

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL
ALMIDÓN AGRO PARA EL MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN**

**LINA MARÍA RINCÓN SUÁREZ
FABIO AUGUSTO VILLAMIL NOVOA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
BUCARAMANGA
2005**

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL
ALMIDÓN AGRO PARA EL MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN**

**LINA MARÍA RINCÓN SUÁREZ
FABIO AUGUSTO VILLAMIL NOVOA**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de químicos

**DIRECTOR DEL PROYECTO DE GRADO
Dra. MARIELA CARREÑO DE ARANGO**

**CODIRECTOR DEL PROYECTO
M.Sc. DANIEL RICARDO MOLINA V.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
BUCARAMANGA
2005**

*AGRADEZCO A DIOS POR PERMITIRME
ALCANZAR ESTA META*

*A MIS PADRES POR CREER EN MI,
APOYARME Y DARME LA OPORTUNIDAD DE
ESTAR AQUÍ*

*A MIS HERMANOS POR SU PACIENCIA,
COMPRENSIÓN Y APORTES*

*A TODOS LOS QUE ME BRINDARON SU
AYUDA EN TODO MOMENTO*

LINA

DEDICO ESTE Y TODOS MIS TRIUNFOS:

*A DIOS, POR SER MI LUZ , MI GUIA Y MI
SOPORTE.*

*A MIS PADRES, POR SU GRAN APOYO Y POR
SER MI INSPIRACIÓN PARA SALIR
ADELANTE.*

*A MI ABUELITA, MI ESTRELLA EN EL CIELO,
POR BRINDARME TODO SU AMOR.*

*A MI HIJA, MI GRAN AMOR, POR SER EL
MOTOR DE MI VIDA.*

*A MIS HERMENOS, POR SER MIS COMPLICES Y
LOS MEJORES AMIGOS.*

*A MI NOVIA, POR SER MI APOYO Y
COMPLEMENTO.*

FABIO

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestros agradecimientos a Dios y a nuestros padres por creer en nosotros y brindarnos la oportunidad para formarnos como profesionales.

A la doctora Mariela Carreño de Arango y al doctor Daniel Ricardo Molina Velasco por su paciencia, dedicación, empeño y grandes aportes para la realización de este proyecto.

Al laboratorio de Bioquímica, al Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), al laboratorio de Suelos, al laboratorio de Alimentos (CICTA), al laboratorio de instrumentación química de la Universidad Industrial de Santander y al Fondo Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (PRONATTA).

A la doctora Aidé Perea, el doctor Rodrigo Torres y al ingeniero Benjamín Mancera por su colaboración y aportes en el desarrollo de la investigación.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	20
1. LA YUCA	20
2. ALMIDÓN	20
2.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN.....	21
2.1.1 Amilosa	21
2.1.2 Amilopectina.....	22
2.2 PROPIEDADES FUNCIONALES DEL ALMIDÓN	23
3. ALMIDÓN DE YUCA	24
4. ALMIDÓN AGRIO DE YUCA	24
4.1 OBTENCIÓN DEL ALMIDÓN AGRIO	24
4.2 FERMENTACIÓN	26
4. 2. 1 Historia de la fermentación.....	26
4. 2. 2 Fermentación láctica	27
4. 2. 3 Proceso de fermentación láctica.....	28
4. 2. 4 Variables que influyen en la fermentación	29
4. 2. 5 Fermentación del almidón de yuca.....	29
4. 2. 6 Secado del almidón de yuca fermentado.....	29
4. 3 LAS BACTERIAS LÁCTICAS.....	30
4.3.1 Pared celular de las bacterias	30
4.3.2 Bacterias Gram Positivas	31
4.3.3 Bacterias Gram negativas	31
4. 4 MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE CULTIVOS PUROS.....	32
II. METODOLOGÍA	33
1. OBTENCIÓN DE ALMIDÓN AGRIO A PARTIR DE LOS TUBERCULOS DE YUCA .	33
1.1 FERMENTACIÓN	33
1.2 SECADO	33
1.3 MOLIENDA.....	33
2. AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS LÁCTICO AMIOLITICOS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN “NATURAL” DEL ALMIDÓN DE YUCA	33
2.1 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.....	33
3. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMO PARA MEJORAR LA CALIDAD Y RENDIMIENTO DEL PROCESO DE LA FERMENTACIÓN NATURAL	34

3.1 PREPARACIÓN Y USO DEL INÓCULO.....	34
3.2 CURVA DE CRECIMIENTO DEL <i>POOL</i> EN MEDIO MRS.....	34
4. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TEMPERATURA, pH, Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO ADECUADAS PARA LA REDUCCION DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA.....	34
4.1 MEDICIÓN DEL pH.....	34
4.2 TEMPERATURA.....	35
4.3 DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	35
5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN.....	35
6. DETERMINACION DE LAS MEJORES CONDICIONES DE FERMENTACIÓN.....	36
7. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL ALMIDÓN AGRIO OBTENIDO POR FERMENTACIÓN NATURAL DEL ALMIDÓN DE YUCA.....	36
7.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.....	36
7.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS.....	36
7.3 DETERMINACIÓN DEL MATERIAL SOLUBLE.....	36
7.4 DETERMINACIÓN DE GRASAS.....	36
7.5 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS.....	36
7.6 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD.....	36
8. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ALMIDÓN AGRIO.....	36
III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
1. OBTENCIÓN DE ALMIDÓN AGRIO A PARTIR DEL LOS TUBERCULOS DE YUCA.....	37
2. AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS LÁCTICO AMIOLITICOS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN “NATURAL” DEL ALMIDÓN DE YUCA.....	37
2.1 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.....	37
2.2 ELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO.....	38
3. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PARA MEJORAR LA CALIDAD Y RENDIMIENTO DEL PROCESO DE LA FERMENTACIÓN NATURAL.....	38
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	38
3.2 ANÁLISIS DE AZÚCARES.....	39
3.3 CURVA DE CRECIMIENTO DEL <i>POOL</i> DE MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS EN MEDIO MRS.....	40
4. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE TEMPERATURA, pH, Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO ADECUADAS PARA LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA.....	41
4.1 MEDICIÓN DEL pH.....	41
4.2 TEMPERATURA.....	42

4.3 DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	42
5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN	45
6. DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE FERMENTACIÓN	48
7. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALMIDÓN AGRIO OBTENIDO POR FERMENTACIÓN NATURAL DEL ALMIDÓN DE YUCA.....	53
7.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD, CENIZAS, MATERIAL SOLUBLE, GRASAS, NITRÓGENO Y PROTEÍNAS	53
7.2 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD.....	54
8. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ALMIDÓN AGRIO.	55
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS.....	62

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETECCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	35
TABLA 2	PRUEBAS DE AZUCARES PARA MICROORGANISMOS LÁCTICO / AMILOLÍTICOS.....	39
TABLA 3	DATOS CURVA DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS LÁCTICO / AMILOLÍTICOS IDENTIFICADOS.....	41
TABLA 4	CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO OBTENIDAS A LO LARGO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA MUESTRAS SIN Y CON INÓCULO.....	45
TABLA 5	DISEÑO EXPERIMENTAL MULTINIVEL PARA EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	46
TABLA 6	ANÁLISIS DE REGRESIÓN MÚLTIPLE PARA EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	48
TABLA 7	MATRIZ DEL DISEÑO DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA Y RESULTADOS.....	49
TABLA 8	VALIDACIÓN DEL MODELO DESCRITO POR LA ECUACIÓN 2.....	53
TABLA 9	CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ALMIDÓN FERMENTADO.....	54
TABLA 10	PODER DE PANIFICACIÓN (PP) DE ALMIDONES CON DIFERENTES DÍAS DE FERMENTACIÓN CON Y SIN INÓCULO.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 AMILOSA.....	22
FIGURA 2 AMILOPECTINA.....	22
FIGURA 3 DIAGRAMA DEL PROCESO GENERAL DE OBTENCIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA (NATIVO Y AGRIO).....	25
FIGURA 4 RUTA DE FERMENTACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	27
FIGURA 5 SECCIONES TRANSVERSALES ESQUEMÁTICAS DE LAS CUBIERTAS CELULARES DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.....	31
FIGURA 6 FOTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA.....	37
FIGURA 7 FOTO SIEMBRA DE MICROORGANISMOS LÁCTICOS / AMIOLITICOS EN MEDIO M.R.S.....	38
FIGURA 8 FOTO DE LA PREPARACIÓN MICROSCÓPICA COLOREADA CON GRAM.....	38
FIGURA 9 FOTO PRUEBAS DE AZUCARES PARA MICROORGANISMOS LÁCTICO /AMIOLITICOS.....	39

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1 CURVA DE CRECIMIENTO MICROORGANISMOS LÁCTICO / AMILOLITICOS IDENTIFICADOS.....	40
GRÁFICA 2 VARIACIÓN DEL pH DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA MUESTRAS CON Y SIN INÓCULO.....	42
GRÁFICA 3 CROMATÓGRAMA MUESTRA DE ALMIDÓN AGRIO DE 15 DÍAS DE FERMENTACIÓN SIN INÓCULO.....	43
GRÁFICA 4 CROMATÓGRAMA DE MUESTRA DE ALMIDÓN AGRIO DE 15 DÍAS DE FERMENTACIÓN CON 20% V/V DE INÓCULO.....	43
GRÁFICA 5 VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	44
GRÁFICA 6 VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO DURANTE LA FERMENTACIÓN CON Y SIN INÓCULO.....	44
GRÁFICA 7 DIAGRAMA DE PARETO PARA LAS VARIABLES DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	47
GRÁFICA 8 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO CALCULADO vs CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO OBSERVADO.....	48
GRÁFICA 9 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO CALCULADO vs CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO EXPERIMENTAL.....	51
GRÁFICA 10 SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	52
GRÁFICA 11 CONTORNO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PAR EL PROCESO DE FERMENTACIÓN.....	52
GRÁFICA 12 VARIACIÓN DE LA VISCOSIDAD DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA MUESTRAS DE ALMIDÓN FERMENTADO CON INÓCULO Y SIN INÓCULO.....	54

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A PREPARACIÓN DEL MEDIO.....	61
ANEXO B CURVA ESTÁNDAR PARA CALIBRACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO.....	62
ANEXO C CURVA PATRÓN CONCENTRACIÓN BACTERIANA.....	63
ANEXO D CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	64

RESUMEN

TÍTULO*:

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DEL ALMIDÓN DE YUCA FERMENTADO (ALMIDÓN AGRIO) PARA EL MEJORAMIENTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN.

Rincón Suárez Lina María, Villamil Novoa Fabio Augusto, Carreño de Arango Mariela** y Molina Velasco Daniel Ricardo**.

Palabras claves, almidón agrio, fermentación láctica, ácido láctico, lactobacilos, inóculo, diseño experimental, superficie de respuesta.

El almidón modificado constituye una de las opciones tecnológicas más atractivas para el sector industrial dada su funcionalidad, gran consumo y precio en el mercado. El Departamento de Santander tiene el potencial suficiente para explotar este recurso ya que cuenta con grandes extensiones de tierra cultivadas con yuca de la cual se puede extraer el almidón.

En este proyecto se realizó un estudio de la fermentación del almidón de yuca a nivel de laboratorio donde se caracterizaron los microorganismos presentes en la fermentación y se determinaron las condiciones de temperatura, pH y concentración de ácido láctico para reducir el tiempo de fermentación, además de un análisis físicoquímico y la determinación de la calidad del almidón agrio obtenido, evaluando su poder de panificación.

Se lograron identificar cinco microorganismos con características ácido lácticas responsables de la fermentación del almidón de yuca. En el proceso de fermentación se determinaron las variables que influyeron en la producción de ácido láctico, utilizando un diseño experimental multinivel cuyas variables fueron el tiempo de fermentación, temperatura y porcentaje de inóculo. Se determinó que el tiempo de fermentación y el porcentaje de inóculo, bajo las condiciones de trabajo escogidas son las que ejercen mayor influencia en la concentración de ácido láctico en el proceso de fermentación. Con el propósito de encontrar las mejores condiciones, se realizó una superficie de respuesta donde se observó que la mayor concentración de ácido láctico para el proceso de fermentación se daba a un intervalo de tiempo de 18 a 27 días y en un intervalo de concentración de inóculo de 11% a 20% (v/v). Se logró determinar que al adicionar 20% de inóculo al proceso de fermentación, el tiempo de fermentación tuvo una disminución de 13 días.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Directora: Mariela Carreño de Arango, M.Sc en Microbiología

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Codirector: Daniel R. Molina V, M.Sc en Química

SUMMARY

TITLE *:

OBTAINING, PHYSICAL CHEMISTRY AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE STARCH OF CASSAVA FERMENTED (BITTER STARCH) FOR THE IMPROVEMENT OF THE FERMENTATION PROCESS

Rincón Suárez Lina Maria, Villamil Novoa Fabio Augusto, Carreño de Arango Mariela** y Molina Velasco Daniel Ricardo*.

Key words, bitter starch, lactic fermentation, lactic acid, lactobacilos, inoculate, experimental design, surface of answer.

The modified starch constitute one of the technological and attractive options for the industrial sector given its functionality, great consumption and price in the market. The departamento de Santander has the conditions to operate this resource since it counts on great cultivated earth extensions with yucca of which it can extracts the starch.

In this project it was studied the fermentation of yucca starch at laboratory level where it was made the characterization of the microorganisms present in the fermentation process, and it was determined the conditions of temperature, lactic acid concentration and pH to reduce the time of fermentation. moreover, it was carried out a physical chemistry analysis and a quality determination of the bitter starch obtained, evaluating its panification power.

Five microorganisms were identified, with acid lactic characteristics causing the fermentation of the yucca starch. In the fermentation process it were determined the variables that influenced the lactic acid production, using an mutilevel experimental design whose variables were the time of fermentation, temperature and percentage of inoculate. it was determined that the time of fermentation, and the percentage of inoculate, under the conditions of work are those that exert a greater influence in the lactic acid concentration in the fermentation process. in order to finding the best conditions, a surface of response was realized where was observed that the greater concentration of lactic acid for the process of fermentation was obtained to an interval of time from 18 to 27 days and in an interval of percentage of inoculate from 11 % to 20 %. It was success to determine that when adding 20% of inoculate to the fermentation process, the time of fermentation had a diminution of 13 days.

*Project of degree

** Science Faculty, School of Biology, Director: Mariela Carreño de Arango, M.Sc in Microbiology

** Science Faculty, School of Chemistry, Codirector: Daniel R. Molina Velasco, M.Sc in Chemistry

INTRODUCCIÓN

La biotecnología es un área que ha ganado terreno en el desarrollo industrial y ha causado gran repercusión en la medicina, la agricultura, el suministro energético y la producción de alimentos entre otras. Gracias a esta se ha logrado avanzar en el ahorro de energía, eliminación de residuos contaminantes, disminución de precios y sustitución de productos y aditivos en la alimentación humana y animal.

La fermentación es una de las biotecnologías aplicadas más antiguas, que se ha utilizado para conservar alimentos desde hace más de seis mil años¹. Es una técnica adsequible, económica y muy adecuada donde otros métodos son inaplicables o no existen, como las conservas y la congelación. La fermentación es un proceso que requiere mano de obra, infraestructura mínima y poca energía, además se integra bien en la vida de las zonas rurales de muchos países en desarrollo, ya que contribuye significativamente a la seguridad alimenticia al aumentar la variedad de materias primas que se pueden utilizar para producir alimentos. La producción de alimentos fermentados también es importante para sumar valor a las materias primas agrícolas y así proporcionar ingresos y crear empleos².

