuca utilizando diferentes inóculos y diferentes niveles.

INOCULO	NIVEL (%)	FASE LAG (HRS.)	COND. GARI (HRS.)	pH y % ATT
Natural		18	64 a 72	4.86, 0.87
Masa	5	4	44	4.50, 0.82
	10	4	30	4.25, 0.85
	20	2	24	4.25, 0.85
Licor	5	6	24	4.84, 0.87
	10	2	24	4.40, 0.88
	20	2	16	4.53, 0.85
L. plantarum	5	3	20	4.15, 0.90
	10	3	10	4.36, 0.87
	20	2	8	4.35, 0.82
L. cellobiosus	5	6	12	4.29, 0.87
	10	3	10	4.41, 0.83
	20	2	8	4.37, 0.88
Glucosa	1	8	mas de 48	4.24, 0.77
	2	8	mas de 48	4.31, 0.69
	3	8	mas de 48	4.46, 0.82

En la tabla anterior puede notarse que el aumento en el nivel de inóculo y el uso de inóculos de cepas puras acortan notablemente el tiempo de fermentación para alcanzar la condición de garí. En el caso de las fermentaciones adicionadas de glucosa, los tiempos requeridos son comparables con los tiempos de las fermentaciones inoculadas con 5% de masa fermentada

I.12. Capacidad Amortiguadora del Sistema de Fermentación.

Se observó también la capacidad amortiguadora en estos sistemas de fermentación, debido probablemente al grado de disociación de los ácidos orgánicos presentes durante la titulación, que se traduce en cambios mínimos de pH aunque el contenido de acidez aumente.

Como puede verse en la figura 11, los sistemas de fermentación no alcanzan niveles de pH menores de 3.9 a pesar de que el contenido de acidez es mayor a 1.25%.

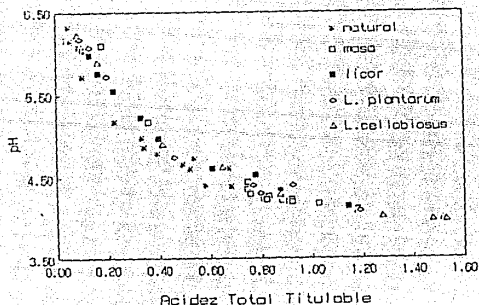


Fig. 11. Relación entre pH y % ATT para la fermentación natural de la yuca (x), y para las fermentaciones inoculadas con 5% en peso de masa fermentada (□), licor de fermentación (■), *L. cellobiosus* (△) y *L. plantarum* (○).

I.13. Ajuste de los Datos Experimentales de Acidificación al modelo de Gompertz.

Con el fin de describir los procesos fermentativos, los datos cinéticos obtenidos durante la fermentación de la yuca con los diferentes inóculos y a los diferentes niveles de inóculo, se ajustaron al modelo de Gompertz.

(Draper, 1981), que describe una dispersión de puntos de forma sigmoideal. El modelo proviene de la ecuación diferencial de crecimiento

$$\frac{d\omega}{dt} = k\omega \log(\alpha/\omega)$$

que integrada, es el modelo:

$$\omega = \alpha \exp(-\beta \exp -kt)$$

donde ω puede ser considerado en este caso, como la producción de producto P cuyas unidades son de contenido de acidez en porciento, β no tiene unidades pues es una constante de integración y k en hr^{-1} es una constante de crecimiento.

Este modelo tiene las propiedades de no ser asimétrico en el punto de inflexión y cuando $t = 0$, $P = \alpha \exp(-\beta)$ y cuando $t \rightarrow \infty$, $P \rightarrow \alpha$. Por lo que una forma de expresar este modelo es:

$$P = P_{\max} \exp(-\beta \exp kt)$$

y α queda expresada como la máxima producción de producto. En general, el valor de las constantes del modelo hacen variar los puntos a partir de los cuales emanan las curvas generadas, es decir, para valores dados de β y variando k se tiene que las curvas emanarán de un solo punto en el eje y; fijando para α y k valores de 1 y para determinados valores de β , los puntos de donde emanan las curvas, variarán a lo largo de ambos ejes.

A continuación se listan los valores de las constantes típicas del modelo de Gompertz, así como los rendimientos globales $Y_{p/\infty}$ de las fermentaciones para los diferentes niveles e inóculos utilizados. Estas constantes fueron obtenidas minimizando la suma de las desviaciones cuadráticas entre los datos experimentales y el modelo, y la minimización se realizó por medio de un método tipo Marquardt (IMSL Library, 1986). Las desviaciones cuadráticas promedio para todos los casos son de 2.5%.

TABLA 3. Valores de las constantes típicas del modelo de Gompertz para la fermentación de la yuca.

FERMENTACION	P _{máx} (α)	β	k hr ⁻¹	P _{exp} (máx)	Y _{p/c} (mg glucosa)
Natural	0.9974	3.6	0.0421	0.87	0.393
Masa Fermentada					
5%	0.7665	2.10	0.0895	0.729	0.420
10%	1.17	2.75	0.0830	1.116	0.40
20%	1.2018	1.93	0.0981	1.165	0.546
Licor Fermentacion					
5%	1.1520	3.38	0.1011	1.175	0.55
10%	1.1861	2.27	0.0850	1.2192	0.73
20%	1.2044	1.83	0.0890	1.1176	0.88
L.cellobiosus					
5%	1.5028	10.4	0.2638	1.6476	0.576
10%	1.6410	4.42	0.1764	1.7625	0.669
20%	1.8158	3.25	0.1609	1.8685	0.702
L. plantarum					
5%	0.9832	26.88	0.4675	1.1845	0.601
10%	0.9360	10.19	0.4199	1.051	0.444
20%	1.0293	4.081	0.3392	1.0696	0.493
Glucosa					
1%	0.7634	3.27	0.1571	0.778	0.126
2%	0.7471	3.13	0.0769	0.699	0.107
3%	0.6348	3.64	0.1134	0.623	0.085

Como puede verse en la tabla anterior, los valores de P_{máx} calculados por el modelo se aproximan a los valores experimentales de máxima producción de ácido, y los valores de β disminuyen conforme aumenta el nivel de inóculo.

Puede observarse que el valor de k aumenta notablemente para cepas puras, que muestran las más altas producciones de ácido particularmente con *L. plantarum* y estos valores son comparables para inóculos tales como masa y licor.

Es decir, a mayores niveles de inoculación, el proceso de acidificación se acelera alcanzando altas concentraciones de ácido en tiempos más cortos. Igualmente, se nota que el valor de β aumenta en el caso de la inoculación con cepas puras, particularmente, con *L. plantarum*. En la tabla 3 puede apreciarse que los valores de β presentan cierta relación entre niveles de inoculación, ya que el valor de β tiende a disminuir conforme aumenta el nivel de inóculo, pero no guardan relación entre inóculos.

La figura 12.A. muestra el ajuste de la curva experimental y la curva generada con los datos calculados de una fermentación inoculada con licor al 5%.

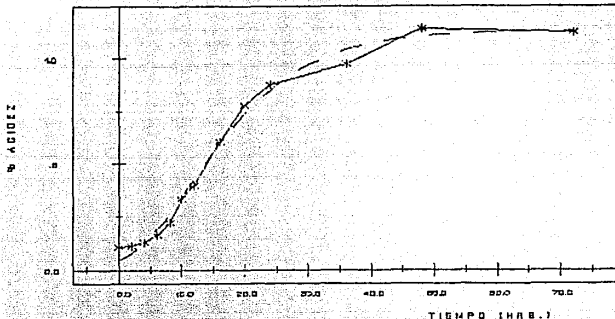


Fig.12.A. Cinéticas de acidificación para yuca inoculada con licor de fermentación al 5% en peso comparada con la curva ajustada del modelo de Gompertz.

La figura 12.B. muestra la curva de acidificación para *L. cellobiosus* a un nivel de inoculación de 5% en peso.

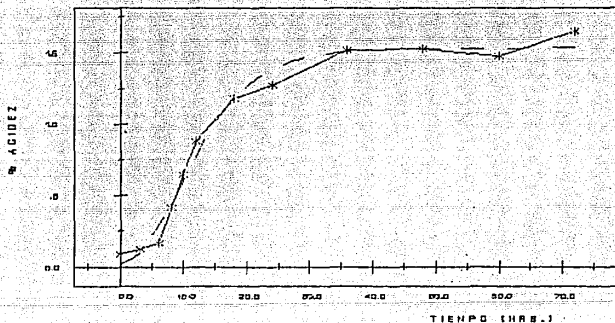


Fig. 12.B. Cinética de acidificación para *L. cellobiosus* comparando con la curva de ajuste del modelo de Gompertz.

De las gráficas anteriores se aprecia que el modelo se ajusta a las curvas experimentales obtenidas con los inóculos utilizados aún aquellos con gran capacidad acidificante como las cepas puras.

Resulta claro que el modelo de Gompertz es válido tan sólo para representar

un grupo de datos experimentales en forma funcional, pues se trata de un modelo fenomenológico. Sin embargo, con este modelo se pueden hacer predicciones cualitativas del fenómeno en cuestión, en este caso, el patrón de fermentación y sus parámetros característicos, así como interpolaciones entre niveles de inoculación.

