



Universidad de Sevilla.
Escuela Politécnica Superior de Sevilla



Trabajo fin de Máster Universitario en tecnología e industria alimentaria.

Estudio de optimización de la fermentación de batata en salmuera

Autor:

Leidy Alejandra Zambrano Camargo

Tutores:

María de la Montaña Durán Barrantes

Carlos Medina Morillas

Sevilla, Julio de 2023

Agradecimientos

Agradecida con la vida por permitirme disfrutar de esta experiencia de aprender de la academia y cultura en otro lugar del mundo, una meta cumplida que, a pesar de la distancia, me permite estar aún más agradecida con mi familia por siempre mostrarme su total apoyo para las decisiones de vida que he tomado.

Mis padres y hermanas son el soporte más hermoso que tengo, sentirlos orgullosos de mí, fue una gran motivación para terminar con éxito mis Master.

Agradezco a los doctores M.^a de la Montaña y Carlos, excelentes personas y tutores quienes mostraron su gran interés por el desarrollo exitoso de mi TFM siempre con toda disposición y actitud inquietante para avanzar como equipo.

INDICE

RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.	9
2. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO.	11
2.1. Generalidades de la batata.	11
2.2. Fermentación.	13
2.2.1. Técnica de fermentación tipo brining.....	15
2.3. Cultivos iniciadores.	15
2.4. Probióticos.	15
2.5. Péptidos antimicrobianos.	17
2.6. Bacterias ácido lácticas.	18
1. OBJETIVOS	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
2.1. Proceso de fermentación:	21
2.2. Análisis fisicoquímicos:	21
2.3. Análisis microbiológicos	22
2.4. Montaje de cultivo iniciador:	22
2.5. PCR y electroforesis.	22
2.6. Métodos:	23
2.6.1. Fase 1.....	23
2.6.2. Fase 2.....	25
2.6.3. Fase 3.....	27
3. RESULTADOS.	30
3.1. Fase 1.	30
3.2. Fase 2.	34
3.2.1. Péptidos antimicrobianos	37
3.2.2. Comparativo de temperatura	40
3.2.3. Conservación:.....	41
3.2.4. PCR y electroforesis.....	42
3.3. Fase 3.	42
3.3.1. Análisis sensorial	45

4. DISCUSIÓN.....	47
5. CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFIA	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Valores nutricionales de diversos tubérculos de interés comercial en 100g de producto.	12
Tabla 2 Resultados de análisis físico- químicos en fermentación, Fase 1.	30
Tabla 3 Conteo microbiológico a 69 horas de incubación, Fase 1.	31
Tabla 4 Descripción de las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos aislados en Fase 1	33
Tabla 5 Resultado de parámetros físico-químicos y conteo microbiológico durante el proceso de fermentación, Fase2.	35
Tabla 6 Caracterización fenotípica de microorganismos aislados en 71 horas de fermentación, Fase 2.....	36
Tabla 7 Evaluación de producción de péptidos antimicrobianos en microorganismos aislados en fase 1 y fase 2.....	39
Tabla 8 Análisis fisicoquímicos con variable de temperatura de conservación.	41
Tabla 9 Resultado de parámetros físico-químicos y conteo microbiológico durante proceso de fermentación, Fase3.....	42
Tabla 10 Caracterización y conteo de colonias en agar LS	44
Tabla 11 Caracterización de colonias en MRS, 24 horas de incubación anaerobia + 72 horas incubación aerobia.	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Aplicación industrial de bacterias ácido-lácticas.	19
Figura 2 Montaje fermentación, Fase 2.	26
Figura 3 Montaje de cultivo iniciador.	29
Figura 4 Tinción de Gram de algunas colonias aisladas.	34
Figura 5 Evaluación del pH y acidez total durante la fermentación. Fase 2.	35
Figura 6 Conteo microbiológico en medio LS Diferencial y MRS durante el proceso fermentativo en fase 2.	36
Figura 7 Caracterización microscópica y macroscópica de capa formada en fermentación a 71 horas.	37
Figura 8 Resultados de evaluación de péptidos antimicrobianos por el método N.º 2 con previo crecimiento, en medios LS y MRS	38
Figura 9 Ejemplos de inhibiciones obtenidas:	40
Figura 10 Comparativo de crecimiento con variable de temperatura.	41
Figura 11 Evaluación del pH y la acidez total durante la fermentación con cultivo iniciador.	43
Figura 12 Formación de capa blanca tras 20 horas de incubación, Fase 3.	43
Figura 13 Proporción de las poblaciones microbianas recuperadas en agar LS diferencial.	45