El proceso tradicional de fermentación para obtener el almidón agrio de yuca suele ser una actividad espontánea, sin asepsia (desinfección), producto de la acción conjunta de una variedad de microorganismos. En un biorreactor, las variedades mejor adaptadas y con el máximo coeficiente de crecimiento, predominan en condiciones controladas. En consecuencia, optimizar el control de los métodos y de la flora microbiana asociada a la fermentación representa uno de los principales retos para mejorar las tecnologías de fermentación de los alimentos. También es importante crear sistemas de control de calidad adecuados, por ejemplo utilizando materias primas de buena calidad, normas de higiene apropiadas en el sitio de elaboración y un envase adecuado.³

El almidón de yuca fermentado (almidón agrio) es utilizado en la industria de alimentos especialmente para la elaboración de productos panificables como el pandebono y pandeyuca. Su obtención ha sido el resultado de una labor artesanal realizada por familias enteras en las áreas rurales, principalmente, y con equipos manuales rústicos de fabricación casera. Este almidón se ha utilizado como ingrediente en la preparación de diversos alimentos, especialmente los de origen regional o típicos.^{2,4,5}

En el Departamento de Santander se producen varios productos agrícolas, entre ellos la yuca de la cual pueden obtenerse productos con mayor valor agregado como el almidón agrio. Por esto, es necesario incrementar las investigaciones relacionadas con este tubérculo y determinar que productos podrán llegar a ser importantes en la industria y con ello contribuir al desarrollo agrario de la región ya que este cultivo se adapta a las condiciones geográficas de nuestro departamento y es eficiente en la producción de almidón.^{5,6}

El almidón agrio de yuca es un producto modificado que puede obtenerse mediante tratamiento enzimático por la acción de microorganismos durante el proceso de fermentación y que tienen un mayor valor económico que el almidón nativo.⁷

En este proyecto se realizó un estudio de la fermentación del almidón de yuca a nivel de laboratorio donde se caracterizaron los microorganismos presentes en la fermentación, se determinaron las condiciones de temperatura, pH y concentración de ácido láctico para reducir el tiempo de fermentación, además de un análisis fisicoquímico y la determinación de la calidad del almidón agrio obtenido, evaluando su poder de panificación.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LA YUCA

La yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) es una de las plantas amiláceas de mayor importancia para los países del trópico por su alto contenido de almidón en sus raíces.

Actualmente hay más de 5000 variedades de yuca y cada una tiene características peculiares. Sus flores (masculina y femenina) son pequeñas y la polinización cruzada es frecuente. El fruto es dehiscente y las semillas pequeñas y ovaladas. Los tallos maduros se cortan en estacas de 7 a 30 cm de longitud, con las cuales se propaga la planta.^{3,6}

La raíz de la yuca es de forma cónica y tiene una corteza externa y otra interna (de color blanco y rosado). Tiene una composición del 30% al 40% de materia seca, constituida en un 90% al 95% de almidón y azúcares, el resto corresponde a fibra (1% a 2%), grasa (0.5% a 2.5%) y proteína (2%).

La yuca tolera la sequía sin reducir su producción porque posee tres características particulares: los estomas se cierran cuando el aire está seco; las raíces extraen agua del suelo profundo (hasta 2,5 m) y su sistema fotosintético aún fija carbono disponiendo de poca agua⁴.

2. ALMIDÓN

El almidón es el carbohidrato más importante en la actividad humana por su función alimenticia y por sus múltiples aplicaciones en la industria y el comercio. A diferencia de los almidones cereales, que requieren procesos industriales muy tecnificados, los almidones de raíces y tubérculos como la papa, batata y la yuca entre otros, son más fáciles de obtener en el medio rural, ya que solo requieren de molienda, tamizado, separación con agua, sedimentación y secado⁶

Constituye la forma más generalizada, aunque no la única, de reserva energética en vegetales. El almidón se almacena en forma de gránulos y tiene el tamaño y forma característicos de la planta de la cual se obtiene, puede llegar a constituir hasta el 70% del peso de granos (maíz y trigo) o de tubérculos (patata y yuca). Cuando están intactos, los gránulos son insolubles en agua fría; si se rompe su membrana externa al ser molidos, éstos se hinchan en agua fría y forman un gel. Cuando se tratan enteros con agua tibia, esta se difunde a través de sus membranas y extrae una parte del almidón. En agua caliente se hinchan a tal extremo que revientan.⁷

2.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL ALMIDÓN

El análisis minucioso de la estructura del almidón demuestra que es una mezcla de dos polisacáridos: la amilosa y la amilopectina. La proporción de ambos polisacáridos varía según la procedencia del almidón, pero por lo general, la amilopectina es la más abundante. El almidón contiene generalmente alrededor del 20% de una fracción soluble en agua, de amilosa, y el 80% de una insoluble, amilopectina. Ambas fracciones corresponden a dos carbohidratos diferentes, de peso molecular elevado y fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$. La α -amilosa adopta una conformación helicoidal. Los gránulos de almidón constan de regiones cristalinas y amorfas.⁷ Las moléculas vecinas de amilosa y de amilopectina se unen por medio de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos, para formar las fracciones cristalinas orientadas radialmente, conocidas con el nombre de micelas.

Por tratamiento con ácido o por la acción de enzimas, los componentes del almidón se hidrolizan lentamente, dando sucesivamente dextrina (una mezcla de polisacáridos de bajo peso molecular), (+)-maltosa y finalmente, D-(+)-glucosa. Tanto amilosa, como amilopectina, están constituidas por unidades de D-(+)-glucosa, pero difieren en tamaño y forma molecular.

El almidón puede ser degradado por muchas enzimas. En los mamíferos, estas enzimas se llaman amilasas y se producen sobre todo en las glándulas salivares y en el páncreas.⁹

2.1.1 Amilosa

Constituida por cadenas largas no ramificadas en las que todas las unidades de la D-glucosa, se hayan unidas mediante enlaces alfa(1-4), no es soluble en agua pero forma micelas hidratadas que dan un color azul con el yodo. Cada molécula contiene unos 3000 residuos (MM ~ 500 kD). (Figura 2).

El análisis por rayos X indica que su cadena se halla enrollada en forma de espiral (como una escalera de caracol), en cuyo interior hay espacio suficiente para acomodar una molécula de yodo. El color azul se debe a las moléculas de yodo atrapadas.⁷

Por hidrólisis, la amilosa da (+)-maltosa como único disacárido y D-(+)-glucosa como único monosacárido. Se ha justificado este resultado proponiéndose que la amilosa está compuesta por cadenas de muchas unidades D-(+)-glucosa, cada una de ellas unida mediante un enlace glucosídico alfa entre el C-1 de la primera y el C-4 de la siguiente.⁷

¿Cuántas de estas unidades α -D-(+)-glucosa hay por molécula de amilosa y cuáles son las formas de estas grandes moléculas? Estas son preguntas difíciles de contestar, por lo que en los intentos por encontrarles respuesta se ha recurrido a métodos físicos, como análisis por rayos X, microscopía electrónica, mediciones de presión osmótica, viscosidad y comportamiento en una ultracentrífuga.

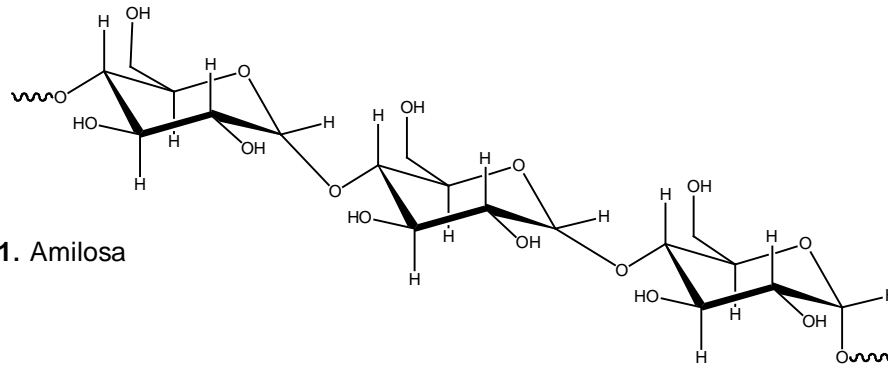


Figura 1. Amilosa

Se ha obtenido información valiosa en cuanto al tamaño molecular y forma por combinación de la metilación e hidrólisis, tan efectiva en el estudio de las estructuras de disacáridos. Los métodos físicos, sin embargo, sugieren que las cadenas son aún más largas: los pesos moleculares abarcan desde 150 000 hasta 600 000, lo que indica 1000 a 4000 unidades de glucosa por molécula.

En resumen, se cree que la amilosa está constituida por largas cadenas, cada una de las cuales contiene 1000 o más unidades de D(+)-glucosa ligadas entre sí por enlaces α , como en la (+)-maltosa. La cadena se ramifica muy poco o nada.^{9,10}

2.1.2 Amilopectina

La Amilopectina tiene una estructura muy ramificada formada por varios centenares de cadenas cortas de unas 20 a 25 unidades de D-glucosa cada una. Un extremo de cada una de estas cadenas se une con un C-1 al C-6 de la cadena siguiente. (Figura 2)

La hidrólisis de la amilopectina da (+)-maltosa como único disacárido; la metilación e hidrólisis da principalmente 2,3,6-tri-O-metil-D-glucosa. La amilopectina está constituida, al igual que la amilosa, por cadenas de unidades de D-glucosa, cada una de ellas unida al C-4 de la siguiente por un enlace glicosídico alfa. Sin embargo, su estructura es más compleja que la de la amilosa. Los pesos moleculares determinados por métodos físicos indican que hay hasta un millón de unidades de D-glucosa por molécula.¹⁰

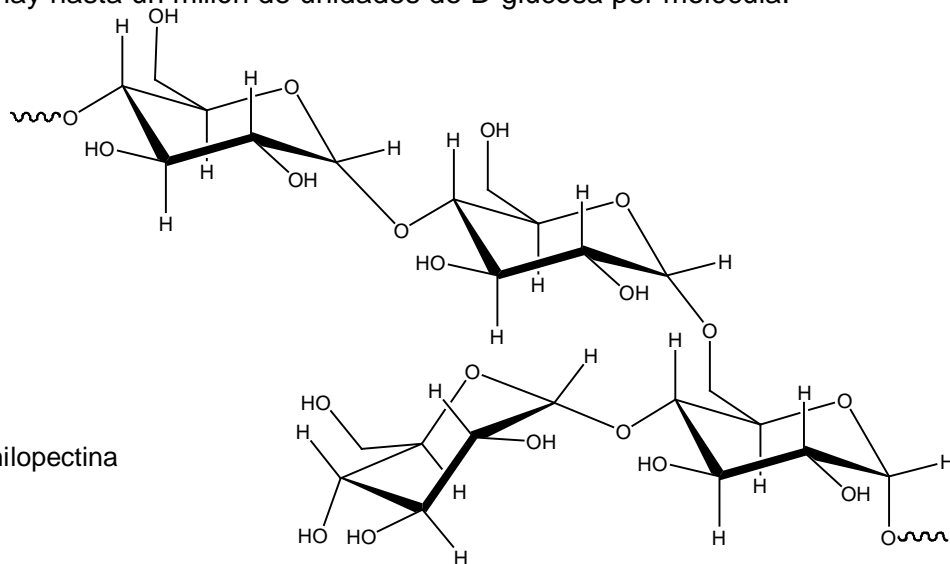


Figura 2. Amilopectina

2.2 PROPIEDADES FUNCIONALES DEL ALMIDÓN

El almidón es un polvo blanco, amorfo, plástico, cuya densidad es 1,6 g/mL y a veces se caracteriza por un brillo peculiar. Es insoluble en agua, alcohol y éter. Al microscopio presenta características definidas, pudiéndose identificar fácilmente. Químicamente, es un hidrato del carbono (oxígeno, nitrógeno y carbono). Su procedencia se distingue por el tamaño y la forma de los granos.

En virtud de su forma podemos dividir los almidones en 5 clases:

- Almidón de gránulos en forma de óvalos grandes formando anillos concéntricos y con núcleo (hilum) colocado excéntricamente. Ejemplo: la papa.
- Almidón de gránulos ovoides usualmente formando anillos concéntricos, con núcleo irregular. Ejemplo: las leguminosas.
- Almidón de gránulos ovoides con núcleo central. Ejemplo: el trigo.
- Almidón de gránulos trancos en uno de los extremos. Grupo del sagú. Ejemplo: la yuca.
- Almidón cuyos gránulos forman ángulos pequeños y poligonales. Ejemplo: el arroz.

Las propiedades funcionales de una suspensión de almidón permiten la formación de pastas relativamente compactas con un grado de cristalinidad variable, es decir una regularidad de la estructura espacial. El calentamiento o la acción de algunos reactivos en presencia de agua pueden romper o modificar los puentes de hidrogeno y a la vez producir cambios en las propiedades reológicas de la pasta como aumento en la solubilidad y disminución de la cristalinidad. Las uniones establecidas entre cadenas del almidón determinan en parte las propiedades funcionales tales como: la solubilidad y viscosidad de pastas obtenidas después de un tratamiento hidrotérmico de una dispersión de almidón.^{3,11,}

Existen temperaturas críticas variables con la estructura del almidón por encima de la cual la dispersión es irreversible y por debajo es reversible, esta temperatura se sitúa entre 65 °C y 80 °C en exceso de agua y depende del tipo de almidón. En la medida que se incrementa la temperatura el granulo del almidón se dispersa; la amilosa y la amilopectina pasan a un estado coloidal. Luego en el enfriamiento se presenta la gelificación, la retrogradación y por ultimo una cristalización particular de los residuos macromoleculares.^{6,9}

La gelificación es una propiedad del almidón que ocurre después que la gelatinización sea total y se alcance su máxima viscosidad; pues durante la fase de enfriamiento la amilasa y la amilopectina se reorganizan, para que el sistema gelifique formándose una red clásica lo cual se caracteriza por encerrar volúmenes de agua.^{12,13}

La retrogradación se presenta a temperaturas inferiores a los 60 °C, bien sea durante o después del enfriamiento, pues los enlaces de hidrógeno intermoleculares al ser más numerosos, hacen que el gel pase a un estado menos hidratado, lo que ocasiona que este pierda su capacidad de retención de agua; este se presenta con mayor facilidad en almidones con alto contenido de amilosa, debido a la ausencia de ramificación y en las

cadenas de esta fracción lo que permite reorganizarse fácilmente y a la vez se presentan pastas viscosas con mayor resistencia a la formación del gel y mayor solubilidad en agua.⁵

Los principales factores que afectan el comportamiento reológico de los almidones está relacionado con la fracción de amilosa y amilopectina, los pesos moleculares de sus fracciones y la longitud de las cadenas. La amilopectina favorece la gelificación en el enfriamiento, al contrario la amilosa da lí quidos pastosos que no gelifican. La retrogradación ocurre más rápido cuando la relación de amilosa es más elevada.⁷

La viscosidad máxima, la solubilidad (viscosidad intrínseca) o dispersión del almidón disminuyen a medida que aumenta el tiempo de la fermentación y secado al sol.