CAPITULO II

ACTIVIDAD AMILOLITICA DURANTE LA FERMENTACION ACIDA DE LA YUCA

II.1. Introducción.

De Battisti et al. (1981), señalan que el contenido de almidón de la yuca es dos o tres veces mayor que el contenido de azúcares reductores dependiendo de la variedad.

En los sistemas fermentativos estudiados en este trabajo, se encontró que existe un aumento en la concentración de azúcares reductores en las fermentaciones naturales y en las fermentaciones inoculadas con 5% en peso de licor y masa fermentada. Debido a que la actividad enzimática presenta gran dependencia con el cambio de pH, este fenómeno no se tiene en fermentaciones con niveles de inoculación más altos o inoculados con cepas puras que tienen gran capacidad de producción de ácido.

Se cree que el aumento de azúcares reductores en la fermentación es debido a la hidrólisis de almidón por amilasas y aparentemente, la actividad amilolítica es endógena de la yuca y las enzimas se liberan al dañarse los tejidos durante la preparación de la raíz.

II.2. Definición de la Actividad Amilolítica.

Para cuantificar la actividad amilolítica en las fermentaciones que presentaron aumento en la concentración de reductores, se prepararon extractos crudos de yuca fresca y con estos se determinó la temperatura y pH óptimos para la exhibición de la actividad, se determinaron los parámetros cinéticos del modelo de Michaelis-Menten, se identificaron los productos de hidrólisis y se determinó en forma cualitativa el posible origen de la actividad amilolítica. La metodología implementada para la cuantificación de la actividad en estos experimentos así como para la preparación del extracto crudo enzimático están descritos en el Anexo III de Actividad Amilolítica. La actividad para estos sistemas está expresada como la cantidad de extracto crudo enzimático que libera 1 micromol de glucosa por minuto bajo las condiciones de reacción, que son 30° C y 20 minutos aplicando extractos

enzimáticos crudos a soluciones de almidón puro con una concentración de 10 mg/ml.

Cabe mencionar que en estos sistemas de fermentación no se encontró actividad pectinolítica utilizando soluciones de pectina de 10 mg/ml, ni se encontró actividad sacarolítica utilizando soluciones de sacarosa de 1 mg/ml a 30° C, para los extractos enzimáticos mencionados anteriormente, que como señalan Padjama *et al.* (1982) y Uritani *et al.* (1982), son actividades propias de la yuca al dañarse los tejidos. La presencia de actividad pectinolítica contribuiría a la explicación de la liberación del licor de fermentación señalada en I.4.

II.3. Actividad Amilolítica para Yuca Fresca y para Fermentaciones Inoculadas con Masa Fermentada y Licor de Fermentación.

La yuca fresca presentó la mayor actividad amilolítica encontrada en estos sistemas, teniendo la máxima al inicio de la fermentación, 0.37 mg de reductores/ml extracto/minuto a pH de 6.2. A partir de este punto, la actividad decae constantemente. Para este sistema el mayor incremento en la concentración de azúcares reductores se encontró entre las 16 y 24 horas, siendo el valor máximo de 4.2 mg de azúcares reductores/ g de yuca fresca. Las figuras 13.A. y 13.B. muestran los resultados mencionados.

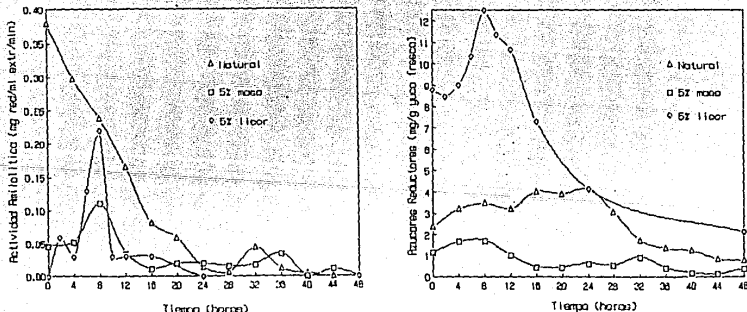


Fig. 13.A., 13.B. Actividad amilolítica y cinética de liberación de azúcares reductores en una fermentación natural de yuca (▲), inoculada con 5% en peso de masa fermentada (◻) y con 5% de licor de fermentación a 30° C.

Durante la fermentación de yuca inoculada, ya sea con licor o con masa fermentada, a un nivel de inoculación de 5% en peso, la máxima actividad se alcanzó a las 8 horas cuando el pH de la fermentación era de 5.6 y con un incremento en la concentración de azúcares reductores de hasta 3 mg/ml. Como se observa en las figuras 14.A. y 14.B., al rebasar este punto, la actividad decae notablemente y los azúcares se consumen rápidamente hasta agotarse a las 48 horas de fermentación, el pH alcanzado no es menor a 4.0 y la máxima acidez es de 0.8%. Cuando se utilizaron niveles más altos de inoculación como 10 y 20%, no se encontró actividad amilolítica ni el consecuente aumento de azúcares reductores, probablemente debido a que un mayor nivel de inóculo se traduce en una mayor acidificación en menos tiempo de fermentación y las enzimas involucradas muestran gran sensibilidad a los cambios de pH.

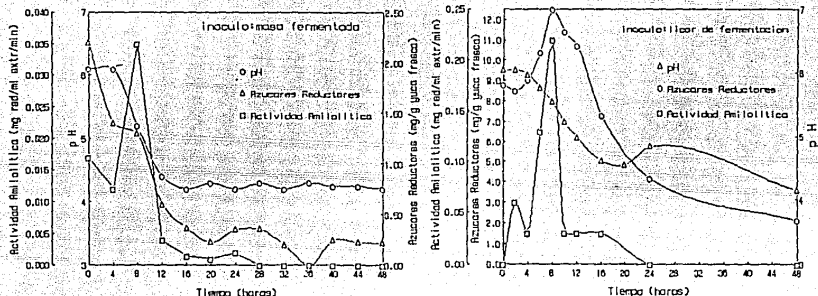


Fig. 14.A., 14.B. Cinética de acidificación (○), actividad amilolítica expresada en mg de reductores/ml extracto/minuto (□) y consumo de azúcares reductores durante la fermentación de yuca a 30° C inoculada con 5% en peso de masa fermentada y 5% en peso de licor de fermentación.

II.4. Actividad Amilolítica en Fermentaciones Inoculadas con Cepas Puras.

En los sistemas con la adición de inoculos tales como *L. cellobiosus* (NRRL-B-184) reportado como amilolítico por Sribir y Chakrabarty (1984) y *L. plantarum* (APG Eurozym), no se encontró actividad amilolítica ni aumento relevante en la concentración de azúcares reductores para ninguno de los niveles de inoculación utilizados. Como se verá en la siguiente sección, un alto contenido de acidez como el producido por estos inóculos, puede inhibir la actividad amilásica.

II.5. Determinación de los Valores Óptimos de Temperatura y pH.

Se determinaron los valores óptimos de pH y temperatura de reacción en los extractos enzimáticos crudos obtenidos de yuca fresca, ya que fue el sistema que mostró mayor actividad amilolítica, usando diferentes soluciones amortiguadoras, desde pH 3.0 hasta 9.0 a una concentración de 0.1 M y las temperaturas variaron desde 20° a 70° C. Las condiciones óptimas para la exhibición de la actividad amilolítica en yuca fresca se encontraron entre 30° y 40° C y a pH 6.0, fuera de este intervalo la actividad decae de manera notable, mostrando una fuerte dependencia del sistema amilolítico con el cambio de pH, como puede verse en las figuras 15. A. y 15. B.

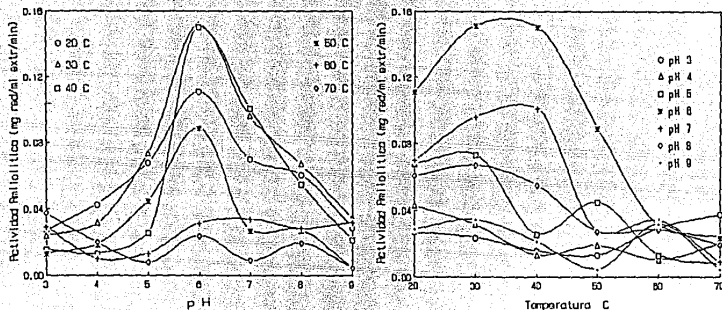


Fig. 15. A. y 15. B. Condiciones óptimas de pH y temperatura para la exhibición de la actividad amilolítica en extractos crudos de amilasa de yuca fresca.

II.6. Determinación de los Parámetros Cinéticos.

Para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten se usaron extractos crudos de yuca fresca, utilizando soluciones de almidón puro en concentraciones de 1 a 50 mg/ml y las reacciones se llevaron a cabo a las condiciones óptimas encontradas. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos por medio de la modificación de Hanes-Woolf a la ecuación de Michaelis-Menten y los valores resultantes fueron $K_m = 5.51637$ mg de almidón/ml y $V_{max} = 0.206$ mg de glucosa liberados/ml de extracto/min.