Estudio de optimización de la fermentación de batata en salmuera

Autor: Leidy Alejandra Zambrano Camargo¹

Tutores: María de la Montaña Durán Barrantes²

Carlos Medina Morillas³

RESUMEN

La fermentación es un proceso de conservación tradicional que le confiere al alimento modificaciones reflejadas en las características organolépticas y de conservación deseables tras la acción metabólica de los microorganismos. De este proceso, también se puede derivar el aislamiento de microorganismos probióticos y/o productores de péptidos antimicrobianos. El proceso de fermentación de vegetales es un amplio campo de estudio en donde principalmente se maneja un método espontáneo sin embargo la inclusión de cultivos iniciadores es favorable en los procesos de este tipo. La batata es un alimento muy completo a nivel nutricional lo que la perfila como una matriz fermentable muy provechosa. El presente trabajo muestra el estudio de fermentación de la batata en tres fases:

Fase 1: Primer acercamiento a la fermentación espontánea de batata, Fase 2: fermentación espontánea bajo variables de temperatura, concentración de salmuera e interferentes definidas partiendo de los resultados de la fase 1 y Fase 3: Planteamiento y ejecución de una primera fermentación de batata con cultivo iniciador creado a partir de los microorganismos aislados en las fases anteriores.

Palabras clave: Batata, Fermentación espontánea, cultivo iniciador, péptidos antimicrobianos.

¹ Microbióloga y Bioanalista, Estudiante de Master Universidad de Sevilla

² PhD, en Química, Tecnología de alimentos, Profesora titular Universidad de Sevilla.

³ PhD. en Microbiología, profesor titular Universidad de Sevilla

Optimization study of sweet potato fermentation in brine.

Author: Leidy Alejandra Zambrano Camargo

Tutors: María de la Montaña Durán Barrantes

Carlos Medina Morillas

Fermentation is a traditional conservation process that gives the food modifications reflected in the organoleptic characteristics and desirable conservation after the metabolic action of microorganisms. From this process the isolation of probiotic microorganisms and/or producers of antimicrobial peptides can also be derived. The process of vegetable fermentation is a wide field of study where a spontaneous method is mainly handled, however the inclusion of starter cultures is favorable in processes of this type. The sweet potato is a very complete food at a nutritional level, which outlines it as a very profitable fermentable matrix. The present work shows the study of sweet potato fermentation in three phases: phase 1: first approach to the spontaneous fermentation of sweet potato, phase 2: spontaneous fermentation under temperature variables, brine concentration and defined interferents based on the results of phase 1, and phase 3: approach and execution of a first sweet potato fermentation with starter culture created from the microorganisms isolated in the previous phases.

- Keywords: sweet potato, spontaneous fermentation, starter cultures, antimicrobial peptides.

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.

La fermentación ha sido una técnica de conservación que ha perdurado a lo largo del tiempo y que sigue siendo estudiada con la aplicación a más alimentos dados los múltiples beneficios que este proceso genera como la estabilidad, mejora de las propiedades organolépticas, nutricionales y en relación a la salud humana como lo muestra recientes estudios frente a la modulación de la microbiota intestinal (Rezac et al, 2018).

Dentro de los grupos de alimentos cuya fermentación ya es un proceso muy conocido encontramos los lácteos, cárnicos, bebidas alcohólicas y algunos vegetales, sin embargo, este último grupo tiene aún grandes posibilidades de seguir siendo estudiado.

Los vegetales pueden ser fermentados a través de dos vías:

- fermentación espontánea, realizada por la microbiota propia de la matriz alimentaria
- fermentación controlada mediante la inoculación de cultivos iniciadores previamente seleccionados por sus características tecnológicas y funcionales otorgándole mayor robustez al proceso (Di Cagno et al., 2013).

Evaluando la composición química y versatilidad de algunos vegetales se encuentra que la batata, es un alimento con alto contenido de carbohidratos, vitaminas y minerales, lo que la perfila como una matriz de interés para los procesos fermentativos, sin embargo, su uso al respecto se ha inclinado principalmente en la producción de bebidas alcohólicas.

La batata, considerada como un alimento básico, ha sido cultivada quizás desde el año 3000 A.C., y representa una fuente importante de alimento en comunidades indígenas de centro y Suramérica. La expansión de este cultivo se dio tras el descubrimiento de América puesto que los españoles llevaron las raíces a España, África, Filipinas y el oriente (Icamina, 1985).

Este tubérculo tiene una alta adaptabilidad a terrenos marginales, es de fácil cultivo en espacios reducidos y tiene un sistema de propagación sencillo lo que

permite su alta productividad. “La batata, después de la patata y la mandioca, es el tercer cultivo más importante de propagación vegetativa en el mundo. El 70% de la superficie cultivada, se concentra en China, Nigeria, Tanzania, Uganda y Malawi. Brasil, Argentina, Perú, Uruguay y Paraguay son los principales países productores de Sudamérica” (Plestsch, 2023).