La fermentación disminuye ligeramente el contenido de nitrógeno. Las proteí nas por consiguiente, influyen directamente en las propiedades de viscoelasticidad del almidón agrio.⁴

3. ALMIDÓN DE YUCA

El almidón de yuca está llamado a ser el sustituto del maí z y una alternativa en la producción de pegamentos para la industria papelera, la textil y la alimenticia. Bajo condiciones controladas, estas dextrinas pueden servir en la industria de alimentos para elaborar sopas, compotas, espesantes, salsas y tortas; de igual modo, el almidón de yuca constituye la base para un sinnúmero de productos de panificación, croquetas y pasabocas, además, la yuca tiene barreras que impiden la absorción excesiva de aceite, que permiten obtener productos bajos en grasa, que tienen mucha demanda actualmente.⁸

4. ALMIDÓN AGRIO DE YUCA

El almidón agrio de yuca es un producto obtenido por la fermentación natural del almidón de yuca. En Colombia, este almidón fermentado es ampliamente empleado en la elaboración de productos horneados como pandeyuca, pandebono, besitos y rosquillas.

4.1 OBTENCIÓN DEL ALMIDÓN AGRIO

El proceso inicia con la extracción del almidón. Éste consiste en lavar y despojar los tubérculos de yuca de su cáscara, luego rallar éstas con intensidad en abundante agua para la exposición de los granos de almidón y separarlos de las fibras y de los materiales solubles. El almidón sedimentado se coloca en tanques de fermentación, luego se le agrega un exceso de agua (aproximadamente unos 3 a 4 cm por encima de este) para mantener la anaerobiosis y se conserva de 20 a 30 dí as. El perí odo de fermentación varí a según la región y las condiciones climáticas. Después se realiza el secado mediante exposición solar hasta alcanzar una humedad entre el 12 y el 14% y luego se empaca y se procede a la comercialización.⁸ El inóculo necesario para la fermentación puede ser el agua utilizada en el proceso de fermentación anterior o una porción de almidón ya

fermentado. La fermentación del almidón de yuca se realiza en condiciones anaeróbicas y a una temperatura media de 21 °C.^{2,6}

Del proceso de extracción del almidón de yuca se obtiene también "afrecho" el cual es empleado en la industria de concentrados como fuente de energía y fibra. Otro subproducto es la "mancha" la cual es utilizada por familias campesinas en la alimentación de cerdos como fuente de energía. Por último se obtiene la cascarilla con la cual se producen abonos orgánicos.⁸ (Figura 3).

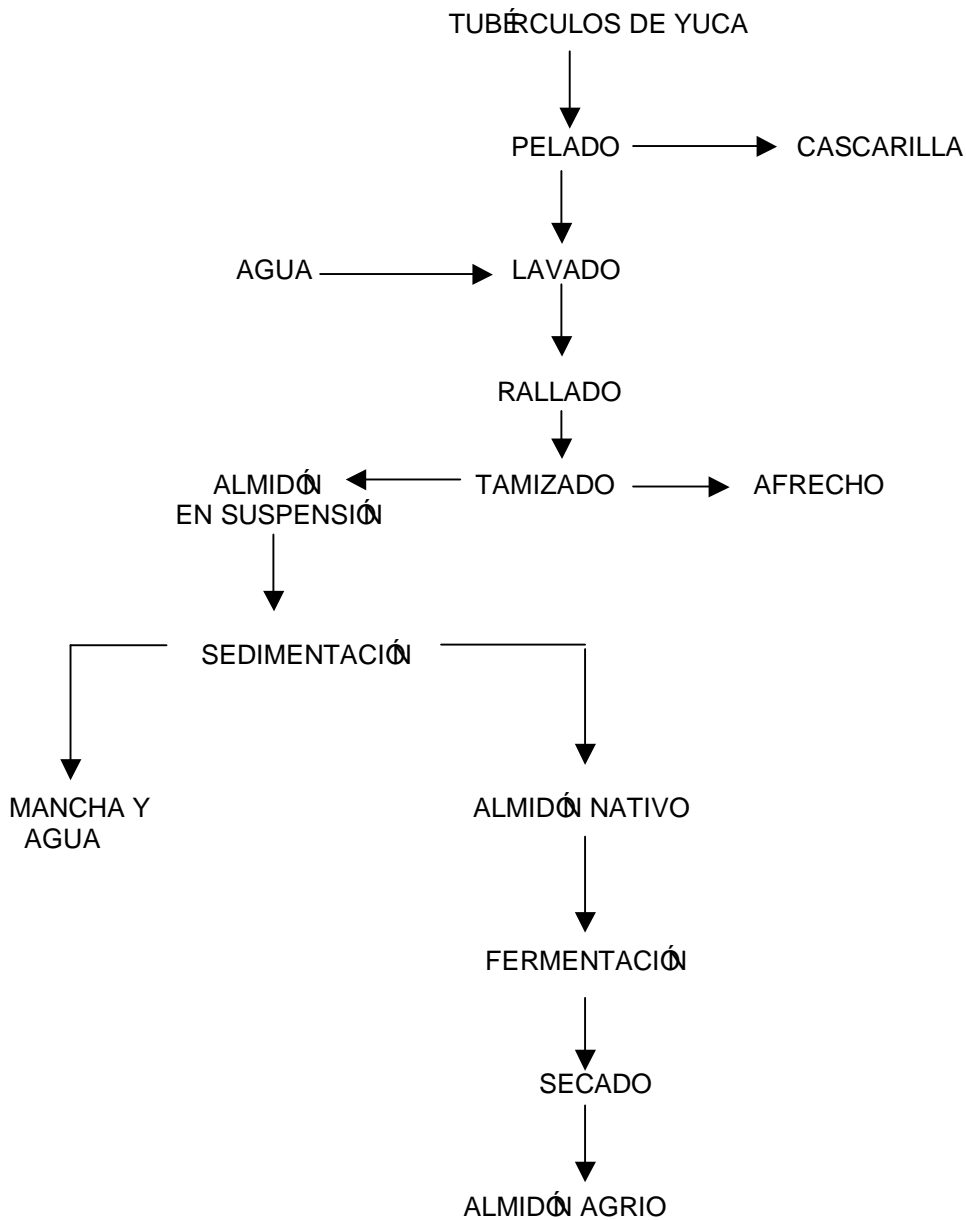


Figura 3. Diagrama del proceso general de obtención del almidón de yuca (nativo y agrio)

El almidón agrio tiene una composición del 96% w/w de carbohidratos en b.s (base seca), 3% w/w de proteínas en b.s y 12% w/w de humedad. Su principal característica es que es panificable, teniendo como función expandirse durante el horneado. Se emplea en la elaboración de productos de consumo típicos como pandebono, pandeyuca, rosquillas, "besitos", y otros.

4.2 FERMENTACIÓN

El término fermentación, en su acepción estricta, se refiere a la obtención de energía en ausencia de oxígeno y generalmente lleva agregado el nombre del producto final de la reacción.

Las fermentaciones son reacciones de mantenimiento que no requieren la participación de una cadena de transporte de electrones, aunque en algunos casos éstas desempeñan funciones secundarias. (ver figura 4). Como consecuencia de la no participación de un aceptor externo de electrones, el sustrato orgánico experimenta una serie de reacciones oxidativas y reductoras equilibradas; por ejemplo los piridinucleótidos reducidos en un paso del proceso son oxidados en otros.^{2,11}

Este principio general se ilustra en dos fermentaciones: la fermentación alcohólica (típica del metabolismo anaeróbico de las levaduras) y la fermentación ácido homoláctica (típica de algunas bacterias que producen ácido láctico). Ambos procesos fermentativos utilizan la ruta de Embden Meyerhof; las dos moléculas de NAD^+ reducidas por esta ruta se reoxidan en reacciones que implican un ulterior metabolismo del piruvato. En el caso de la fermentación ácido homoláctica, esta oxidación ocurre como consecuencia directa de la reducción del ácido pirúvico a ácido láctico. En el caso de la fermentación alcohólica, el ácido pirúvico se descarboxila primero para formar acetaldehído y la reoxidación del NADH ocurre en paralelo con la reducción del acetaldehído para formar etanol.⁹

4. 2. 1 Historia de la fermentación

El desarrollo histórico de la fermentación data de unos 8000 años atrás y es conocido de toda la historia de Noé, quien se "paloteaba" con el sumo de uvas. Desde tiempos inmemoriales, los microorganismos mejoraron y echaron a perder los alimentos y bebidas destinadas al consumo humano, mucho antes de que se reconociera su existencia. Andando el tiempo, y sin saber todavía a qué sucedió a nivel biológico, la gente aprendió a fermentar y explotar la acción fermentativa de los microorganismos en la fabricación de alimentos tales como el queso y la cerveza. Develada ya en lo esencial la actividad microbiana, los alimentos y bebidas fermentadas constituyen hoy en día, un sector muy extenso e importante de la industria alimenticia. Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, es de esperar que se produzcan grandes avances en la calidad y exactitud de la producción microbiológica de alimentos y bebidas.

4. 2. 2 Fermentación láctica

La fermentación ácido láctica es aquella que se lleva a cabo por las bacterias ácido lácticas cuya actividad se desarrolla en ausencia de oxígeno (anaerobiosis), y se manifiesta en la transformación de los azúcares presentes en vegetales en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono.

El ácido láctico es un compuesto incoloro, viscoso, no volátil, de masa molecular 90 g/mol y de fórmula $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$. Se da bajo formas ópticamente activas, dextrógiras y levógiras, frecuentemente denominadas ácido D – Láctico y ácido L – Láctico. En su estado natural es una mezcla ópticamente inactiva compuesta por partes iguales de ambas formas D y L, conocida como mezcla racémica.

Las bacterias ácido lácticas producen grandes cantidades de ácido láctico a partir del azúcar. El descenso de pH resultante hace que el medio en que han crecido sea inadecuado para la mayoría de los otros microorganismos. El desarrollo de las bacterias del ácido láctico es, por lo tanto, un medio para conservar alimentos, además, producen componentes del aroma.^{9,10}

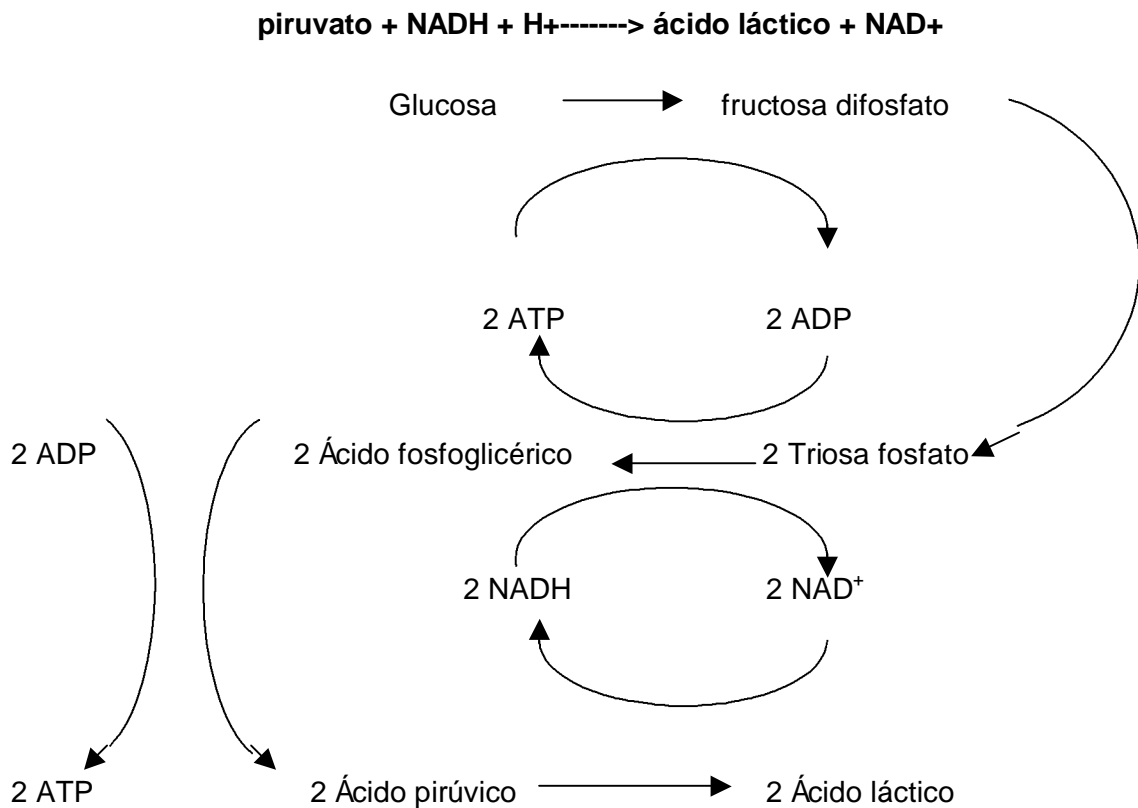


Figura 4. Ruta de fermentación del ácido láctico

4. 2. 3 Proceso de fermentación láctica

Iniciación de la Fermentación:

Durante la iniciación, las bacterias Grampositivas y Gramnegativas presentes en el almidón fresco, compiten por el predominio; enterobacterias, bacterias aerobias formadoras de esporas, bacterias ácido – lácticas y otras bacterias, están muy activas.

Este estadio incluye el crecimiento de unos pocos microorganismos facultativos y estratos anaeróbicos, originalmente presentes en el almidón fresco, pero seguidamente el establecimiento de las bacterias lácticas disminuye los valores de pH y son inhibidos los organismos indeseables como son las bacterias Gramnegativas y las formadoras de esporas, por lo tanto, las bacterias ácido lácticas se establecen rápidamente y los microorganismos indeseables son excluidos.^{6,7,11}

Eventualmente las bacterias ácido – lácticas ganan predominio por disminución del pH y ocurre la:

Ü Fermentación Primaria

Durante este estadio, las bacterias ácido – lácticas y las levaduras fermentativas, constituyen la microflora predominante y su crecimiento continua hasta agotarse los carbohidratos fermentables o hasta ser inhibidas por el pH formado por la propia bacteria láctica.