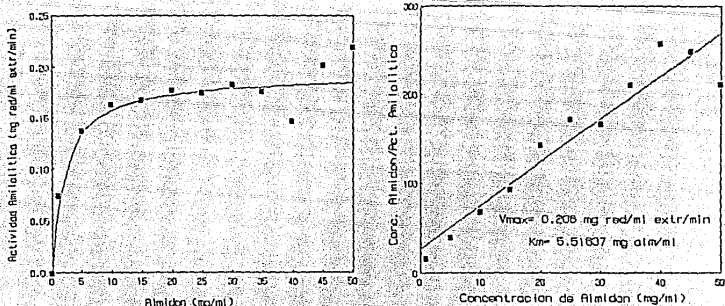


Fig. 16.A. y 16.B. Cinética de Michaelis-Menten y el ajuste a la modificación de Hanes-Woolf para amilasa de yuca a 30° C.

II.7. Identificación de los Azúcares Liberados.

Del licor liberado de la fermentación natural de la yuca al tiempo al cual la actividad enzimática era la máxima, aproximadamente a las 6 horas, se identificaron los productos de hidrólisis por cromatografía en capa fina utilizando placas de silicagel G, aplicando 10 microlitros de licor de fermentación. Las placas se dejaron correr en un sistema de solventes con n-butanol/acetona/agua en una proporción de 4:5:1 y se usó antrona como agente revelador (Stahl, 1969). Los azúcares encontrados en este análisis fueron glucosa, maltosa y dextrinas, además de fructosa y sacarosa, lo que indica que probablemente la enzima involucrada sea una α -amilasa.

II.8. Identificación del Origen de la Actividad Amilolítica.

Ya que se tienen reportes de que la yuca muestra actividad enzimática importante al dañarse los tejidos (Padjama *et al.*, 1982) y con el fin de identificar la procedencia de la actividad amilolítica, se llevaron a cabo fermentaciones inoculadas con 5% en peso de licor y fermentaciones naturales, pero con la adición de antibióticos como penicilina G y pentrexil, un antibiótico de amplio espectro, para inhibir el crecimiento microbiano. Se utilizaron 200 unidades por gramo de yuca fresca y la actividad amilolítica se determinó con el método descrito en el Anexo III. Simultáneas a éstas, se corrieron fermentaciones sin la adición de antibiótico, a manera

de control y para comparar los patrones de acidificación y de actividad. Para todas estas fermentaciones se hizo además, un seguimiento del efecto de los antibióticos sobre los microorganismos presentes en la fermentación en agar MRS acidificado a pH 5.0 y en PDA acidificado a pH 4.5 para la detección del crecimiento de bacterias lácticas, hongos y levaduras, respectivamente (ver Anexo III.E.2), tomando la muestra del licor escurrido durante la fermentación.

Las fermentaciones inoculadas con 5% de licor llevadas a cabo con y sin la adición de antibióticos, muestran que la actividad amilolítica es similar en ambos sistemas, se presenta después de 10 horas de fermentación y cuando el pH es de 5.5. El valor máximo de la actividad para la fermentación con la adición de antibióticos es de 0.16 mg reductores/ml extracto/min y se presenta un aumento en la concentración de azúcares reductores durante las primeras tres horas desde un valor inicial de 12 mg/g de yuca fresca hasta 32.25 mg/g.

Los azúcares no son consumidos y la concentración alcanzada permanece constante hasta el final de la fermentación. No se tiene el patrón de acidificación comunmente encontrado, pues los microorganismos presentes son inhibidos a 3 horas de iniciada la fermentación por la adición de los antibióticos, como se determinó por medio del seguimiento microbiológico para este sistema. A diferencia de la fermentación llevada a cabo sin la adición de antibióticos, en la que los azúcares se consumen constantemente, el pH baja hasta un valor de 4.0 y la máxima actividad es de 0.2 mg red/ml ext/min. En las fermentaciones naturales la actividad es más alta al inicio de la fermentación, para ambos sistemas, con y sin antibióticos. El valor máximo de la actividad amilolítica para la fermentación sin antibióticos es de 0.56 mg red/ml ext/min y decae durante las primeras 8 horas, el pH empieza a disminuir a las 24 horas y el máximo aumento en la concentración de azúcares es de 9.6 mg/g de yuca fresca y se presenta entre las 8 y las 16 horas, transcurrido este tiempo se consumen rápidamente.

Para la fermentación natural con antibióticos, la máxima actividad es de 0.48 mg red/ml ext/min y sigue un patrón similar al sistema descrito anteriormente. El pH no es menor de 5.9 durante todo el tiempo transcurrido, los microorganismos desaparecen a partir de las 4 horas y a partir de este momento los azúcares aumentan constantemente hasta alcanzar un valor máximo de 11 mg/g de yuca fresca. En la siguiente tabla pueden compararse los resultados de actividad amilolítica, concentración de azúcares reductores y pH de los sistemas de fermentación descritos anteriormente.

Tabla 4. Actividad amilolítica, pH y Azúcares Reductores en fermentaciones de yuca adicionadas con antibióticos.

SISTEMA DE FERMENTACION INOCULADO CON 5% DE LICOR						
TIEMPO (hrs)	pH		ACTIVIDAD AMILOLITICA (mg red/ml extr/min)		AZUCARES REDUCTORES (mg/ml)	
	c/antib	s/antib	c/antib	s/antib	c/antib	s/antib
0	6.0	6.1	0.125	0.125	12.0	12.0
3	5.9	5.8	0.05	0.05	32.25	31.62
6	6.1	5.9	0.05	0.075	26.25	30.37
11	5.9	5.5	0.16	0.075	30.0	27.25
15	6.0	4.7	0.15	0.2	29.25	16.75
20	6.1	4.4	0.0	0.0	30.5	12.5
40	6.0	4.0	0.0	0.0	27.4	11.5

SISTEMA DE FERMENTACION NATURAL						
TIEMPO (hrs)	pH		ACTIVIDAD AMILOLITICA (mg red/ml extr/min)		AZUCARES REDUCTORES (mg/ml)	
	c/antib	s/antib	c/antib	s/antib	c/antib	s/antib
0	6.2	6.2	0.48	0.56	7.5	7.5
4	6.1	6.1	0.31	0.28	8.0	8.0
8	6.1	6.1	0.0	0.0	9.3	9.6
12	6.1	6.1	0.0	0.0	10.0	9.6
24	6.1	5.0	0.0	0.0	10.8	7.6
48	5.9	4.4	0.0	0.0	11.0	5.6

La información obtenida de los resultados anteriores puede indicar que las enzimas amilolíticas provienen de la yuca y no de los microorganismos responsables de la fermentación, como son las bacterias lácticas que son inhibidas con los antibióticos en las primeras horas y de las que se reporta, liberan fracciones amilolíticas con actividad en las últimas etapas de crecimiento (Sribir y Chakrabarty, 1984).

Probablemente las enzimas provenientes de la yuca son liberadas durante el pretratamiento de la raíz para someterla a fermentación, que implica el daño de los tejidos tal como señalan Padjama, et al. (1982).

CAPITULO III

FERMENTACIONES SUCESIVAS Y ECOLOGIA DE LA FERMENTACION

III.1. Introducción

La información concerniente a los microorganismos involucrados en la fermentación del gari es contradictoria y poco reciente, además de que no especifica si estos se encuentran como poblaciones microbianas establecidas en el sistema fermentativo.

En este trabajo resultó importante analizar la estabilidad y reproducibilidad de las características fisicoquímicas del producto fermentado obtenido, reinoculando de manera sucesiva con masa y con licor de fermentación al nivel mínimo de inoculación de 5% en peso, con el pH y la acidez descritos anteriormente para cada uno de estos inóculos al momento de ser adicionados. Para las fermentaciones sucesivas, inoculadas con masa fermentada, se aislaron, se identificaron y se agruparon en géneros a algunos de los microorganismos responsables del proceso de acidificación y se determinó la secuencia de la presencia de bacterias lácticas y levaduras en fermentaciones naturales de 10 días, correlacionándola con el cambio de pH.

III.2. Fermentaciones Sucesivas

Al llevar a cabo las fermentaciones sucesivas, en el sistema de fermentación descrito en el diagrama 2 del Capítulo I, con la masa o el licor obtenidos de una fermentación anterior con las características fisicoquímicas típicas del gari, a un nivel de inoculación de 5% en peso, hasta en 15 ocasiones seguidas, se comprobó que el patrón de acidificación es similar durante todas las fermentaciones, lo que indica que el proceso se hace reproducible.

En la figura 17 se presenta una gráfica de acidez, al momento en que se alcanzan valores de pH y % ATT similares a los del gari, con respecto al número de reinoculaciones sucesivas llevadas a cabo con los inóculos señalados anteriormente. La acidez total corresponde a la encontrada después de 48 horas de fermentación o cuando se alcanza la condición de gari.

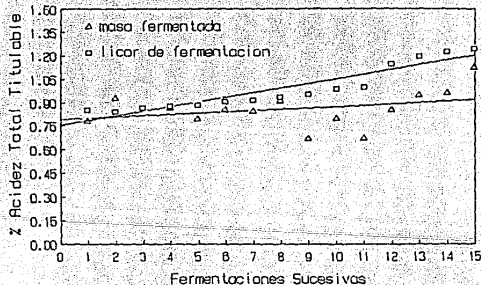


Fig. 17. Patrón de acidificación en fermentaciones sucesivas reinoculando en 14 ocasiones sucesivas con masa fermentada (Δ) y licor de fermentación (\square).