Con el fin de aprovechar el potencial de cosecha de batata en países latinoamericanos y su atractivo como alimento a nivel mundial se decide evaluar un proceso fermentativo como opción de conservación, modificación para crear otras alternativas de consumo, mejorar sus beneficios a nivel nutricional y la posibilidad de empleo como vehículo para microorganismos probióticos como producto funcional no lácteo, siendo estos objetivos el fuerte innovador a futuro con bases de este proyecto.

El presente documento muestra los resultados del proceso fermentativo de la batata obtenidos en una investigación experimental efectuada en tres fases descritas a continuación:

Fase 1: primer acercamiento a la fermentación espontánea de batata

Fase 2: fermentación espontánea bajo variables de temperatura, concentración de salmuera e interferentes definidas partiendo de los resultados de la fase 1.

Fase 3: planteamiento y ejecución de una primera fermentación de batata con cultivo iniciador creado a partir de los microorganismos aislados en las fases anteriores.

El trabajo se desarrolló en departamento de Microbiología de la facultad de Biología y el departamento de Ingeniería Química de la facultad de Química de la universidad de Sevilla.

2. ANTEDECENTES Y MARCO TEORICO.

2.1. Generalidades de la batata.

Batata (*Ipomoea batatas L.*), también conocido como boniato, camote o patata dulce según la región donde se trate, es el tercer alimento con mayor producción dentro de los tubérculos, después de la papa y la yuca. Su estimación de producción anual es en promedio 130 millones de toneladas, generando un impacto en la economía a nivel mundial, ubicándola después del arroz, maíz y yuca. Se trata entonces, de una hortaliza de fácil cultivo con múltiples aplicaciones tanto para alimentación animal como humana.

Haciendo un comparativo nutricional basado en vitamina A, beta-caroteno, fibra, proteína, azúcares y minerales de este tubérculo entre otras raíces, la batata se perfila como la de mayor contenido convirtiéndola en un vegetal con potencial salida en la industria de alimentos por su atractivo beneficioso, como se muestra en la Tabla 1 (Marti et al., 2011; Florez & Uribe, 2016).

Estudiando a profundidad sus beneficios tenemos que:

- Al ser rico en fenoles y flavonoides, los cuales en conjunto con proteínas como glutatión y las vitaminas que la componen le confieren un alto poder antioxidante.
- Su alto contenido de fibra permite la fácil digestión de carbohidratos manteniendo niveles controlados de azúcar en el organismo de quien la consume.
- Su importante contenido de betacaroteno puede actuar como protector a ciertos tipos de cáncer y mejorar la respuesta inmunitaria.
- Finalmente, al ser rica en antocianinas (pigmento que le confiere su color anaranjado) que, al también ejercer acción antioxidante, ayuda a reducir la inflamación de las articulaciones (Marti et al., 2011).

Factor nutricional	Batata	Papa	Yuca	Ñame	Arracacha
Humedad (g)	77	79	60	70	74
Energía (Kcal)	360	322	670	494	102
Proteína (g)	1,66	2,0	1,4	1,5	0,08
Lípidos (g)	0,05	0,09	0,28	0,17	0,2
Carbohidratos Totales (g)	20	17	38	28	24,40
Fibra (g)	3	2,2	1,8	4,1	1
Azúcares (g)	4,18	0,78	1,7	0,5	-
Calcio (mg)	30	12	16	17	26
Hierro (mg)	0,61	0,78	0,27	0,54	0,09
Magnesio (mg)	25	23	21	21	-
Fosforo (mg)	47	57	27	55	52
Potasio (mg)	337	421	271	816	-
Sodio (mg)	55	6	14	9	-
Zinc (mg)	0,3	0,29	0,34	0,24	-
Vitamina C (mg)	2.4	19,7	20,6	17.1	23
Tiamina	0.08	0,08	0,09	0.11	0,07
Rivoflavina	0.06	0,03	0,05	0.03	0,06
Niacina	0.56	1,05	0,85	0.55	3,40
Vitamina A (IU)	14187	2	13	138	60
Beta-Caroteno (μ g)	8509	1	8	83	0

Fuente. Elaborado a partir de información en (Jimenez, 2005); (Jaramillo, 1980); "Nutrient data laboratory". United States Department of Agriculture. Retrieved June 2014.

Tabla 1 Valores nutricionales de diversos tubérculos de interés comercial en 100g de producto.

Su consumo regular es de forma directa en comidas (hervida, frita o asada) pero también, actualmente ya están disponibles algunos productos a base de batata como:

- harina, otorgando un diferenciador beneficioso al permitir la fabricación de panes sin gluten o elaboración de pastas. Bajo esta matriz se han desarrollado fermentaciones para evaluar un mejor desempeño de producto final en fabricación de pasta (Neri, 2016; Neti et al., 2014).
- licores a partir de procesos de fermentación y destilación junto a otros cereales como arroz y cebada, obteniendo aguardiente o alcohol blanco conocido como Shochu, siendo procesos de experimentaciones no tan antiguos en algunos países y en otros como Japón, representando una bebida espirituosa tradicional (Andrade et al., 2009; Ferrari et al., 2020).