La capacidad amortiguadora y el contenido de carbohidratos fermentable del almidón, son factores importantes que determinan la magnitud de la fermentación de las bacterias ácido – lácticas y la magnitud de las consecuentes fermentación de las levaduras presentes.^{2,3}

Si después de la fermentación primaria quedan azúcares fermentables, estos azúcares pueden permitir una:

Ü Fermentación Secundaria

Dominada esencialmente por levaduras. Estos microorganismos son bastante tolerantes al ácido por lo que su actividad fermentativa continúa aún después de que las bacterias lácticas han sido inhibidas por los bajos valores de pH y pueden continuar hasta agotar los carbohidratos fermentables.^{2,3}

Ü Post – Fermentación

Este estadio comienza cuando los carbohidratos fermentados se han agotado. El crecimiento bacteriano se restringe a la superficie expuesta al aire libre, lo que permite el establecimiento de levaduras oxidativas, mohos y otros microorganismos deteriorativos en la superficie de tanques abiertos que no son expuesto a la radiación ultravioleta, o que han sido manejado con poco cuidado. En aquellos tanques que han sido cubiertos apropiadamente, no se observa el crecimiento de microorganismos responsables de daño, de allí la importancia de lograr y mantener condiciones anaerobias para el buen desarrollo del proceso y la obtención de un producto final de buena calidad.³

4. 2. 4 Variables que influyen en la fermentación

El proceso de fermentación láctica es afectado por algunas variables que influyen específicamente sobre el crecimiento y desarrollo de los microorganismos que de él hacen parte. Los principales factores son la temperatura, la concentración del sustrato, el pH y los nutrientes, además de la cantidad de oxígeno presente.⁷

4. 2. 5 Fermentación del almidón de yuca

La fermentación del almidón de yuca ocurre en tres fases: la primera es asociada a la rápida caída de la concentración del oxígeno en el medio. Probablemente en esta fase comienza el ataque de enzimas amilolíticas sobre el almidón granular, dando una fuente carbonada para el metabolismo de los agentes de la fermentación. En la segunda fase, se presentan microorganismos más exigentes, productores de ácidos y gases.^{2,3} Esta fase es la más importante en lo que se refiere a la producción del almidón agrio de buena calidad. En la tercera etapa, aparecen microorganismos saprófitos y contaminantes, que pueden ser los responsables del consumo de los ácidos orgánicos en la superficie de los tanques y de las características positivas del almidón agrio comercial (color blanco, granulometría final y poder de expansión).^{1,4}

Durante la fermentación del almidón, la flora láctica predomina y se mantiene constante hasta el final, las bacterias lácticas se multiplican únicamente en los primeros días de la fermentación (crecimiento logarítmico del microorganismo) y después quedan presentes en el medio sin división celular (fase estacionaria del microorganismo).⁵

El proceso fermentativo obviamente modifica los granos del almidón pues las bacterias amilolíticas erosionan o rompen el gránulo del almidón. Además del sabor y aroma, las modificaciones que ocurren durante la fermentación alteran sus características físicas, químicas y reológicas.¹ Durante la fermentación del almidón, el pH disminuye en la medida en que los ácidos orgánicos se liberan, en las fermentaciones realizadas en las distintas rallanderías del Cauca se encontraron muestras que contenían los ácidos acético, propiónico, butírico, fórmico, succínico, valérico y láctico.⁶

El ácido láctico es el principal producto de la fermentación, que determina la calidad del producto final panificado, de aquí la importancia del análisis cuantitativo de éste ácido para la caracterización de muestras de almidón agrio tanto como el seguimiento de la fermentación.³

4. 2. 6 Secado del almidón de yuca fermentado

Durante el secado solar, la concentración de ácido láctico presente, disminuye fuertemente de 0,9 a 0,6 g por 100 g de materia seca (disminución del 35%), mientras que en la estufa, la concentración queda estable durante el secado. La disminución de ácido láctico está relacionado con la aparición del poder de panificación. En panificación clásica el gluten del trigo forma una red tridimensional que permite la retención de las

burbujas de gas durante la cocción. En el almidón agrio de yuca, la única macromolécula predominante es el mismo almidón. La formación de la red tridimensional podría ser debida a una reacción fotoquímica que involucran el ácido láctico y el almidón fermentado. Esta red sería responsable de la aparición del poder de panificación (PP) del almidón agrio fermentado y secado al sol.^{2,16,17}

La principal prueba de calidad del almidón agrio es su poder de expansión o panificación, y es definido como la capacidad de aumentar el volumen de la masa cuando se introduce al horno.¹ Un almidón agrio de buena calidad debe ser de color blanco, de granulometría fina, de baja humedad y con un sabor ácido. Algunos productores definen el punto final del proceso fermentativo del almidón de yuca, evaluando la superficie de la masa en fermentación o la acidez en la boca del tanque, otros definen el punto final mediante pruebas de panificación en las que miden el poder de expansión de la masa de los bizcochos confeccionados.⁴

4. 3 LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Un grupo de bacterias Gram positivas con células en forma de bastón o esféricas, casi todas inmóviles, que comparten una constelación de propiedades fisiológicas tan distintivas que son tratadas como un grupo único. Las bacterias lácticas obtienen energía para el crecimiento exclusivamente por fermentación de hidratos de carbono, siendo el ácido láctico el producto final más importante en la fermentación. Son incapaces de sintetizar hemo (molécula que forma parte de citocromos, hemoglobina, catalasa, etc.), y por lo tanto no tienen ni citocromos ni catalasa; a pesar de esto pueden crecer en ambiente aerobio. Estas son las únicas bacterias aerobias que no tienen catalasa (enzima que destruye el peróxido de hidrógeno producido en procesos respiratorios); la carencia de proteínas con hemo es también característica de anaerobios absolutos, como los clostridios. Las bacterias lácticas típicamente requieren una extensa lista de aminoácidos y vitaminas como factores orgánicos de crecimiento. *Lactobacillus* (bastones); *Pediococcus* (células esféricas en tetradas); *Streptococcus*, *Leuconostoc* (células esféricas en cadenas).^{18,19}

4.3.1 Pared celular de las bacterias

Existen dos grandes tipos de bacterias: las Gram positivas (con una pared gruesa de peptidoglicanos) y las Gram negativas (con una pared fina). Cuando se les aplica la tinción de Gram, las primeras aparecen de color púrpura mientras que las otras bacterias son incoloras o rojizas.

Los envoltorios que rodean el citoplasma bacteriano están representados esquemáticamente en la figura 5. Como se puede ver en la figura 5, las membranas de las bacterias Gram negativas tienen una complejidad bastante mayor que las de Gram positivas.¹⁹

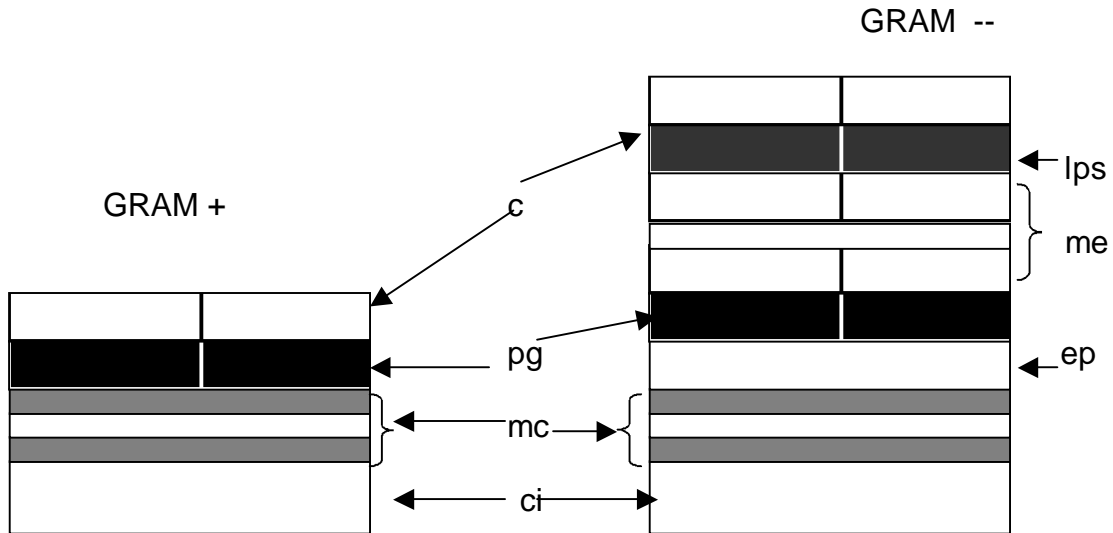


Figura 5. Secciones transversales esquemáticas de las cubiertas celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas. c, cápsula; pg, péptido-glicano o mureína; mc, membrana citoplásmica; ci, citoplasma; lps, lipopolisacárido; me, membrana externa o pared celular; ep, espacio periplásmico. La capa de péptido-glicano suele ser más espesa en las bacterias Gram positivas que en las Gram negativas

4.3.2 Bacterias Gram Positivas

Se pueden hacer unas pocas generalizaciones sobre las propiedades de este grupo. Si son móviles, las bacterias muestran flagelación peritrichal.²⁰

1. Formas unicelulares
 - a. bacterias esporuladas
 - b. bacterias lácticas
 - c. cocos Gram positivos
 - d. bacterias corineformes
2. Bacterias miceliales
 - a. El grupo Mycobacterium-Nocardia
 - b. El grupo Streptomyces-Micromonospora
 - c. El grupo Actinoplanes-Streptosporangium

4.3.3 Bacterias Gram negativas

Estas bacterias pertenecen a un grupo muy grande y variado, acerca del cual sólo pueden hacerse pocas generalizaciones. Nunca forman endoesporas ni micelio; pueden ser móviles por medio de flagelos o inmóviles. En este grupo están incluidas todas las bacterias verdaderas fotosintéticas y todas las quimiolitotróficas, o bacterias capaces de vivir con CO₂ como fuente única de carbono, mediante la energía producida por la oxidación de compuestos inorgánicos.^{19,20,21}

- a. Bacterias coliformes
- b. Bastones peritrichialmente flagelados que son aerobios estrictos
- c. Grupo Neisseria-Moraxella
- d. Grupo Veillonella. Cocos. Estrictamente anaerobios.
- e. Bacteriodes. Bastones. Estrictamente anaerobios.
- f. Los pseudomonas aerobios.
- g. Pseudomonas fermentativas.
- h. Los reductores de sulfatos.
- i. Bacterias vibrioides pequeñas.
- j. Los espirilos no fotosintéticos.
- k. El grupo Leptothrix-Sphaerotilus.
- l. Las bacterias pedunculadas.
- m. Grupo Hydrophobium.

4. 4 MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE CULTIVOS PUROS

Técnicas de siembra por agotamiento en superficie en los medios de cultivo específicos para los microorganismos presentes. Sobre la superficie de un medio sólido se deposita con un asa de inoculación una pequeña cantidad de la muestra bacteriana, y se distribuye extendiéndola por agotamiento sobre la superficie del medio.^{22,23}

II. METODOLOGÍA

1. OBTENCIÓN DE ALMIDÓN AGRIO A PARTIR DE LOS TUBERCULOS DE YUCA

La extracción del almidón de yuca se realizó de acuerdo a la metodología seguida por Cabanzo y Luna (Figura 3).¹⁴

En esta investigación se llevó a cabo una fermentación láctica natural del almidón nativo de yuca a escala de laboratorio, en recipientes de vidrio a temperatura de 25 °C y 37 °C, con y sin inóculo para observar el efecto sobre el proceso de fermentación. Cada proceso de fermentación se realizó por triplicado.

1.1 FERMENTACIÓN

El almidón sedimentado se recuperó y se colocaron 200 g de éste en los recipientes de vidrio en los que se llevó a cabo la fermentación, agregándoles una capa delgada de agua sobrenadante (250 mL) para mantener la humedad del almidón. La fermentación tuvo una duración de 30 días.

1.2 SECADO

El almidón fermentado se retiró de los recipientes, se extendió sobre plásticos (de color negro) y se dejó secar al aire libre por acción del sol. Esta operación requirió 8 horas.

1.3 MOLIENDA

El almidón fermentado y seco (almidón agrio) se molió para obtener un producto con mayor homogeneidad

2. AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS LÁCTICO AMILOLÍTICOS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN “NATURAL” DEL ALMIDÓN DE YUCA

2.1 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Durante el proceso de fermentación del almidón nativo se tomaron muestras con 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días de fermentación y se realizaron siembras en diferentes medios de cultivo de aislamiento primario, selectivos y diferenciales como: Tioglicolato, MacConkey (McK), Agar APT, MRS, Rogosa; medios para hongos: (YCG) y Agar extracto de malta (MEA).²³

Se utilizó el método de aislamiento de cultivos puros con siembras por agotamiento que consistió en extender sobre la superficie del medio sólido con un asa de inoculación una pequeña cantidad de la muestra bacteriana. Este proceso se llevó a cabo en cajas de petri y las siembras se mantuvieron a una temperatura de 26 °C para los medios YCG y

MEA y temperatura de 37°C para los medios Tioglicolato, MacConkey (McK), Agar APT, MRS y Rogosa.^{22,23,25}

3. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMO PARA MEJORAR LA CALIDAD Y RENDIMIENTO DEL PROCESO DE LA FERMENTACIÓN NATURAL

Para la caracterización de los microorganismos de interés obtenidos en los cultivos previos, se tuvo en cuenta sus características morfológicas y tintoriales tanto microscópicas como macroscópicas, además de las reacciones bioquímicas, (pruebas de azúcares) según el manual de Bergey's, que permitieron la selección de las bacterias láctico amilolíticas.^{18,25}

3.1 PREPARACIÓN Y USO DEL INÓCULO

Se preparó una suspensión de colonias (*pool*) de los microorganismos láctico amilolíticos aislados e identificados en las pruebas anteriores, utilizando el medio MRS caldo (sin agar) (Anexo A) modificando el solvente en un 20% con agua proveniente del lavado del almidón, este caldo de cultivo con una concentración bacteriana de 1.9×10^9 bacterias/mL fue utilizado para inocular las muestras de almidón nativo y de esta forma estudiar sus efectos sobre la fermentación.¹

La concentración bacteriana en el medio se obtuvo por el método turbidimétrico determinando su absorbancia en un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® NOVA 400 a una $\lambda = 550$ nm contra la curva patrón de la escala de Macfarland. (Anexo B).

3.2 CURVA DE CRECIMIENTO DEL POOL EN MEDIO MRS

Se realizó una curva de crecimiento del pool de microorganismos amilolíticos aislados previamente en el sustrato utilizado (almidón nativo de yuca), para determinar el tiempo transcurrido en la fase de crecimiento logarítmico y estacionaria (fases donde empieza la producción del ácido láctico).

4. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TEMPERATURA, pH, Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO ADECUADAS PARA LA REDUCCION DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA

4.1 MEDICIÓN DEL pH

Se realizó de acuerdo a la Norma AOAC 10.041/84, con un pHmetro HANNA HI 8314 previamente calibrado. Se llevó un control diario del pH a lo largo de la fermentación, con las diferentes condiciones de temperatura e inóculo.¹⁵

4.2 TEMPERATURA

La fermentación se realizó a 26 °C y 37 °C, haciendo un seguimiento periódico del pH y del crecimiento de los diferentes microorganismos en las muestras inoculadas y sin inocular.

4.3 DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), se empleó un cromatógrafo Varian Model 5000. Para este análisis, el almidón no fue sometido al proceso de secado al sol para prevenir posibles errores en la determinación de la concentración del ácido^{8,16}. En la tabla 1 se reportan las condiciones de análisis.

Se tomaron 10g de almidón en b.s, se adicionaron 15mL de ácido sulfúrico de molaridad 0.006mol/l, se agitó durante 1 minuto hasta obtener una suspensión homogénea. El almidón se trituró, seguidamente se centrifugó a 1100 r.p.m. durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se filtró con una membrana 0.45µm (millipore), del extracto filtrado se tomó una alícuota de 1mL para la determinación del ácido láctico.

Tabla 1 Parámetros cromatográficos para la detección de ácido láctico

Volumen de Inyección	25 µL
Fase móvil	Ácetonitrilo/agua (80/20, v/v)
Flujo	0.8ml/min
Temperatura	65°C
Columna	Columna de 254x4mm licrosorb RP-C18 (5µm)
Detector	UV
λ	210nm

Para cuantificar el ácido láctico por HPLC se preparó un patrón del ácido (30 mg/mL) a partir del cual se preparó por dilución una serie de soluciones de diferente concentración para la elaboración de la curva patrón del ácido. (Anexo D).

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN

Para determinar las variables que más influyeron en el proceso de fermentación se realizó un diseño experimental de multinivel con 2 replicas.²⁴

Se consideraron como variables la temperatura a la cual se llevó a cabo la fermentación (26 °C y 37 °C), la cantidad de inóculo adicionado (0% y 20% v/v) y el tiempo de fermentación (10,15,20,25 y 30 días).