Se observa que la tendencia de acidificación de las fermentaciones sucesivas tanto para masa como para licor, es la de aumentar lentamente hacia un nivel de acidificación cada vez mayor, probablemente por el establecimiento y prevalencia de los microorganismos mejor adaptados al proceso.

Esta tendencia se ajusta a una recta con una pendiente mayor que cero, en un intervalo de confianza de 95%, para ambos inóculos utilizados. Sin embargo, las fermentaciones sucesivas inoculadas con licor presentan esta tendencia de manera más consistente y la pendiente es mayor que para las inoculadas con masa fermentada, probablemente porque durante el escurrimiento del licor, además de presentarse el "lavado" de minerales y materiales solubles como señala Ezeala (1984), se tiene también el "lavado" de microorganismos y probablemente en este licor de fermentación se encuentren en un número relativamente mayor que en la masa fermentada (Ogunsua et al., 1983).

De esta forma, el tiempo requerido para alcanzar las características fisicoquímicas deseadas se acorta para las fermentaciones inoculadas con licor, de 48 a 24 horas a partir de la 6a. fermentación.

Las fermentaciones sucesivas reinoculadas de la masa obtenida de fermentaciones anteriores, mantienen un tiempo estable de fermentación de 48 horas para alcanzar las características fisicoquímicas similares a las del gari, hasta la 13ava. fermentación.

La aplicación de esta masa fermentada o del licor de fermentación con las características propias del gari, implica a su vez que se selecciona la edad del inóculo y por lo tanto, el tipo y cantidad de los microorganismos

presentes, lo cual propicia el establecimiento de una población adaptada y seleccionada, que fue estudiada por aislamiento purificación e identificación en géneros, implementando una metodología apropiada.

III.3. Metodología

Se siguió una metodología de aislamiento y purificación de cepas adaptada para este sistema fermentativo y basada en técnicas clásicas de microbiología recomendadas por Buchanan, ed. (1974); Grazia y Suzzi, (1984); Krieg (1981), Simbert y Krieg (1981) y Koch (1981); Harrigan y Mc Cance, (1979); Mc Donald, *et al.* (1987); Miyamoto, *et al.* (1982); Sharpe, (1981) y Sharpe (1977), descritas en detalle en el Anexo II de Métodos Microbiológicos. Para la agrupación en géneros de las cepas aisladas, se llevaron a cabo algunas pruebas bioquímicas con la metodología indicada por Mc Faddin (1980), seleccionadas en base a las características morfológicas encontradas en éstas durante el proceso de aislamiento y purificación que están descritas en el Anexo II.C.1 a 6, entre ellas:

- prueba de la catalasa,
- producción de gas a partir de glucosa,
- actividad fermentativa en leche tornasolada,
- hidrólisis de almidón,
- producción de amoníaco a partir de arginina y
- crecimiento en un medio líquido de yuca adicionado de minerales.

Para la determinación de la secuencia de microorganismos durante fermentaciones naturales de la yuca de 10 días, se hicieron cuentas totales en placa como recomienda harrigan y Mc Cance (1979) y Koch (1981) y se determinó el número poblacional de bacterias lácticas, hongos y levaduras, utilizando medios selectivos para cada grupo. La metodología está descrita en detalle en el Anexo II.D.

III.4. Aislamiento de Microorganismos.

El aislamiento de microorganismos para estudios de ecología se hicieron utilizando el sustrato proveniente de la 7a., 11ava. y 13ava. fermentaciones sucesivas inoculadas con masa fermentada.

Se tomó el contenido total de las columnas, mezclándolo con agua estéril y

haciendo diluciones a partir de esta mezcla. Posteriormente, las diluciones respectivas se sembraron en cajas de agar MRS y cuando se tuvo crecimiento, se picaron colonias al azar que fueron resembradas nuevamente en agar MRS para continuar con un proceso de purificación. La metodología seguida para el aislamiento de microorganismos esta descrita en detalle en el Anexo II.A.

III.S. Purificación de las Cepas Aisladas.

Posteriormente se siguió una secuencia de purificación para la identificación posterior de las cepas, consistente en pases de medio líquido a medio sólido MRS y viceversa acidificados a pH 5.5 y con la misma composición ambos a excepción del agar adicionado, haciendo tinción de Gram para cada pase, examinando las estructuras celulares al microscopio y examinando la morfología de las colonias que crecían en medio sólido para determinar la homogeneidad de la apariencia.

Se consideró que las cepas estaban puras cuando la apariencia de las colonias obtenidas era homogénea y cuando las tinciones mostraban estructuras celulares similares en observaciones al microscopio, tal como lo recomiendan Simbert y Krieg (1981).

A través del proceso de purificación, se obtuvieron 70 cepas en total, las cuales mostraron vire del colorante, acidificaron en 24 horas el medio MRS líquido incubando a 35° C. alcanzando un pH final de 5.0 a 4.3 y daban una respuesta negativa a la prueba de la catalasa. Las tinciones de Gram mostraron en general, estructuras celulares tales como cocos en mayor cantidad y muy escasos bacilos, todos negativos. La metodología esta descrita en detalle en el Anexo II.B.

III.B. Morfología de las Colonias de los Grupos Encontrados.

Se encontraron tres diferentes tipos de colonias predominantemente, con una morfología bien definida, que resultaron ser tres grupos de bacterias de la familia *Streptococcaceae*. El primer grupo o Grupo morfológico I estaba formado por colonias blancas-grisáceas, con centros elevados, de bordes regulares y ligeramente translúcidos, de apariencia opaca, redondas y pequeñas, representando alrededor de 33% del total de las colonias obtenidas. Las estructuras celulares encontradas mostraron cocos en pares y cadenas cortas. El segundo grupo o Grupo morfológico II mostró colonias cremosas, de

color amarillo claro, de apariencia húmeda, brillante, circulares, convexas, de bordes muy consistentes y bien definidos y las estructuras celulares consistieron en pares de cocos y cadenas muy cortas; este tipo constituyó el 42% del total de las cepas aisladas.

El tercer grupo o Grupo morfológico III identificado, representó el 21% del total de las cepas aisladas y mostró colonias con formas redondeadas y con bordes irregulares, planas, de aspecto húmedo y brillante, de consistencia suave y color amarillo-café. Las estructuras observadas al microscopio mostraron cocos en pares, tétradas y algunos aislados.

III.7. Agrupación de las Cepas Aisladas en Géneros.

Las cepas se probaron con algunas pruebas bioquímicas llevadas a cabo como lo indica Mc Faddin (1980) y seleccionadas particularmente para agruparlas en géneros, en base a las características morfológicas encontradas en los tres diferentes grupos. La composición de los medios utilizados en estas pruebas bioquímicas y la metodología seguida para efectuarlas, está descrita en el Anexo II.C.

Fueron agrupadas como homo y heterofermentativas por la prueba de producción de gas en medio basal líquido con inserto de Durham y en medio basal sólido con sello de agar.

Las cepas se probaron para crecimiento en leche tornasolada para diferenciar el género *Streptococcus* del género *Leuconostoc*, ya que es bien conocido que los *Leuconostoc* no acidifican o cuajan la leche si ésta no esta adicionada de una fuente de carbono como glucosa y de extracto de levadura (Buchanan, et al. 1974).

El 37% de las cepas clasificadas como *Leuconostoc* crecieron bien en un medio líquido compuesto de 10% de yuca, 0.06% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03% de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ y 0.02% de púrpura de bromocresol (ver Anexo II.C.8).

La hidrólisis de arginina se utilizó para confirmar que las cepas que no acidificaban la leche no hidrolizaban la arginina para la liberación de amoníaco como usualmente sucede con los *Streptococci*.

Las cepas que dieron una respuesta positiva para la prueba de leche tornasolada e hidrólisis de arginina, como las del Grupo morfológico II se consideraron como *Streptococcus*.

Algunas cepas fueron clasificadas como *Pediococci* por la morfología de colonia correspondiente a la del Grupo morfológico III y los arreglos y agrupamientos celulares observados en el microscopio, que consistieron en

cocos solos, en pares y tétradas. Estas cepas no mostraron producción de gas a partir de glucosa, por lo que se les clasificó como homofermentativas y crecieron bien en condiciones aerobias de incubación, pero las colonias obtenidas eran pequeñas y en ocasiones escasas.

Estas cepas dieron una respuesta variable en leche tornasolada, cambiando el color del medio de azul-púrpura a rosa, indicando acidificación ligera, pero sin cuajado de la leche.

Ninguna de las cepas aisladas dió una respuesta positiva a la prueba de hidrólisis o utilización de almidón en medio MRS-almidón líquido o sólido, ni dieron muestras de utilizar el almidón en un medio cuya fuente de nitrógeno son únicamente nitratos utilizado por Sribir y Chaknabarty (1986) y por Olukayode y Olusola (1987) y cuya composición esta descrita en el Anexo II.C.5. En la siguiente tabla se muestran los resultados anteriores.

TABLA 5. Pruebas Bioquímicas para las Cepas Aisladas durante las Fermentaciones Sucesivas de la Yuca.

GRUPO	GRAH	CATALASA	GAS DE GLUCOSA	LECHE TORNASOL	ARGININA	ALMIDON
I	+	-	+	-	-	-
II	+	-	-	+	+	-
III	+	-	-	v	nd	-

nd: no determinado; v: variable

En el aislamiento y purificación de las cepas provenientes de fermentaciones sucesivas, no se encontraron levaduras, confirmando que la selección de la edad del inóculo selecciona también la microflora que se establece en estos sistemas.

III.8. Ecología Microbiana en la Fermentación Natural de la Yuca. Cuentas Totales en Placa.

Para las cuentas totales en placa en fermentaciones naturales de yuca a 30° C durante 10 días, se utilizó agar MRS con acetato de sodio y púrpura de bromocresol para cuenta de bacterias lácticas y PDA para la detección de hongos y levaduras. Las cuentas y la siembra de muestras de la fermentación se hicieron diariamente, haciendo diluciones de 1:10 a 1:100,000, con la metodología descrita en el Anexo II.E.

Los resultados mostraron que las bacterias acidificantes como cocos o bacilos predominan desde el segundo día de fermentación y alcanzan los números

poblacionales más altos durante el tercer día en cantidades que van desde 10^7 a 10^9 UCF por gramo de yuca fermentada.

Las levaduras estuvieron presentes en este caso durante todo el tiempo de fermentación en pequeñas cantidades, alrededor de 10^3 y permanecieron estables en cuanto a número poblacional sin aumentos significativos y no se encontraron hongos. La tabla siguiente muestra estos resultados numéricamente, los cuales son comparables con los presentados por Ogunsua, *et al.* (1983).

TABLA 6. Cuentas Poblacionales en la Fermentación de la Yuca a 30° C.

Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	6.2	4.0	4.6	4.4	4.2	4.2	4.3	4.9	5.1	5.2	5.1
Lácticas	5.3E5	4.3E7	6.6E8	6.7E9	7.7E9	5.0E9	2.2E9	8.8E8	6.5E8	4.4E8	9.2E7
Levaduras	2.3E3	3.1E3	4.9E3	5.0E3	5.8E3	6.3E3	6.5E3	6.7E3	6.9E3	7.0E3	7.1E3

En la tabla 5, puede observarse que hay un aumento gradual del pH conforme disminuye la población de bacterias lácticas y aumenta ligeramente la población de levaduras, debido probablemente al consumo del ácido presente por éstas según señala Baseler y Fields (1984) y Deiana, *et al.* (1984).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo se implementó una metodología y un sistema de fermentación con el fin de reproducir la fermentación tradicional de la yuca para obtener un producto con las características del garí, tal como lo reportan Lancaster, et al. (1982); Ogunsua, et al. (1983) y Etejere y Ramakrishna (1985).

El sistema de columnas para la fermentación, promueve este proceso de acidificación facilitando que las bacterias lácticas predominen sobre cualquier otro microorganismo, como levaduras u hongos. Igualmente, es un sistema que promueve el escurrimiento del licor y su recuperación, disminuyendo el contenido de humedad de la yuca y dándole características determinadas de acidez.

Se determinó que el nivel mínimo de inoculación necesario para hacer reproducible el proceso de acidificación fue de 5% en peso. Posteriormente se encontró el tiempo requerido para alcanzar las características fisicoquímicas del producto deseado para varios niveles de inoculación y para varios inóculos.

En este sentido se consiguió reproducir el proceso fermentativo de este alimento, incluyendo como inóculo la adición del licor, mismo que actualmente es aplicado para acelerar la fermentación en procesos mecanizados.

Las cepas puras de las bacterias lácticas utilizadas como *Lactobacillus cellobiosus* (NRRL-B-184) y *Lactobacillus plantarum* (APG Eurozym), se recomiendan como inóculos, ya que acidifican rápidamente el sustrato con poca variación en las características fisicoquímicas finales obtenidas, acortan el tiempo de fermentación notablemente y mejoran el aroma del producto.

Aunque al aplicar estos inóculos se mejora el proceso de acidificación, no se tiene la actividad amilolítica, pero la concentración de azúcares disponibles es suficiente para la producción de la cantidad de ácido deseado. Sin embargo, es necesario implementar un medio de cultivo para el crecimiento de estas bacterias, tal que al adicionarse al sustrato no añada sabores extraños o desagradables al producto.

Una forma de inoculación sin la adición de sustancias que añaden sabores extraños es la adición de masa fermentada o licor de una fermentación anterior, que como se demostró, es un sistema reproducible y estable en donde la reinoculación sucesiva selecciona a la población microbiana y el efecto

obtenido es el de acortar el tiempo de fermentación para mayor producción de ácido.

Aunque se demostró que 5% como nivel mínimo de inoculación es suficiente para hacer reproducible la fermentación, es necesario señalar que probablemente el tamaño de inóculo influya también en este proceso, ya que un nivel de inoculación mayor llevaría el proceso hacia una producción de ácido mayor en un tiempo más corto, seleccionando más rápidamente a la población microbiana. La actividad amilolítica que probablemente proviene de las enzimas propias de la yuca y se presenta en rangos de pH de 5.0 a 6.0, durante las primeras horas de fermentación, puede ser considerada como una característica del sistema de fermentación tradicional, que favorece el proceso, ya que los azúcares producidos son consumidos para la producción de ácido.

Más no es una característica determinante para su desarrollo, pues la acidificación se da aún cuando la actividad no se presenta y parece ser dependiente más del tamaño de inóculo que de una cantidad abundante de azúcares reductores, como se demostró en las cinéticas de fermentación natural de la yuca, adicionadas de glucosa.

En los estudios microbiológicos efectuados en las fermentaciones sucesivas, se tiene que predominan microorganismos tales como *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* que se adaptan y resisten los niveles de acidez, aunque el sistema de fermentación contribuye a la implantación de estas poblaciones por que promueve un ambiente semi-anaerobio y el escurriamiento, que va reduciendo la cantidad proporcional de otros microorganismos. Pero también la edad del inóculo es determinante, pues como en el caso de las levaduras que están presentes en números bajos, con cada reinoculación aplicada a la yuca fresca la población de estas se "diluye" hasta que desaparecen.

Finalmente, las cuentas poblacionales hechas en fermentaciones naturales, son comparables con los datos presentados por Ogunsua *et al.* (1983), aunque aquí se observa un ligero aumento en la población de levaduras que coincide con un aumento ligero en el pH.

Trabajo a Futuro.

Actualmente se tiene algunos aspectos del proceso tradicional estudiados a profundidad y resueltos por otros autores como es, el efecto de la fermentación y de la garificación sobre la detoxificación del producto y la

contribución de microorganismos como *Leuconostoc mesenteroides* en el proceso de detoxificación. Igualmente, se tiene ya la mecanización del proceso tradicional que utiliza la adición de licor de fermentación como inóculo, dando un producto más higiénico.

Aunque para este trabajo se desarrollaron algunos aspectos básicos de la fermentación, como la reproducción y el estudio del proceso de acidificación, la activada amilolítica y la microbiología de la fermentación, existen otros aspectos sobre los que se ha profundizado poco.

Entre estos se tiene la producción de compuestos volátiles provenientes de la acidificación del sustrato, que contribuyen a las características organolépticas finales de olor y sabor del producto, que se obtiene del proceso de fermentación y del de garificación.

Igualmente, es importante el estudio de la interacción de los microorganismos durante la fermentación, ya que las bacterias lácticas y las levaduras están presentes a lo largo de ésta y no se tiene información de la actividad de ambos grupos sobre este sustrato, así como de la actividad de hongos reportados para esta fermentación como *Geotrichum candidum*.