La matriz de diseño y los resultados se reportan en la tabla 2

6. DETERMINACION DE LAS MEJORES CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para probar la importancia estadística de las variables, utilizando el programa STATGRAPHICS Plus 4.0.²⁴

7. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALMIDÓN AGRIO OBTENIDO POR FERMENTACIÓN NATURAL DEL ALMIDÓN DE YUCA¹⁵

Los análisis físicoquímicos (normas AOAC) se realizaron para comprobar que el almidón cumple con los requisitos de un alimento para consumo humano.¹⁵ Cada uno de los análisis realizados a las muestras de almidón se hizo por triplicado.

7.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Norma AOAC 7003/84,930.15/90 Adaptado (Bernal 1994,47)

7.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS

Norma AOAC 7.009/84,942.05/90 Adaptado (Bernal 1994,47-48)

7.3 DETERMINACIÓN DEL MATERIAL SOLUBLE

Norma STANDARD METHODS 2540 B/98

7.4 DETERMINACIÓN DE GRASAS

Método de extracción en equipo Soxhlet (AOAC 922.06/95)

7.5 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS

Norma AOAC 981.19/90

7.6 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

Análisis Brookfield según Food Chemicals Codex 4th Ed. 1996

8. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ALMIDÓN AGRIO.

Como principal criterio de calidad del almidón agrío se determinó su poder de panificación:^{6,7}

Se pesaron 10 gramos de almidón, 2.5 gramos de aceite vegetal, 0.4 gramos de sal y 5 ml de agua para preparar cada bizcocho. Se usó un molde que caracterizó la forma de los bizcochos en 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro. Los bizcochos fueron horneados a 200 ° C por 20 minutos y evaluados en cuanto a la expansión.

El diámetro final del bizcocho fue medido con una regla de calibración realizándose tres repeticiones para cada bizcocho.

III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. OBTENCIÓN DE ALMIDÓN AGRIO A PARTIR DEL LOS TUBERCULOS DE YUCA

El almidón agrio que se obtuvo mediante el proceso de fermentación natural realizado a escala de laboratorio presentó características físicoquímicas como humedad, cenizas, viscosidad, pH etc., similares a las del almidón agrio producido en las rallanderías. De esta forma se obtuvieron las muestras con las características apropiadas para el desarrollo de la investigación.



Figura 6. Foto del proceso de fermentación del almidón de yuca

2. AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS LÁCTICO AMIOLITICOS PRESENTES EN LA FERMENTACIÓN “NATURAL” DEL ALMIDÓN DE YUCA

2.1 AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

En la siguiente foto se aprecian las siembras por agotamiento de los microorganismos presentes en el proceso fermentación del almidón de yuca, cultivados en el medio selectivo y diferencial M.R.S.



Figura 7. Foto siembra de microorganismos lácticos /amilolíticos en medio M.R.S.

2. 2 ELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO

Con la siembra en los diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales para bacterias ácido / lácticas , se observó un mejor crecimiento de las colonias en el MRS (Anexo A) y por este motivo se escogió como el medio de cultivo para el aislamiento de los microorganismos de interés.

3. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PARA MEJORAR LA CALIDAD Y RENDIMIENTO DEL PROCESO DE LA FERMENTACIÓN NATURAL

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos aislados fueron bacilos Gram positivos (microorganismos en forma de bastón) cuyas características se muestran en la figura 8

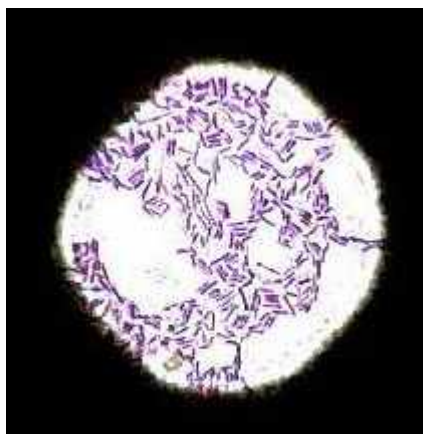


Figura 8 Foto de la preparación microscópica coloreada con Gram

3.2 ANÁLISIS DE AZÚCARES

En la figura 9 se observan los resultados obtenidos en algunas de las pruebas de azúcares realizadas a los diferentes microorganismos para su caracterización.



Figura 9. Foto pruebas de azúcares para microorganismos láctico /amilolíticos

Tabla 2. Pruebas de azúcares para microorganismos láctico / amilolíticos

MUESTRA AZUCAR	100 *	108*	109*	110*	111*
RIBOSA	+	+	+	+	+
LACTOSA	+	+	+	+	+
MALTOSA	+	+	+	+	+
ARABINOSA	+	+	+	+	+
MANITOL	+	+	+	-	+
FRUCTOSA	+	+	+	+	+
GLUCOSA	+	-	+	+	+
SORBITOL	-	+	+	+	+
XILOSA	+	+	+	+	+
SACAROSA	+	+	-	+	+

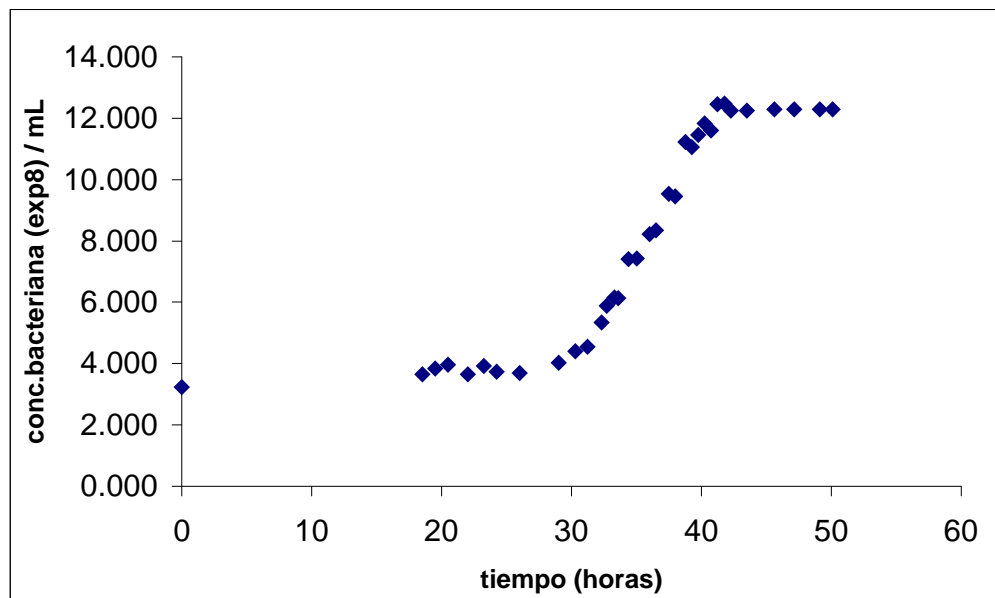
(*): Cultivos con características tintoriales y morfológicas de bacterias lácticas amilolíticas.

Con base en estos resultados se logró identificar los siguientes microorganismos con características láctico/amilolíticas, los cuales se utilizaron para conformar el *pool* que actuó en la fermentación:

Lactobacillus casei subsp *pseudopantarum*
Lactobacillus xylosus
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus fermentum
Lactobacillus coprophilus

3.3 CURVA DE CRECIMIENTO DEL *POOL* DE MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS EN MEDIO MRS

En la gráfica 1 se muestra la curva de crecimiento del *pool* de los microorganismos mencionados anteriormente en el medio MRS (caldo):



Gráfica 1. Curva de crecimiento microorganismos láctico / amilolíticos identificados.

En la gráfica 1 se observa que el tiempo de crecimiento logarítmico de los microorganismos con características ácido / lácticas (en el medio MRS caldo) es de 10 horas.

Tabla 3. Datos curva de crecimiento de microorganismos láctico/amilolíticos identificados en el proceso de fermentación del almidón.

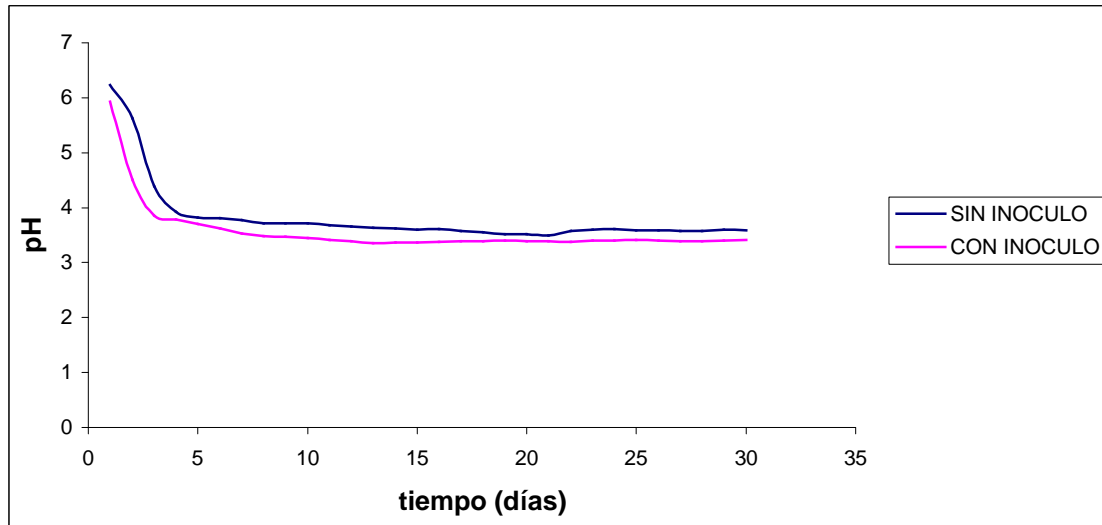
Absorbancia	Conc. bacteriana/mL (exp8)	Tiempo (horas)
0,220	3,243	0,000
0,235	3,649	18,500
0,242	3,838	19,500
0,247	3,973	20,500
0,235	3,649	22,000
0,245	3,919	23,250
0,238	3,730	24,250
0,237	3,703	26,000
0,249	4,027	29,000
0,263	4,405	30,300
0,268	4,541	31,250
0,298	5,351	32,300
0,318	5,892	32,700
0,328	6,162	33,300
0,327	6,135	33,600
0,374	7,405	34,400
0,375	7,432	35,000
0,404	8,216	36,000
0,409	8,351	36,500
0,453	9,541	37,500
0,450	9,459	38,000
0,515	11,216	38,750
0,509	11,054	39,250
0,524	11,459	39,750
0,538	11,838	40,250
0,529	11,595	40,750
0,561	12,459	41,250
0,555	12,297	41,750
0,553	12,243	42,250

4. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE TEMPERATURA, pH, Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO ADECUADAS PARA LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA

4.1 MEDICIÓN DEL pH

El seguimiento del pH durante el proceso de fermentación mostró un leve descenso de este para las muestras inoculadas con respecto a las muestras sin inóculo; debido al incremento en la concentración de ácidos producidos por la mayor cantidad de

microorganismos presentes en las muestras inoculadas al degradar los azúcares que contiene el medio. (Gráfica 5)



Gráfica 2. Variación del pH durante el proceso de fermentación para muestras con y sin inóculo

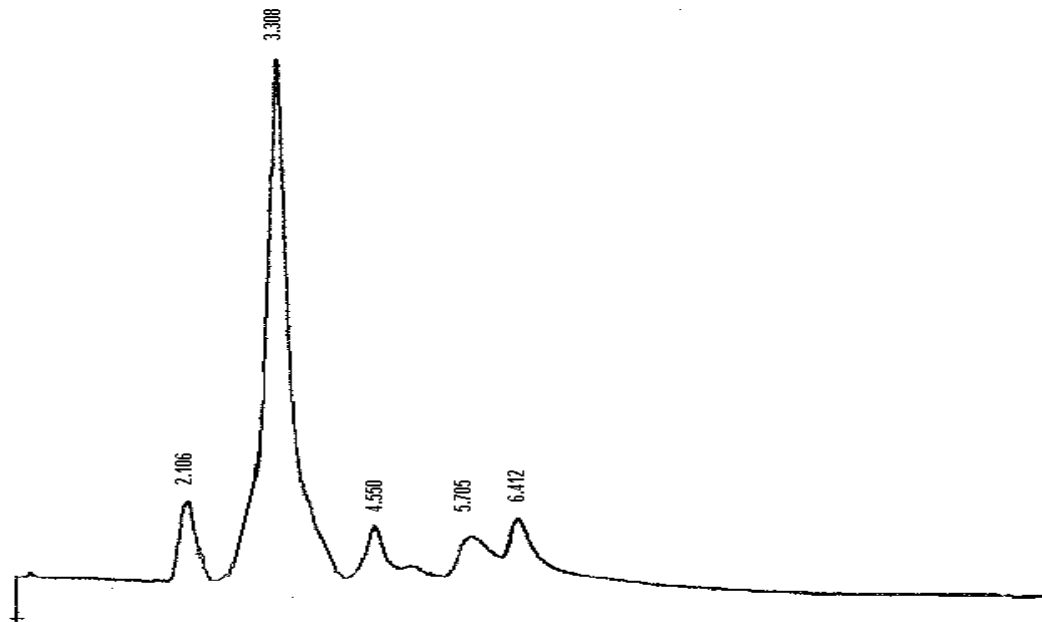
4.2 TEMPERATURA

Se determinó con el análisis del diseño experimental y con las pruebas realizadas que la temperatura no tuvo un efecto significativo en el proceso de fermentación ya que no se observaron diferencias de crecimiento de la población microbiana láctica/amilolítica ni de la concentración de ácido láctico al aumentar la temperatura de 26°C a 37°C, teniendo en cuenta que el aumento de estos dos factores favorecerá a la disminución del tiempo de fermentación del almidón.

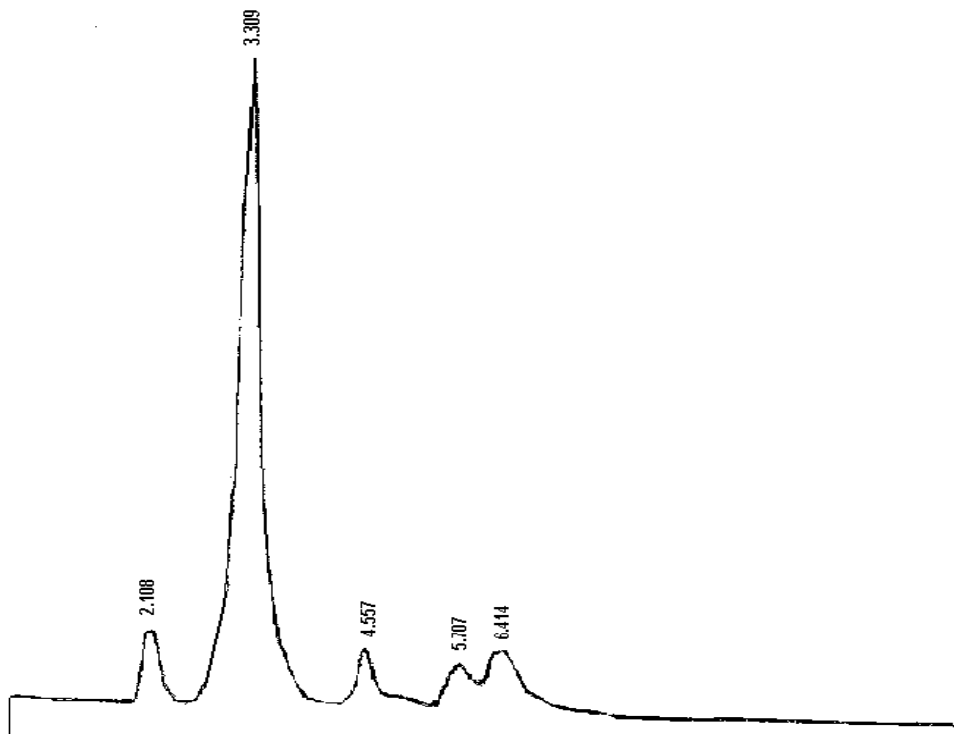
4.3 DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

Se realizó la comparación y el cálculo del área bajo la curva de los cromatogramas obtenidos para las muestras tomadas durante todo el proceso de fermentación (0, 5, 10, 15, 17, 20, 25 y 30 días de fermentación) a las diferentes temperaturas con y sin inóculo.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos para dos muestras de almidón agrio de 15 días de fermentación con inóculo y sin inóculo. En estos se puede observar la diferencia entre áreas bajo la curva para el pico de ácido láctico, la cual representa la concentración del ácido, este pico tuvo un tiempo de retención de 3.308 minutos. En la tabla 8 se reportan las concentraciones de ácido láctico obtenidas para las muestras de almidón analizadas con y sin inóculo.

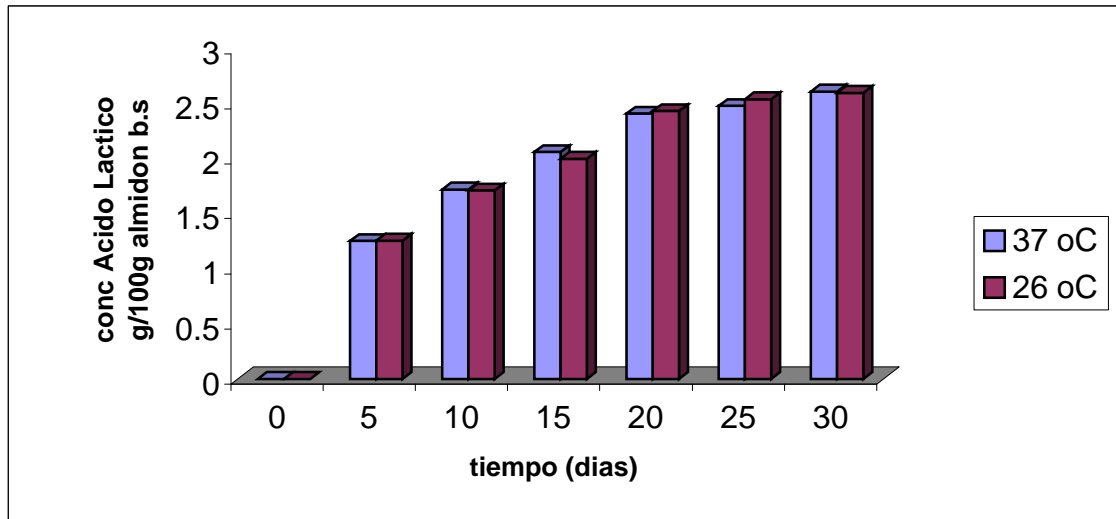


Gráfica 3. Cromatograma muestra de almidón agrio de 15 días de fermentación sin inóculo



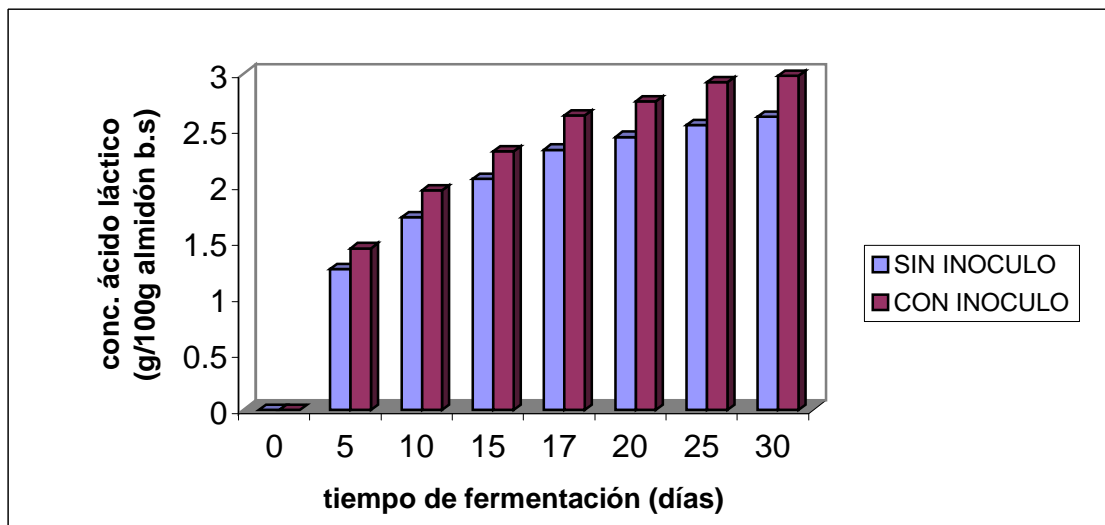
Gráfica 4. Cromatograma de muestra de almidón agrio de 15 días de fermentación con 20% v/v de inóculo

En la Gráfica 8 se observa el seguimiento que se realizó a la concentración de ácido láctico durante el proceso de fermentación a dos temperaturas distintas. Las variaciones que se observan son muy leves y no hay predominio de superioridad de ninguna de las dos temperaturas en cuanto a la concentración de ácido láctico.



Gráfica 5. Variación de la concentración de ácido láctico a diferentes temperaturas

En la gráfica 9 se observa que la concentración de ácido láctico aumentó en un rango del 12% al 15% a lo largo del proceso de fermentación en las muestras de almidón que fueron inoculadas, esto se debe al aumento de la población microbiana ácido / láctica responsable de la producción de dicho ácido. Se observó que la concentración de ácido láctico en la muestra de 30 días de fermentación sin inóculo fue de 2.613 g / 100 g de almidón b.s siendo esta muy similar a la concentración obtenida para la muestra de 17 días de fermentación con inóculo, la cual fue 2.627 g / 100 g de almidón b.s (tabla 8).



Gráfica 6 Variación de la concentración de ácido láctico durante la fermentación con y sin inóculo

Tabla 4. Concentraciones de ácido láctico obtenidas a lo largo del proceso de fermentación para muestras sin y con inóculo.

tiempo (días)	g A Láctico /100 g almidón b.s en muestras sin inóculo	g A Láctico /100 g almidón b.s en muestras con inóculo
0	0	0
5	1.253	1.440
10	1.718	1.958
15	2.060	2.307
17	2.320	2.627
20	2.433	2.749
25	2.540	2.921
30	2.613	2.978

5. ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN

Con los datos de la tabla 6 se obtuvo un modelo polinómico por regresión lineal múltiple, que representa la relación entre la variable dependiente (conc. ácido Láctico) y las variables independientes (Tiempo fermentación , temperatura y %inóculo) y sus interacciones. A continuación se presenta la ecuación obtenida (ecuación 1), el diagrama de Pareto (Gráfica 3) y la gráfica de conc. ácido láctico calculado vs conc. ácido láctico observado (Gráfica 4)

$$\text{Conc. ácido láctico} = 2.5472 + 0.4919 (\text{Tiempo fermentación}) + 0.1565 (\% \text{ inóculo}) - 0.237143 (\text{Tiempo fermentación})^2 + 0.0411333(\text{Tiempo fermentación}) (\% \text{ inóculo})$$

(ecuación 1)

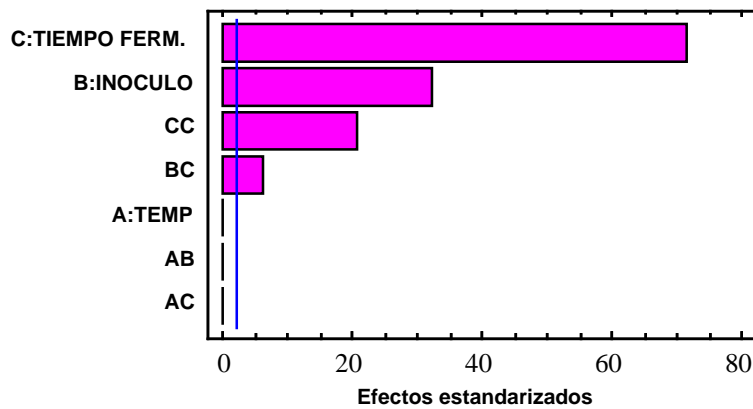
Tabla 5. Diseño experimental multinivel para el proceso de fermentación

TEMPERATURA	%INÓCULO	tferm	Conc.ácido láctico
-1	-1	0.5	2.541
-1	-1	0	2.433
1	1	-1	1.956
-1	-1	-1	1.718
-1	1	-1	1.958
-1	1	0	2.749
-1	1	1	2.978
1	1	1	2.975
1	1	-0.5	2.31
1	-1	-0.5	2.058
-1	1	0.5	2.921
-1	-1	-0.5	2.061
-1	1	-0.5	2.307
1	-1	0	2.431
1	1	0	2.751
1	-1	0.5	2.542
1	-1	1	2.613
1	1	0.5	2.921
-1	-1	1	2.613
1	-1	-1	1.719
-1	-1	0.5	2.536
1	1	-0.5	2.315
-1	1	-0.5	2.315
-1	-1	0	2.441
1	1	-1	1.962
1	-1	0	2.441
1	-1	-1	1.722
-1	1	0	2.741
-1	-1	-0.5	2.055
-1	1	-1	1.962
1	1	0.5	2.932
-1	1	0.5	2.931
1	-1	1	2.608
1	-1	0.5	2.534
-1	-1	-1	1.724
1	-1	-0.5	2.054
1	1	1	2.987
-1	1	1	2.989
-1	-1	1	2.608
1	1	0	2.743

-1	1	-1	1.953
-1	-1	-1	1.722
-1	-1	-0.5	2.063
1	1	0.5	2.916
1	-1	-1	1.722
1	-1	0.5	2.548
-1	1	-0.5	2.312
-1	1	0	2.755
1	1	1	2.988
1	-1	0	2.422
1	-1	-0.5	2.063
-1	-1	0	2.425
-1	1	1	2.988
1	1	0	2.755
1	1	-1	1.951
-1	1	0.5	2.918
1	1	-0.5	2.315
-1	-1	0.5	2.548
1	-1	1	2.598
-1	-1	1	2.601

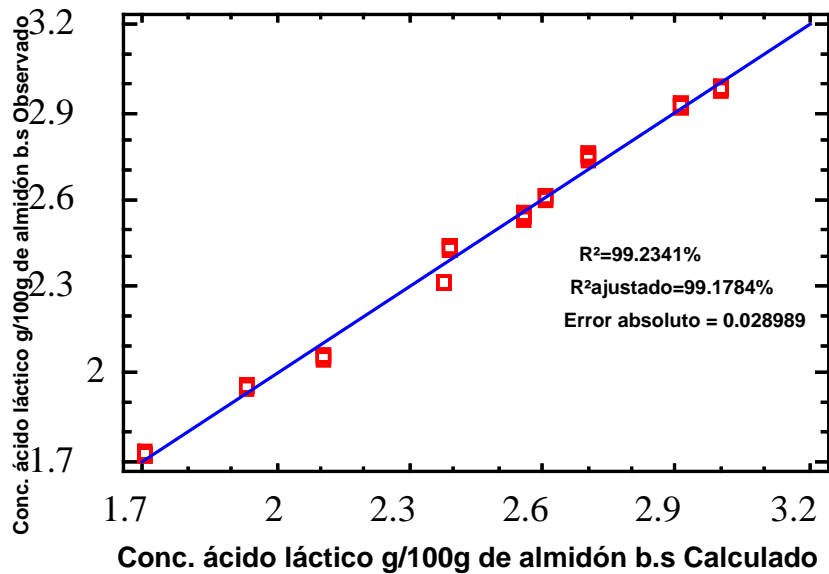
Continuación de la tabla 2

Se determinó que la temperatura no influye de forma significativa en el proceso de fermentación como se ilustra en el diagrama de Pareto (gráfica 3), que nos indica la influencia de las variables en el proceso, por tal razón no se tuvo en cuenta para el modelo matemático.



Gráfica 7. Diagrama de Pareto para las variables del proceso de fermentación

Como se observa en la gráfica 4 el coeficiente de correlación R^2 es superior al 90% hecho que confirma la confiabilidad de los experimentos.



Gráfica 8. Concentración de ácido láctico calculado vs concentración de ácido láctico observado

Tabla 6. Análisis de regresión múltiple para el proceso de fermentación

PARAMETRO	VALOR CALCULADO	ERROR	T	VALOR- p
CONSTANTE	2.5472	0.00729519	349.162	0.0000
TIEMPO	0.4919	0.00662028	74.302	0.0000
INOCULO	0.1565	0.00468125	33.4313	0.0000
TIEMPO*TIEMPO	-0.237143	0.0111903	-21.1918	0.0000
TIEMPO*INOCULO	0.0411333	0.00662028	6.21323	0.0000

El valor estadístico P determina el grado de significancia de cada uno de los efectos de las variables independientes sobre el modelo, el valor del estadístico -P para cada uno de los efectos indica niveles de confiabilidad del 99% (ver tabla 7).

6. DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

Para la realización del análisis estadístico no se tuvieron en cuenta los datos obtenidos para la temperatura de 37 °C, ya que el diseño experimental demostró que el aumento de temperatura no tiene un efecto significativo sobre el proceso de fermentación.

Tabla 7. Matriz del diseño de la superficie de respuesta y resultados

[INÓCULO] %v/v	tfer	[Ac LÁCTICO] g/100g de almidón b.s
-1	-0.66666667	1,253
-1	-0.66666667	1,252
-1	-0.66666667	1,256
1	-0.66666667	1,441
1	-0.66666667	1,445
1	-0.66666667	1,444
-1	-0.33333333	1,718
-1	-0.33333333	1,724
-1	-0.33333333	1,722
1	-0.33333333	1,958
1	-0.33333333	1,962
1	-0.33333333	1,953
-1	0	2,061
-1	0	2,055
-1	0	2,063
1	0	2,307
1	0	2,312
1	0	2,315
-1	0.33333333	2,433
-1	0.33333333	2,441
-1	0.33333333	2,425
1	0.33333333	2,749
1	0.33333333	2,741
1	0.33333333	2,755
-1	0.66666667	2,541
-1	0.66666667	2,536
-1	0.66666667	2,548
1	0.66666667	2,921
1	0.66666667	2,931
1	0.66666667	2,918
-1	1	2,613
-1	1	2,608
-1	1	2,601
1	1	2,978
1	1	2,989
1	1	2,988
-1	-0.66666667	1,256
-1	-0.66666667	1,252
-1	-0.66666667	1,256
1	-0.66666667	1,439
1	-0.66666667	1,445
1	-0.66666667	1,449

-1	-0.33333333	1,719
-1	-0.33333333	1,722
-1	-0.33333333	1,722
1	-0.33333333	1,956
1	-0.33333333	1,962
1	-0.33333333	1,951
-1	0	2,058
-1	0	2,054
-1	0	2,063
1	0	2,310
1	0	2,315
1	0	2,315
-1	0.33333333	2,431
-1	0.33333333	2,441
-1	0.33333333	2,422
1	0.33333333	2,751
1	0.33333333	2,743
1	0.33333333	2,755
-1	0.66666667	2,542
-1	0.66666667	2,534
-1	0.66666667	2,548
1	0.66666667	2,921
1	0.66666667	2,932
1	0.66666667	2,916
-1	1	2,613
-1	1	2,608
-1	1	2,598
1	1	2,975
1	1	2,987
1	1	2,988
-1	-1	0
-1	-1	0
-1	-1	0
1	-1	0
1	-1	0
1	-1	0
-1	-1	0
-1	-1	0
-1	-1	0
1	-1	0
1	-1	0
1	-1	0

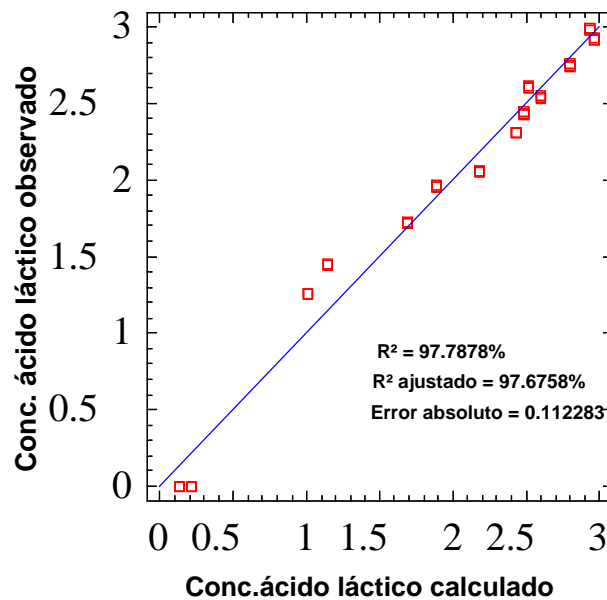
Continuación de la tabla 9

Con los datos de la tabla 9 se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para probar la importancia estadística de las variables, utilizando el programa STATGRAPHICS Plus 4.0, en el cual se observó que el tiempo de fermentación influye significativamente en la concentración de ácido láctico, según el ANOVA el porcentaje de contribución de esta variable es de 97.9063%.