Siendo que se trata de un alimento con un gran aporte de carbohidratos pero sin aporte de proteínas, se considera importante el perfil nutricional que pueden impartir los microorganismos involucrados durante la fermentación y la calidad nutricional que puede conservar este producto después de un tratamiento térmico como es la garificación. Igualmente es importante la modificación del producto y por lo tanto de la fermentación, por la adición de otras fuentes de proteína como harinas de cereales o leguminosas que puedan enriquecer el alimento.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Arinkele, A.I. Fermentation of cassava. J. Sci. Food Agric. 15:589-594, 1984.
- Bailey, J. y Ollis, D. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. 2a. ed. Ed. Mac Graw & Hill, USA.
- Banigo, E.O.I. A paper on the fermented food industry in Nigeria. Proceedings of the Symposium on the Importance of Lactic Acid Fermentations in the Food Industry. ONUDI-UAMI, Mexico, 1984.
- Baseler, M.E. y Fields, M.L. Use of *Candida tropicalis* ATCC 9968 to adjust the pH of a natural lactic acid fermentation of cornmeal. J. Food Sci. 49: 1198-1199, 1984.
- Battisti, C.R. de; Batista, C.M; Coelho, D.T.; Teles, F.F. y Silveira, A.J. da. Determinacao de carbohidratos soluveis redutores e nao redutores em cultivares de mandioca (*Manihot scolenta* Crantz). Revista Ceres, 28 157: 312-317, 1981.
- Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. Editores. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. Williams & Wilkins. 8a. ed. Baltimore, Md. USA.
- Cereda, M.P. y Almeida Lima U. de. Aspects of the fermentation of cassava starch III. Determination of organic acids. Turrialba 35 (1):19-24, 1985.
- Collard, S. y Levi, N. A two stage fermentation of cassava. Nature (London), 183:620-621, 1959.
- Draper, N.R y Smith, H. 1981. Applied Regression Analysis. 2a. ed. Ed. Wiley & Sons, USA.
- Deiana, P.; Fatichenti, F. y Farres, G.A. Use of lactic acid by strains of *Debaryomyces hansenii* under conditions of aerobic and anaerobic growth at different temperatures. Ind. de Latte, 20:33-41, 1984.
- Dougan, J.; Robinson, J.M.; Sumar, S.; Howard, G.E. y Coursey, D.G. Some flavouring constituents of cassava and processed cassava products. J. Sci. Food Agric. 34:874-884, 1983.
- Etejere, E.O. y Ramakrishna, B.B. Traditional preparations and uses of cassava in Nigeria. Ec. Botan. 39(2):157-164, 1985.
- Ezeala, D.O.; Data, E.S. y Tanaka, Y. Changes in the nutritional quality of fermented cassava tuber meal. J. Agr. and Food Chem. 32(3):467-469, 1984.
- Grazia, L. y Suzzi, G. A survey of lactic acid bacteria in italian silage. J. Appl. Bact. 56:373-379, 1984.
- "Handbook of Chromatography". CRC Press, USA, 1987.
- Harrigan, W.F. y Mc Cance, E.M. Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos. Ed. Academia, España, 1979.
- IMSL Library, Houston, Texas, 1986.

Koch, L. "Growth Measurement" Cap. 11 en Manual of Methods of General Bacteriology. 1981. Editado por Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Costilow, E.N.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. y Phillips, G.B. American Society for Microbiology, Washington, USA.

Krieg, R.N. "Enrichment and Isolation" Cap. 8 en Manual of Methods of General Bacteriology. 1981. Editado por Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Costilow, E.N.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. y Phillips, G.B. American Society for Microbiology, Washington, USA.

Lancaster, P.A.; Ingram, J.S.; Lim, M.Y. y Coursey, D.G. Traditional cassava based foods: survey of processing techniques. Ec. Botan. 36(1):12-45, 1982.

Lindgren, S. y Refai, O. Amyolytic lactic acid bacteria in fish silage. J. Applied Bact. 57:221-228, 1984.

Mc Donald, L.C.; Mc Feeters, R.F.; Daeschel, M.A. y Fleming, H.P. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microb. 6 (53):1382-1384, 1987.

Mc Faddin Jean F. 1980. Biochemical Tests for the Identification of Medical Bacteria. Ed. Williams & Wilkins, 2a. ed. Baltimore, Md. USA.

Microbiology of Fermented Foods. 1985. Vol. 1 y 2 en Cap. 2 y 6. Ed. Brian J.B. Wood. Elsevier Applied Science Publishers, Ltd. USA.

Miyamoto, T.; Gichuru, S.; Akimoto, T. y Nakae, T. Identification and properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented beverages in East Africa. Japanese J. of Zootechnical Sci. 57:265-276, 1986.

Mgbugua, S.K. Microbiological and biochemical aspects of uji (an East African sour cereal porridge) fermentation and its enhancement through application of lactic acid bacteria. Dissertation Abstracts International. B 42 (B) 3178: Order 8129659, 156 pp., 1982.

Nakamura, L.K. *Lactobacillus amylovorus* a new starch hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentation. Int. J. Syst. Bact. 31:56-63, 1981.

Nakamura, L.K. y Crowell, C.D. *Lactobacillus amylophilus* a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentation. Dev. Ind. Mic. 20:531-540, 1981.

Ngaba, P.R. y Lee, S.J. Fermentation of cassava. J. Food Sci. 44:1570-1571, 1979.

Ohochuku, N. y Ballantine, J.A. Fermented cassava odor active components. J. Agric. Food Chem. 31:1386-1387, 1983.

Okafor, N.; Ijioma, B. y Oyolu, C. Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. J. Applied Bact. 56:1-13, 1984.

Okafor, N. y Uziegbu, J.O. Studies on the contribution of microorganisms to the organoleptic properties of "gari", a fermented food derived from cassava (*Hanihot sculentia*, Crantz). J. Food and Agric. 1(2):99-105, 1987.

Ogunsua, O.; Okafor, N.; Onyekwere, O. y Arinkele, A.L. "Nigerian-Gari" en Handbook of Indigenous Fermented Foods. 1983. Editado por Keith H. Steinkraus. Ed. Marcel Dekker, USA.

Olukayode, O.A. y Olusola, A.O. Extracellular amylase production by cassava fermenting bacteria. J. Ind. Microb. 2: 123-127, 1987.

Padjama, G.; Balagopal, C. y Potty, V.P. Cellulolytic, amylolytic and pectinolytic enzymes activities of deteriorating cassava roots. J. of Root Crops 8(1/2):35-40, 1982.

Schettino, B.; Olmos, A.; Gutiérrez, M. y Roussos, S. 1988. Manual de Métodos Químicos y Microbiológicos para la Fermentación Sólida de la Yuca. 1a. ed. Ed. Trillas, México.

Segel, I. 1986. Biochemical Calculations. 2a. ed. Ed. John Wiley and Sons, USA.

Sharpe, M. E. "Identification of Lactic Acid Bacteria" en Identification Methods for Microbiologists. Editado por F.A. Skinner y D.W. Lovelock. Ed. Academic Press, 2a. ed. (The Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 14), 1977.

Sharpe, E. "The genus *Lactobacillus*" Cap. 131 en The Prokaryotes by Starr, M.P. et al. Spring Verlag, Berlin. p. 1653-1679, 1981.

Simbert, M.R. y Krieg, R.N. "General Characterization" Cap. 20 en Manual of Methods of General Bacteriology. 1981. Editado por Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Costilow, E.N.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. y Phillips, G.B. American Society for Microbiology. Washington, USA.

Sribir, S. y Chakrabarty, S.L. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastes. J. Ferm. Tech. 62:407-413, 1984.

Stahl, E. 1969. Thin Layer Chromatography, 2a. ed. Springer Verlag, USA.

Uritani, I.; Data, E.S. y Tanaka, Y. Biochemistry of post-harvest deterioration of cassava and sweet potato root. In "Bio-resources investigation on production, storage, processing and vegetation of root crops in the tropics, 1981", p. 32-47, 1982.

Whitaker, J. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Ed. Marcel Dekker. N.Y. USA.

ANEXOS

MATERIALES Y METODOLOGIA

Anexo I) METODOLOGIA DE LA FERMENTACION.

A) Preparación del Sustrato

Se utilizó yuca fresca comprada en la Central de Abastos de la Ciudad de México, proveniente de los Estados de Morelos, Tabasco y Veracruz, sobre la cual no se tuvo control de la variedad y sólo se buscó que la yuca fuera de cáscara rosa-café y que el interior o la parte carnosa de la raíz fuera blanca, suave y sin fibras, por lo que se escogían los camotes pequeños que no tuvieran fibras o las partes apicales de los camotes más grandes.

La yuca se lavó frotándola con cepillo para eliminar las partículas de lodo y la piel café que la recubre; posteriormente se eliminó la piel exterior color rosacéa y los camotes se picaron para molerlos en un molino casero, hasta obtener una consistencia de pasta, el tamaño de partícula era normalmente de 1 a 2 mm. Esta pasta de yuca se introdujo en bolsas de plástico y se le dio forma de placa o palanqueta y se congeló, este procedimiento se seguía cada vez que se adquiría un lote de yuca para conservarla durante el tiempo en que se llevara a cabo la experimentación.

B) Inóculos

Se utilizaron varios inóculos para promover la fermentación, entre ellos, inóculos de tipo tradicional como:

B.1) masa fermentada proveniente de una fermentación natural de yuca de 72 horas, que se obtiene dejando fermentar yuca fresca sin inocular en el sistema de fermentación descrito en I.C,

B.2) licor de fermentación proveniente de una fermentación natural de yuca de 72 horas, que es el líquido que escurre de manera natural durante la acidificación y se colecta para utilizarlo como inóculo,

B.3) pozol proveniente del Estado de Chiapas refrigerado,

B.4) yakult, un producto láctico comercial y cuyo microorganismo activo es *Lactobacillus casei*,

cepas lácticas de colección como:

B.5) *Lactobacillus cellobiosus* (NRRL-B-184) reportado como amilolítico por Sribir y Chakrabarty (1984), y

B.6) *Lactobacillus plantarum* (APC Eurozym) utilizado para ensilado de productos vegetales y altamente acidificante,

y glucosa en niveles de 1, 2 y 3% en peso.

Todos los inóculos al momento de utilizarse, tuvieron un pH de 4.0 ± 0.15 y un % de acidez total titulable expresada como ácido láctico de 0.7 a 1.0, y los niveles de inoculación fueron de 5, 10 y 20% en peso, mismos que se adicionaron a la yuca fresca. Las cepas de colección se mantuvieron en agar MRS en caja o en tubo de cultivo y de aquí se inocularon en caldo MRS cultivándolas a 37° C hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.6 a 640 nm y se aplicaron pesando el caldo necesario para el nivel de inóculo deseado. La composición del medio de cultivo se describe en II.A.

Todos los inóculos y aditivos se aplicaron pesando la cantidad necesaria de estos para alcanzar el nivel de inóculo deseado, mezclándolo perfectamente con la yuca fresca molida antes de someterla a fermentación.

C) Sistema de Fermentación.

Las fermentaciones se llevaban a cabo a 30° C, en columnas de vidrio de 20 cm de longitud por 1.5 cm de diámetro, tapadas en la parte superior. En la parte inferior se colocó un tubo de ensaye para coleccionar el licor que escurre durante la fermentación, como se describe en el diagrama 1.

Las columnas se llenaron con 30 g de yuca fresca, o en su caso, de yuca mezclada con el inóculo correspondiente al nivel de inoculación deseado, empacando la masa para evitar burbujas de aire en el interior.

La evolución de la acidificación de la yuca se siguió durante 72 horas, muestreando cada 24 horas, o en el caso de las cinéticas puntuales, en intervalos de 2 a 4 horas, tomando como muestra para análisis el contenido total de la columna y mezclándolo con su licor, utilizando 5 g para cada determinación.

D) Análisis de la Fermentación.

La preparación de muestras y las determinaciones, se tomaron del manual

de Schettino *et al.* (1988) para la fermentación sólida de la yuca. Los parámetros analizados fueron: pH medido con un potenciómetro y porcentaje de acidez total titulable (% ATT) expresado como ácido láctico, titulando en agitación una mezcla de 5 g de muestra a la que se le adicionaban 45 ml de agua destilada, con una solución de NaOH 0.1 N hasta neutralizar la muestra, determinando el punto de neutralidad con potenciómetro. El porcentaje de acidez se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ATT} = \frac{N \cdot V \cdot 0.090}{\text{PMF}} \cdot 100$$

donde N = normalidad de NaOH

V = volumen de NaOH adicionado

PMF = peso de muestra fresca

0.090 = miliequivalentes de ácido láctico

Se midió también la concentración de carbohidratos solubles totales con fenol y ácido sulfúrico y los azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico diluyendo la yuca en proporción 1:1 con amortiguador de citratos 0.1 M a pH 6.0, centrifugando a 2,500 rpm durante 15 minutos y tomando el sobrenadante como la muestra para las determinaciones.

La acidez producida, está determinada como la diferencia entre la acidez inicial natural de la yuca, o la que adquiere con la adición de inóculo, menos la acidez encontrada por titulación a cualquier tiempo de la fermentación.

E) Estudio de las Fermentaciones Sucesivas

Para llevar a cabo el estudio del comportamiento de la fermentación con inoculaciones sucesivas, se utilizó yuca fresca iniciando el proceso con una fermentación natural cuya duración era de 72 horas. De esta primera fermentación se obtuvo el inóculo para la fermentación siguiente, ya fuera yuca fermentada o licor de fermentación y se utilizó el que tuviera el pH y el contenido de acidez característicos del gari, aplicados a un nivel de inóculo de 5% en peso. Las determinaciones hechas a las muestras obtenidas fueron pH y % de ATT. Este procedimiento se repitió, reinoculando con yuca o con licor de una fermentación anterior hasta en 15 ocasiones sucesivas.

A) Aislamiento de Cepas

Se tomó el contenido total de las columnas, diluyendo la masa fermentada en agua destilada estéril en proporción 1:1. Posteriormente se hicieron diluciones en agua estéril, desde 1:10 a 1:100,000 y se sembró 1 ml de cada dilución por quintuplicado en cajas con agar MRS y acetato de sodio a pH 7.0, coloreado con púrpura de bromocresol como indicador de acidificación. También se inocularon cajas con APD acidificado a pH 4.5 con ácido acético glacial para detección y aislamiento de hongos y levaduras.

La composición de este medio de cultivo es la siguiente (Sharpe, 1981 y Harrigan y Mc Cance, 1979):

Peptona de caseína	10.0 g/l
Extracto de levadura	5.0
Extracto de carne	10.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato diamónico	2.0
Glucosa	15.0
K ₂ HPO ₄	3.0
KH ₂ PO ₄	3.0
NaCl	2.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.58
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.28
Agar	15.0
Tween 80	1 ml
Púrpura de Bromocresol	0.018

Acido Acético Glacial para acidificar el medio a pH 5.5.

Las cajas inoculadas se incubaron a 37° C por 72 horas y posteriormente se dividieron en 16 sectores radiales para facilitar la selección al azar de colonias. Para esta selección se utilizaron las cajas con dilución 1:10 y 1:100, que fueron las que presentaron crecimiento con colonias espacialmente separadas entre sí, que se encontraban dentro de los sectores que dividían las cajas y que a simple vista y por observación microscópica, presentaron algunas características morfológicas propias de las bacterias lácticas.

A las colonias seleccionadas se les hizo tinción de Gram y la prueba de catalasa y se resembraron por estria en un medio sólido con una composición similar al utilizado anteriormente pero acidificado a pH 5.5 con ácido acético glacial y sin indicador y se incubaron en las mismas condiciones.

Cuando se tuvo crecimiento en las cajas resembradas, se examinaron las colonias que crecieron, anotando las características morfológicas como arreglo de colonias, forma y color, forma de los bordes, elevación, aspecto, textura

y consistencia y se hizo tinción de Gram para la descripción morfológica de las estructuras celulares observadas al microscopio.

B) Purificación de Cepas

La purificación se llevó a cabo sembrando por estría en placas de agar MRS, haciendo tinción de Gram, prueba de la catalasa y checando la acidificación en caldo MRS en 24 horas por el vire del colorante y crecimiento de la masa celular. Las colonias se seleccionaron en base a la respuesta a estas pruebas.

Los pases a placas de agar se hicieron sembrando con estría diferencial, de tal forma que en la última estría las colonias crecieran espacialmente separadas, para utilizarlas en subcultivos posteriores o para identificación. En el crecimiento en placa se observó también la morfología de las colonias por las características visibles. Las cepas se consideraron puras cuando las colonias que se tenían, lucían muy similares entre sí considerando la morfología y también considerando la similitud de las estructuras observadas al microscopio, como recomiendan Simbert y Krieg (1981).

C) Agrupación de las Cepas en Géneros

Con el fin de agrupar a las cepas aisladas y ya purificadas en géneros, se hicieron algunas pruebas bioquímicas según las indicaciones de Mac Faddin (1980) también descritas en Gerhardt, ed. (1981) y Harrigan y Mc Cance (1979).

C.1) Prueba de la catalasa

Se utilizó agua oxigenada comercial y se probaron las cepas adicionando una gota de agua oxigenada a una muestra de una colonia aislada tomada con asada y distribuida en un portaobjeto (Harrigan y Mc Cance, 1979 y Mac Faddin, 1980). la prueba resulta negativa cuando no hay formación de burbujas apreciable a simple vista.

C.2) Prueba de Fermentación de Carbohidratos

Esta prueba se utilizó solamente para detectar la producción de gas a partir de glucosa (Mac Faddin, 1980). Esta prueba se hace utilizando un medio basal al que se le añadió púrpura de bromocresol, ya que las bacterias

láticas son capaces de acidificar a pH menor de 4.0. La composición del medio es la siguiente:

peptona	10.0 g/l
extracto de carne	1.0
NaCl	5.0
púrpura de bromocresol	0.018

con una concentración de glucosa de 1%.

Se consideró positiva la prueba cuando se observaba gas en el inserto de Durham, después de 24 horas de incubación a 35° C.

Se hizo también una variación de esta prueba señalada por Krieg (1981) utilizando el mismo medio basal con 15 g/l de agar. En este caso, la inoculación se hizo adicionando 0.1 ml de caldo MRS de 24 horas de la cepa en cuestión a un tubo de ensaye y posteriormente se adicionaba el medio estéril a una temperatura de 40° C.

Los tubos se dejaron solidificar en posición vertical y se les adicionó 1 ml de agar puro estéril en la parte superior a manera de tapón. La incubación se llevó a cabo a 35° C y se checó el vire del color del medio de púrpura a amarillo que se presenta en caso de acidificación, el rompimiento del agar y la expulsión del tapón por producción de gas y el crecimiento a lo largo del tubo.

Se utilizó también el medio recomendado por Mc Donald *et al.* (1987) para distinguir cepas homo y heterofermentativas, basado en la utilización de la fructosa para la producción de ácido detectado por el vire del colorante verde de bromocresol, sin resultados claros, que no confirmaban la prueba de producción de gas.

C.3) Prueba de Leche Tornasolada

Es un medio diferencial para checar las siguientes funciones del metabolismo microbiano sobre las proteínas y carbohidratos de la leche, como la fermentación de la lactosa, reducción del colorante, formación de coágulo por acidificación o peptonización y producción de gas. Se utilizó Leche Tornasolada de Difco preparándola como indica el producto. Se adicionó 0.1 ml de inóculo de caldo MRS de 24 horas a tubos de ensaye que contenían porciones de 5 ml del medio. Se incubaron a 35° C durante 24 horas y se checó el vire del colorante, la formación de coágulo y la producción de gas (Mac Faddin,

(1980).