Con los datos de la tabla 9 se obtuvo un modelo polinómico por regresión lineal múltiple, que representa la relación entre la variable dependiente (conc. ácido Láctico) y las variables independientes (Tiempo fermentación y % inóculo) y sus interacciones. A continuación se presenta la ecuación obtenida (ecuación 2):

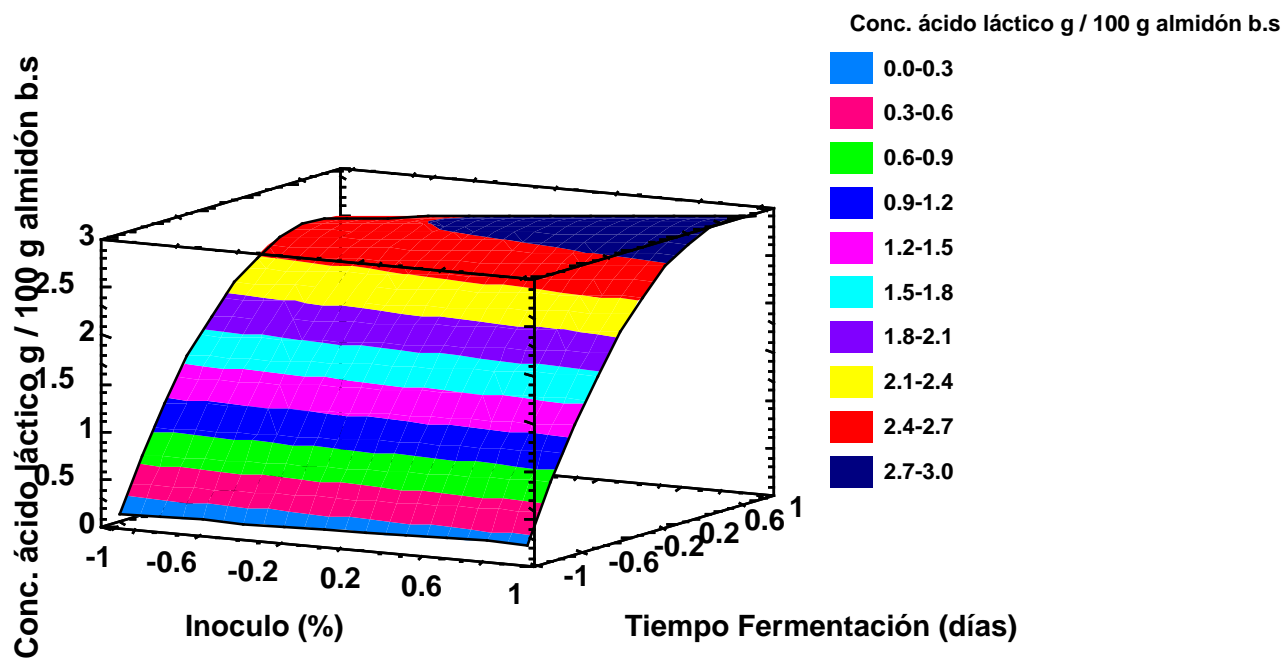
$$\text{Conc. Ácido láctico} = 2.31098 + 1.2755 (\text{Tiempo fermentación}) + 0.125333 (\% \text{ inóculo}) - 0.862946 (\text{Tiempo fermentación})^2 + 0.0855536 (\text{Tiempo fermentación}) (\% \text{ inóculo}) \text{ (ecuación 2)}$$

Con el fin de evaluar la ecuación obtenida, se graficó la concentración de ácido láctico calculado vs. concentración ácido láctico experimental y se calculó el coeficiente de correlación para el proceso. En este caso el coeficiente de correlación es de 97.7878 % (Gráfica 10).

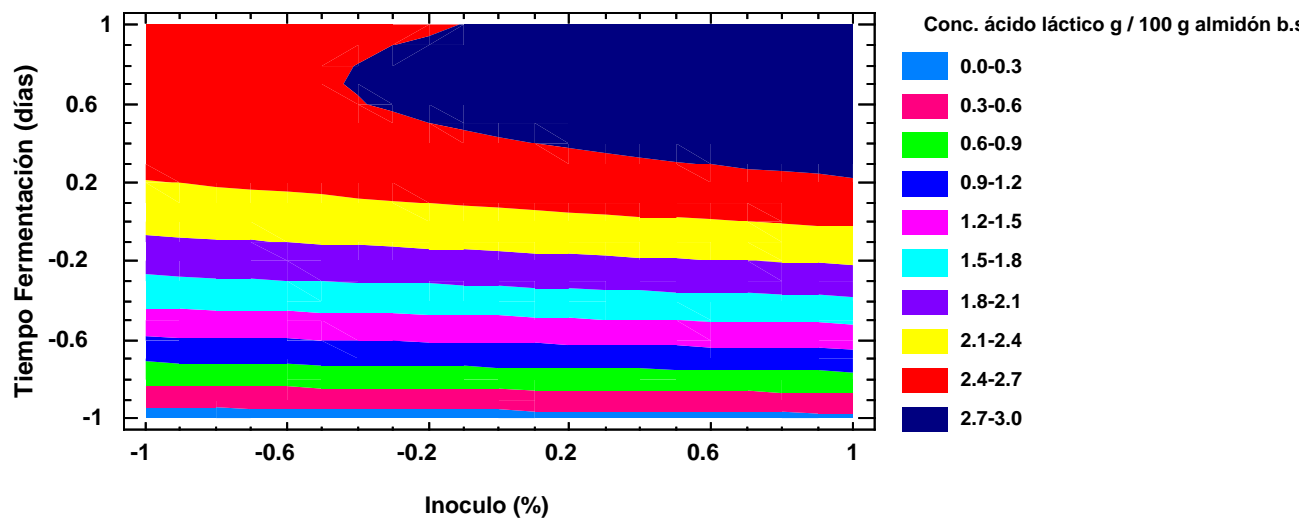


Gráfica 9. Concentración de ácido láctico calculado vs concentración de ácido láctico experimental

A continuación se presenta la gráfica de superficie de respuesta (gráfica 11) y la gráfica de contorno de superficie de respuesta respectivamente (gráfica 12).



Gráfica 10. Superficie de respuesta para el proceso de fermentación



Gráfica 11. Contorno de superficie de respuesta para el proceso de fermentación

Por inspección directa de las líneas de nivel de la gráfica 12, se observó que la mayor concentración de ácido láctico para el proceso de fermentación, se obtiene en un intervalo de tiempo de 18 a 27 días y en un intervalo de concentración de inóculo de 11% a 20% (v/v).

Se efectuaron experimentos adicionales para validar la superficie de respuesta (ecuación 2). En la tabla 10 se reportan los resultados.

Tabla 8. Validación del modelo descrito por la ecuación 2

Condiciones de fermentación		Conc. ácido láctico		% Error absoluto
Tiempo (días)	Inóculo (%)	Experimental	Calculado	
10	10	1.753	1.785	3.2
20	10	2.691	2.643	4.8
25	10	2.723	2.778	5.5
30	10	2.762	2.725	3.7
10	15	1.875	1.834	4.1
20	15	2.791	2.720	7.1
25	15	2.822	2.870	4.8
30	15	2.881	2.830	5.1

Los datos de validación del modelo matemático no sobrepasan un porcentaje de error del 10% (Tabla 10), lo que indica que el modelo se ajusta experimentalmente a la ecuación 2 que representa la influencia de las variables tiempo y porcentaje de inóculo sobre la producción de ácido láctico.

7. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ALMIDÓN AGRIO OBTENIDO POR FERMENTACIÓN NATURAL DEL ALMIDÓN DE YUCA

7.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD, CENIZAS, MATERIAL SOLUBLE, GRASAS, NITRÓGENO Y PROTEÍNAS

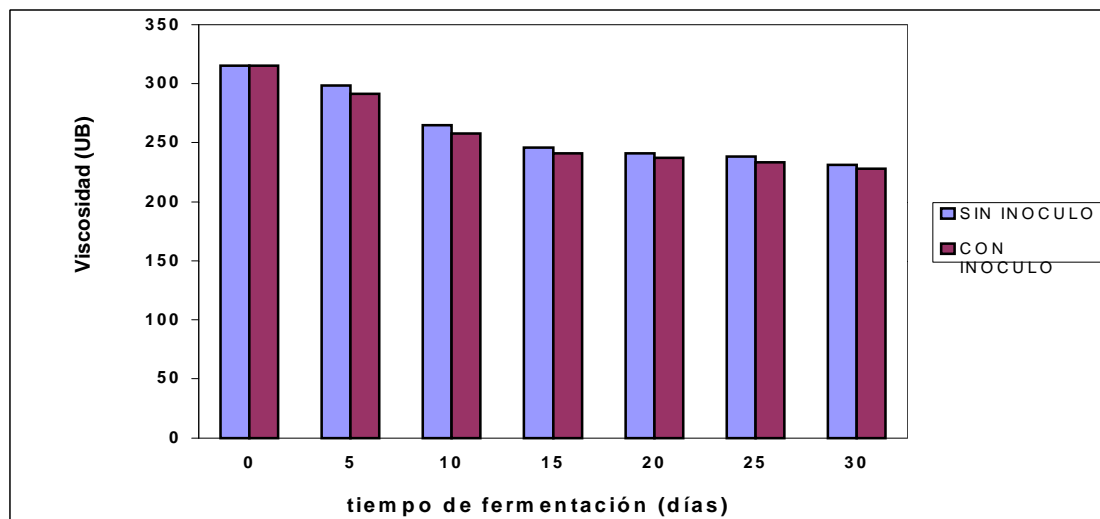
Los resultados obtenidos en las pruebas físicoquímicas realizadas al almidón de yuca fermentado con y sin inóculo se presentan en la tabla 2, observándose que no hay diferencias significativas en las propiedades físicoquímicas expuestas, tan solo se puede señalar un leve aumento en el rango del porcentaje de proteína para las muestras inoculadas.

Tabla 9. Características fisicoquímicas del almidón fermentado

MUESTRAS	%HUMEDAD	%CENIZAS	%PROTEINA	% GRASAS	% SOLUBILIDAD
Sin inocular de 30 días de fermentación	12.7 – 13.8	0.22 – 0.25	0.20 – 0.23	0.002 – 0.003	0.39 – 0.42
Inoculado de 30 días de fermentación	12.5 – 13.5	0.21 – 0.24	0.29 – 0.31	0.002 – 0.003	0.43 – 0.46

7.2 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

Se observó que la viscosidad disminuye a medida que aumenta el tiempo de fermentación y que las muestras de almidón que se inocularon presentaron una leve disminución en su viscosidad con respecto a las muestras que no fueron inoculadas, hecho que puede relacionarse con la hidrólisis que sufren las cadenas de almidón y con el aumento de la concentración del ácido láctico durante el proceso de fermentación, ambos fenómenos potencializados por la mayor cantidad de microorganismos presentes en el almidón inoculado. También se puede relacionar con la reorganización molecular del almidón producida por las radiaciones solares durante el proceso de secado. (Gráfica 1)



Gráfica 12. Variación de la viscosidad durante el proceso de fermentación para muestras de almidón fermentado con inóculo y sin inóculo

8. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ALMIDÓN AGRIO.

Tabla 10. Poder de panificación (PP) obtenido para almidones de diferentes días de fermentación con y sin inóculo

	MUESTRA	17 DÍAS DE FERMENTACIÓN	30 DÍAS DE FERMENTACIÓN
PODER DE PANIFICACIÓN PP (cm³/g)	sin inóculo	6.8	8.5
	con inóculo	9.2	10.5

Se observó que el PP obtenido para los almidones de 17 y 30 días de fermentación con inóculo fue superior al valor obtenido para el almidón de 17 y 30 días de fermentación sin inóculo, estos resultados se pueden atribuir a la mayor concentración de ácido láctico en las muestras inoculadas y al papel preponderante que juega este ácido durante el secado solar para dar la propiedad de expansión al almidón agrio de yuca.

El almidón agrio que se obtuvo del proceso de fermentación inoculado y que se utilizó en la elaboración de los bizcochos presentó características organolépticas (olor, sabor y textura) similares a las que presenta el almidón comúnmente utilizado en panadería.

CONCLUSIONES

- Ü Se identificaron 5 microorganismos con características láctico/amilolíticas responsables de la fermentación del almidón de yuca, estos fueron: *Lactobacillus casei* subsp *pseudoplanarum*, *Lactobacillus xylosus*, *Lactobacillus planarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus coprophilus*.
- Ü Las variables significativas del proceso de fermentación del almidón fueron el tiempo de fermentación y la concentración de inóculo.
- Ü El aumento de temperatura hasta 37°C no tuvo un efecto significativo sobre el proceso de fermentación ya que el crecimiento de la población microbiana láctica/amilolítica no se vio beneficiado por el cambio de temperatura.
- Ü El seguimiento del pH durante el proceso de fermentación mostró un claro descenso para las muestras de almidón inoculadas con respecto a las muestras sin inóculo; esto se debe al incremento en la concentración de ácidos producidos por la mayor cantidad de microorganismos presentes en las muestras inoculadas al degradar los azúcares que contiene el medio.
- Ü La concentración de ácido láctico aumentó notablemente a lo largo del proceso de fermentación en las muestras de almidón que fueron inoculadas, esto se debe al aumento de la población microbiana láctica/amilolítica responsable de la producción de dicho ácido.
- Ü La concentración de ácido láctico obtenida para la muestra de almidón de 17 días de fermentación inoculada fue similar a la obtenida para el almidón de 30 días de fermentación sin inocular, lo que indica una disminución de 13 días en el tiempo de fermentación del almidón gracias a la adición del inóculo.
- Ü En las propiedades fisicoquímicas (humedad, cenizas, material soluble, grasas, nitrógeno y proteínas) no hubo cambios significativos entre el almidón inoculado y el almidón sin inocular, la variación más notoria se presentó en el porcentaje de proteína, el cual fue levemente mayor en las muestras inoculadas; hecho que se atribuye a la mayor cantidad de microorganismos presentes en el medio, lo que indica que la adición del inóculo al proceso de fermentación no altera las propiedades fisicoquímicas del almidón agrio en gran proporción.