Para conservar las cepas que dieron una respuesta positiva a la prueba anterior se utilizó el medio YGLM, recomendado por Harrigan y Mc Cance (1979) y Sharpe (1981) y adicionado de carbonato de calcio cuando se desea conservar cepas en refrigeración de 3 a 6 meses:

leche en polvo descremada	10.0 %
tornasol	0.01
extracto de levadura	0.2
glucosa	1.0
extracto de carne	0.25
carbonato de calcio	5.0

Se esteriliza a 121° C y 15 lb de presión durante 15 min y se inocula con 1% de caldo MRS de 24 horas. Se incuba a 37° C durante 24 horas y en caso de dar una prueba positiva se tiene la reducción del colorante de azul-púrpura a rosa pálido y la formación de coágulo con liberación de suero, que puede disolverse neutralizando el medio, si la formación de este es debida a acidificación solamente. La formación del coágulo por peptonización es irreversible.

C.4) Prueba de Hidrólisis de Almidón

Se utilizó agar MRS sustituyendo la glucosa por almidón. Se inoculó sembrando 1 ml de caldo MRS de 24 horas en masa o distribuyéndolo por la superficie de la placa y se incubó a 37° C durante 72 horas. Se checó el crecimiento y la formación de halos de hidrólisis del almidón con vapores de yodo (Mac Faddin, 1980) que al contacto con el almidón toman una coloración azul mientras los halos de hidrólisis permanecen incoloros.

Se utilizó también un medio mineral líquido, indicado por Sribir y Chakrabarty (1986) y por Olukayode y Olusola (1987) para bacterias lácticas con capacidad amilolítica, cuya composición es la siguiente:

almidón soluble	10.0 g/l
KCl	0.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5
K ₂ HPO ₄	1.0
NaNO ₃	3.0
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01
CaCl ₂	0.1

A este medio se le adicionó púrpura de bromocresol como indicador de

acidificación por utilización del almidón como fuente de carbono, y se inculó con 1% de caldo MRS de 24 horas y se incubó a 37° C durante 72 horas.

C.5) Prueba de Producción de Amoniaco a partir de Arginina

Se utilizó caldo arginina recomendado para estreptococos (Mac Faddin, 1980 y Harrigan y Mc Cance, 1979):

peptona	5.0 g/l
extracto de levadura	2.5
dextrosa	0.5
K ₂ HPO ₄	2.0
L-Arginina	3.0

Se esterilizó a 121° C y 15 lb de presión durante 15 minutos, se distribuye en tubos de ensaye en porciones de 5 ml. Se inculca con 0.1 ml de caldo MRS de 24 horas y se incubaba a 35° C durante 48 horas. Las lecturas se hacen comparando los tubos inculados contra un tubo testigo sin arginina, añadiendo el reactivo de Nessler que es una solución de yoduro de potasio, considerando la prueba positiva cuando se tiene vire de amarillo a anaranjado, con turbidez ligera.

C.6) Otras pruebas...

Se utilizó un medio líquido de yuca diseñado para comprobar la actividad acidificante sobre este sustrato de las cepas aisladas. La composición es:

yuca fresca	10.0 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.03
púrpura de bromocresol	0.02

Se esterilizó a 121° C y 15 lb de presión durante 15 minutos y se inculó con 1% de caldo MRS de 24 horas. Se incubó a 37° C en agitación durante 72 horas y se checó el vire del colorante.

D) Conservación de las Cepas

Las cepas que no dieron una respuesta positiva a la prueba de leche tornasolada se conservaron en medio MRS sólido por pases. La cepa de interés

se sembró en medio líquido en tubos de ensayo con porciones de 5 ml y se incubó durante 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se hizo tinción de Gram para controlar la pureza y se midió el pH después de 24 horas. Posteriormente se sembró en medio sólido con asada y por estria y se incubó por 72 horas a 37°C y ya crecida se observó la morfología de colonia y se hizo tinción de Gram. Las cepas así manejadas pueden conservarse de 6 a 8 semanas en refrigeración.

E) Cuentas Totales

Para realizar las cuentas totales durante la fermentación natural de 10 días de la yuca, se utilizó la metodología de II.A, pero se inoculó en medios selectivos para el aislamiento específico de diferentes microorganismos:

- E.1) para bacterias lácticas se utilizó agar MRS acidificado a pH 5.5 con ácido acético glacial, cuya composición se indica en II.A,
- E.2) y para hongos y levaduras se utilizó agar PDA acidificado a pH 4.5 de Bloxon preparado según las indicaciones del producto.

Anexo III) ACTIVIDAD AMILOLITICA

A) Preparación del Extracto Crudo

La preparación del extracto crudo se hizo utilizando yuca fresca y masa fermentada. La yuca fresca se utilizó para las determinaciones de rangos de pH y temperatura óptimos y para la determinación de los parámetros cinéticos por medio de la modificación de Hanes-Woolf al modelo de Michaelis-Menten. La masa fermentada se utilizó mezclada con su respectivo licor de fermentación, para las determinaciones de actividad amilolitica durante el proceso fermentativo, tanto en fermentaciones naturales como en fermentaciones inoculadas con los diferentes inóculos mencionados en I.B.

El procedimiento consistió en procesar muestras de 5 g a las que se les adicionó amortiguador de citratos frío 0.1 M a pH 6.0 en proporción 1:1, homogenizando la mezcla con agitadores magnéticos y posteriormente manteniéndola en refrigeración durante 20 minutos, con el fin de que la enzima presente se solubilizara en el amortiguador y el almidón, las fibras y otras partículas, se asentaran para posteriormente centrifugar la muestra a 2.500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se consideró como el

extracto crudo enzimático y se utilizó para las determinaciones de actividad.

B) Determinación de la actividad amilolítica

A 0.9 ml de la solución de almidón de 10 mg/ml se le adicionó 0.1 ml de sobrenadante de la centrifugación o extracto crudo enzimático, incubando la mezcla durante 20 minutos a 30° C en un baño de temperatura controlada. Al inicio y al finalizar este tiempo se adicionaba 1 ml de ácido dinitrosalicílico siguiendo el método señalado por Schettino, et al. (1988) para la determinación de los azúcares reductores liberados por la enzima. La actividad amilolítica queda expresada como:

$$\text{Actividad} = \frac{(\text{Rt} - \text{Rto})}{\text{ml extracto} \cdot \text{tiempo de incubación}} \cdot \text{Dilución}$$

Rt = reductores transcurrido el tiempo de fermentación

Rto = reductores al inicio de la reacción

Dilución = la proporción extracto:amortiguador es 1:1

La actividad se definió como la cantidad de extracto crudo enzimático que libera 1 micromol de glucosa por minuto bajo las condiciones descritas anteriormente.

C) Temperatura y pH Óptimos y Parámetros Cinéticos

Para la determinación de los rangos óptimos de pH y temperatura se utilizaron soluciones amortiguadoras 0.1 M de citratos para pH entre 3.0 y 6.0, para pH 7.0 se utilizó amortiguador de citrato-fosfato y para pH 8.0 y 9.0 se utilizó amortiguador tris. Las temperaturas variaron desde 20° a 70°C y todos estos experimentos se llevaron a cabo en baños de temperatura controlada.

Para la determinación de los parámetros cinéticos se utilizaron soluciones de almidón que variaron desde 1 a 50 mg/ml de almidón, midiendo la actividad amilolítica según la metodología descrita en III.B.

D) Identificación de los Productos de Hidrólisis

La identificación de los productos de hidrólisis se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (Handbook of Chromatography, 1987, CRC Press y

Stahl, 1969). Se utilizaron placas flexibles de Silicagel "G" de Baker, dejándolas reposar en estufa a 90° C durante 20 minutos, a fin de que se secaran. Se hizo la cromatografía al licor que escurre aproximadamente a las 6 horas de fermentación, aplicándolo sin diluir y sin defecar, corriendo al mismo tiempo patrones de glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y maltosa, aplicando 10 microlitros con una concentración de 50 microgramos. Se utilizó como solvente el sistema n-butanol/acetona/agua en proporción 4:5:1 en el cual los patrones corren en aproximadamente 1 hora y veinte minutos y el revelador fue antrona.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

E) Identificación del Origen de la Actividad Amilolítica

E.1) Adición de Antibióticos y Determinación de la Actividad Amilolítica

Se llevaron a cabo experimentos con masa fermentada proveniente de fermentaciones naturales e inoculadas con 5% de masa fermentada a las cuales se les añadieron antibióticos para inhibir el crecimiento microbiano tales como penicilina G con procaína y penprocilina en dosis de 200 U/g de yuca. Para las determinaciones de actividad se siguió el procedimiento descrito en III. B.

E.2) Control de la Microbiología de la Fermentación

Se llevó a cabo un control del efecto de la adición de antibióticos sobre la fermentación haciendo siembras directamente del licor escurrido y sembrando por estria en los medios señalados en el Anexo II.E e incubando a 37° C durante 72. Se checó solamente el crecimiento de microorganismos sin contar las colonias presentes.