- Ü La viscosidad disminuyó a medida que aumentó el tiempo de fermentación, notándose una disminución levemente mayor en las muestras de almidón inoculadas con respecto a las muestras que no fueron inoculadas, hecho que se relaciona con la hidrólisis que sufren las cadenas de almidón y con el aumento de la concentración del ácido láctico durante el proceso de fermentación, ambos fenómenos potencializados por la mayor cantidad de microorganismos presentes en el almidón inoculado; también se puede relacionar con la reorganización molecular del almidón producida por las radiaciones solares durante el proceso de secado. La disminución en la viscosidad favorece la calidad del almidón agrio ya que es una condición necesaria para obtener un buen poder de panificación.

- Ü El poder de panificación obtenido para los almidones de 17 y 30 días de fermentación con inóculo fue superior al obtenido para el almidón de 30 días de fermentación sin inóculo, lo que indica que el almidón agrio obtenido en el proceso de fermentación inoculado es de buena calidad. Estos resultados se pueden atribuir a la mayor concentración de ácido láctico presente en las muestras inoculadas y al papel preponderante que juega este ácido durante el proceso de secado solar para dar la propiedad de expansión al almidón agrio de yuca.

RECOMENDACIONES

- ü Realizar la inoculación del proceso de fermentación con cantidades de inóculo superiores e inferiores a las utilizadas en esta investigación, para obtener y estandarizar valores máximos y mínimos de inóculo que se puede utilizar de forma rentable.
- ü Realizar las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de otros tipos de microorganismos, diferentes a los lactobacilos que puedan estar presentes y jueguen un papel importante en el proceso de fermentación del almidón de yuca.
- ü Hacer un análisis exhaustivo del efecto de la inoculación del proceso de fermentación sobre las propiedades organolépticas del almidón agrio obtenido.
- ü Hacer un análisis del material utilizado en los recipientes para la fermentación que puedan tener influencia directa en el proceso de fermentación y calidad del almidón agrio.
- ü Realizar un análisis de costos del proceso de fermentación inoculado, para establecer su viabilidad financiera.

BIBLIOGRAFÍA

1. ASCHERI, Diego P. Determinación del tiempo óptimo de la fermentación del almidón de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz), En La Fabricación Del almidón Agrio (Polvilho Azedo). Universidad Estadual De Goiás (UEG). Departamento De Química. Rua Monteiro Lobato. Anápolis –GO- Brasil.1997. www.monografias.com/trabajos6/deteti/deteti.shtml
2. CAMARGO, Celina. COLONNA, Paul. BULEON, Alain. MOLARD, Daniel Richard. Functional properties of sour cassava (*Manihot utilissima*) starch: polvilho azedo. Institut National de la Recherche Agronomique, Rue de la Géraudière, 44072 Nantes Cédex 03, France. Journal Sci Food Agric. Vol. 45, 1988. p 273-289
3. BRABET, C. DOFOUR D. El almidón agrio de yuca producción y estudios de las propiedades fisicoquímicas. Simposio En Carbohidratos. Quito, Ecuador. p 197-210. 1993. CIRAD-SAR, Montpellier, Francia. CIAT, Cali, Colombia.
4. ALARCÓN, Freddy M. DUFOUR, Dominique. Almidón agrio de yuca en Colombia. Tomo I Producción Y Recomendaciones. Publicación CIAT No 268. Cali, Colombia. p 9-21. 1998. ISBN 958-9439-67-5.
5. PARRA GONZALEZ, Luz Marina. Contribución al estudio de las características fisicoquímicas del almidón de yuca dulce y agrio contenido en la variedad chirosa en Santander. Universidad industrial de Santander. Escuela de química. Bucaramanga. p 87-97. 1987. Tesis de postgrado.
6. MICHEL, Rivier. MORENO, Martín A. RUIZ, Ricardo. ALARCÓN, Freddy M. DUFOUR, Dominique. Almidón agrio de yuca en Colombia. Tomo II Planta procesadora: Descripción y Planos de los Equipos. Publicación CIAT No 323. Cali, Colombia. p 5-17. 2001.
7. GOTTRET MV, DUFOUR D. Proyecto integrado de investigación y desarrollo de la producción y transformación de yuca para la obtención y comercialización de almidón agrio de yuca: adopción e impacto. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 1997. p 39.
8. ALARCÓN M, Freddy. Determinación del contenido de ácidos orgánicos por cromatografía de gases para la caracterización del almidón agrio. Laboratorio de utilización de yuca. 1995. CIAT. Cali, Colombia.
9. MORRISON, Robert Thornton. BOYD, Robert Neilson. Química Orgánica. Quinta edición. Pearson Educación. 1998. p 1309-1318.
10. Enciclopedia of industrial chemical analysis. Edited By Foster Dee Snell And Clifford L. Hilton. Editorial Staff. Vol. 4. New York. 1967. p 35-37.

11. MESTRE, C. ROUAU, X. ZAKHIA, N. BRABET, C. Physicochemical properties of cassava sour starch. CIRAD/SAR, stationed at the Cassava Utilization Section, CIAT, Cali, Colombia. 1997.
12. PEÑA R. 1995. La industria del almidón agro en el departamento del Cauca Colombia, Santander de Quilichao, Universidad del Valle, CIAT, CETEC. p 35
13. MEYER, Marco. Control de calidad de productos agropecuarios. Editorial Trillas. México 1982. p 77- 80
14. CABANZO, C., LUNA , T. Estudio del proceso de extracción de almidón de yuca de tres variedades (Amarga, Armenia y Chile) y evaluación de la remoción del cianuro en el residuo líquido obtenido en la sedimentación del almidón. Tesis. Colombia. Universidad Industrial de Santander. 2002
15. .A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association Official Analytic Chemist. Sidney William. 1984
16. MENDIVELSO TORRES, Jesús Elías. Estudio de la influencia de la radiación solar y del ácido láctico sobre la adquisición del poder de panificación del almidón agro de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz). Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad De Ingeniería De Alimentos. Bogotá, Colombia. 1996. Tesis.
17. MONTALDO, A. La yuca frente al hambre del mundo tropical. Maracay, Venezuela: Anaco ediciones. Universidad Central de Venezuela. 1996. p. 301,309,315,316.
18. BERGEY´ S. Manual of determinative bacteriology. United States. Eighth -edition. Editorial Board. 1974. p 576-585
19. PALLERONI, Norberto J. Principios generales de microbiología. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. ProGrama Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de microbiología Hoffmann-La Roche. Nutley, New Jersey, Estados Unidos. Monografía No 7. Segunda edición. 1980. p 32-33, 117-122.
20. Universidad INCCA de Colombia. Instituto superior de matemáticas y ciencias de la naturaleza. Microbiología. Ediciones UNINCCA. Bogotá. 1972. p 75.
21. KLICH, M., PITT, J. A laboratory guide to the common aspergillus species and their teleomorphs. Australia . 1988 p. 5-30
22. POWER, David A. 1988. Manual of BBL products and Laboratory procedures. Sixth ed. United States of America

23. STANIER, Roger Y. INGRAHAM, John L. Microbiología. Segunda edición. Editorial Reverté, S.A. 1989. p 1, 24-29, 99-101, 712.
24. Box P. , at el. 1989. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona: Reverte.
25. LEVEAU J.,BOUIX,M. Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial. España. Ed. Acribia S.A. 2000. p.531-564

ANEXOS

ANEXO A

Preparación del medio

El medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el crecimiento de los microorganismos ácido-lácticos fue el M.R.S. Se preparó en un litro de agua destilada agregando:

Reactivos	Cantidad (g/L)
Peptona bacteriológica	10
Extracto de levadura	4
Glucosa	20
Twen 80	1
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.2
Agar bacteriológico	10
Extracto de carne	8
Fosfato dipotásico	2
Citrato amonico	2
Sulfato de manganeso	0.005

La solución debe tener pH de 6,2.

Los reactivos se disolvieron y se calentaron hasta obtener una solución cristalina. Luego se llevó al autoclave a una presión de 15 psi por 15 minutos y 121⁰C para su esterilización. y luego se distribuyó en cajas petri.

ANEXO B

CURVA ESTÁNDAR PARA CALIBRACION DEL ESPECTROFOTÓMETRO Spectroquant® NOVA 400 PARA LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERIANA EN EL INÓCULO

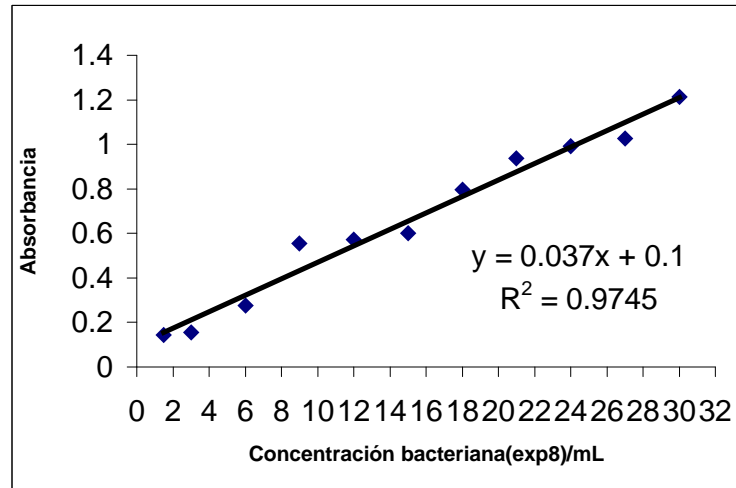
Inicialmente se prepararon soluciones de BaCl₂ al 1% y de H₂SO₄ al 1%, se mezclaron en 11 proporciones diferentes a un volumen fijo de 10mL. La absorbancia se tomo a cada mezcla en un espectrofotómetro de haz simple Spectroquant® NOVA 400 a una $\lambda = 550$ nm utilizando la Escala de Macfarland como curva patrón (método turbidimétrico).

ESCALA DE McFARLAND

No. DE TUBO	Vol de BaCl ₂ 1% (mL)	Vol de H ₂ SO ₄ 1% (mL)	BACTERIAS /mL
0.5	0.05	9.95	1.5 X 10 ⁸
1	0,1	9,9	3 X 10 ⁸
2	0,2	9,8	6 X 10 ⁸
3	0,3	9,7	9 X 10 ⁸
4	0,4	9,6	12 X 10 ⁸
5	0,5	9,5	15 X 10 ⁸
6	0,6	9,4	18 X 10 ⁸
7	0,7	9,3	21 X 10 ⁸
8	0,8	9,2	24 X 10 ⁸
9	0,9	9,1	27 X 10 ⁸
10	1,0	9,0	30 X 10 ⁸

ANEXO C

CURVA PATRON CONCENTRACION BACTERIANA

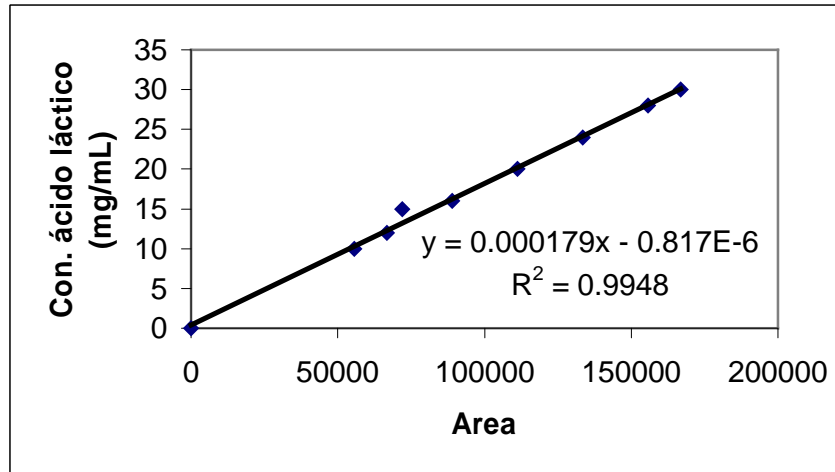


Las concentraciones utilizadas para realizar la curva de calibración se presentan con sus respectivas absorbancia:

Conc. bacteriana /mL(exp8)	Absorbancia
1,5	0,144
3	0,156
6	0,277
9	0,556
12	0,572
15	0,600
18	0,796
21	0,936
24	0,993
27	1,025
30	1,213

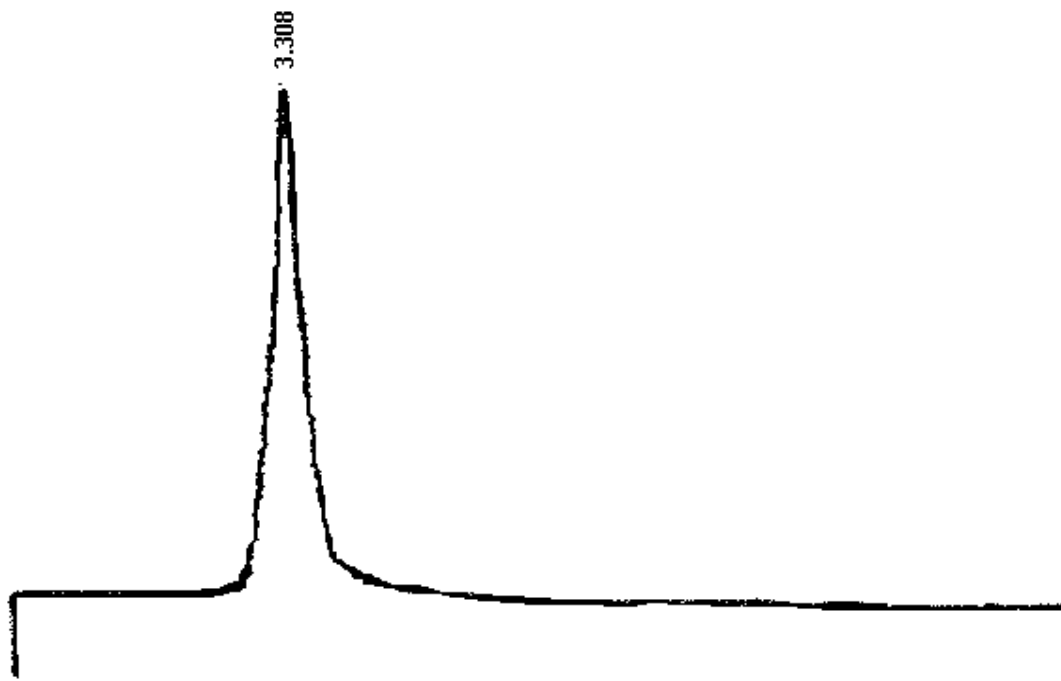
ANEXO D

CURVA PATRON PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO



Concentraciones de ácido láctico utilizadas para realizar la curva patrón.

SOLUCION PATRON	CONC. ACIDO LACTICO (mg/mL)
A	30
B	28
C	24
D	20
E	16
F	12
G	10



Cromatograma muestra patrón de 20 mg/ml de ácido láctico