- Jaleas, refrescos, mermeladas y compotas, principalmente en India. Algunas formulaciones de compotas se han elaborado con el fin de determinar polifenoles y su capacidad antioxidante teniendo en cuenta la aceptabilidad sensorial de este producto (Mukhopadhyay et al., 2011; Caldas, 2020).

También se ha encontrado que es materia prima para obtención de productos fuera de la línea de alimentos como producción de almidón, papel, cosméticos y glucosa (Mukhopadhyay et al., 2011).

2.2. Fermentación.

Podemos definir la fermentación de forma conceptual como: *“proceso bioquímico que tiene lugar cuando los microorganismos presentes en un alimento usan como sustratos orgánicos, para sus procesos metabólicos específicos, algunas de las estructuras que integran la composición química de ese alimento”* (Bello, 2013).

También se puede definir como un proceso tecnológico que aporta diversos beneficios tales como (Andreu, M. & Saavedra-Coutado, C., 2022) :

- (1) Sostenibilidad, por la facilidad de los procesos y menores costes energéticos, promoción de la seguridad alimentaria e incremento de vida útil al desarrollar un descenso de pH y producción de péptidos antimicrobianos que actúan como protectores frente a crecimiento de patógenos
- (2) Transformación organoléptica, al mejorar y ofrecer una diversa intensidad de sabores, aromas y texturas que generan nuevas experiencias
- (3) Funcionalidad, en efectos positivos sobre la salud mejorando la digestibilidad y favoreciendo la microbiota, este último beneficio lo convierte actualmente en un proceso muy atractivo para lograr productos que satisfagan el nivel de exigencia de los consumidores.

Existen dos maneras de fermentar un alimento: de forma espontánea, que sucede por sí sola con la microbiota presente de forma natural en el alimento, o bien por fermentación inducida, usando cultivos iniciadores que han sido previamente seleccionados con el fin de obtener un resultado particular (Pizard, 2022).

La fermentación espontánea es un sistema dinámico que permite la obtención de sabores y aromas únicos, haciéndolo un proceso llamativo. A nivel industrial es un foco de interés dado que de este se pueden aislar microorganismos que generen características industrialmente relevantes y diferenciadoras. Los microorganismos relacionados en este tipo de fermentaciones vienen generalmente de las materias primas, equipos o ambientes de proceso, donde ha sobrevivido a diferentes circunstancias ambientales y compite por mantenerse dentro de una comunidad microbiana (Mudoor Soorsh et al., 2023).

Por otra parte, lo comúnmente usado en la industria son cultivos iniciadores ya definidos y no necesariamente propios de la matriz alimentaria, los cuales permiten el desarrollo de características deseables previamente obtenidas y estandarizadas como es el caso del proceso cervecero industrializado.

En relación a la batata, fuera de fermentación y destilación para obtención de alcohol, se encuentran algunos estudios sobre procesos fermentativos inducidos, basados en uso de bacterias ácido lácticas, queriendo lograr una biotransformación del vegetal con la finalidad de resaltar, mejorar y preservar las cualidades que funcionalmente este alimento aporta de forma beneficiosa a los seres humanos (Chintha et al., 2021).

Otro estudio a partir de trozos de batata fermentados con cultivo mixto iniciador compuesto de *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* frente a un control con fermentación espontánea, mostró que esta última presentó menor recuento de bacterias ácido lácticas, evidenciando igualmente la obtención de ácido láctico directamente proporcional al recuento; en ambos casos la firmeza de la verdura va disminuyendo con el paso de los días de fermentación (Neti, 2013).

2.2.1. Técnica de fermentación tipo brining.

Se basa en el uso de un medio salino, siendo este uno de los métodos más antiguos de conservación que aún sigue vigente por su alta efectividad, bajo costo y fácil desarrollo de determinados microorganismos beneficiosos.

La concentración de sal comúnmente usada se encuentra en un amplio rango dependiendo del alimento a fermentar, encontrando registros de uso de salmuera desde 2-3% de NaCl para la col, hasta 4-7% en aceitunas verdes. La selección de una u otra concentración también depende, en gran medida, de la tendencia del producto a sufrir ablandamiento durante su permanencia en salmuera, lo que se origina por las enzimas pectinolíticas de origen microbiano o provenientes del propio vegetal. Dicho grado de concentración en salmuera es un parámetro que va definido con la textura que se quiera lograr (Montaño, A., De Castro, A., & Rejano, L, 1992).

2.3. Cultivos iniciadores.

Son consorcios microbianos que permiten la obtención de características puntuales tras su uso en los procesos fermentativos inducidos.

A la hora de su formulación se recomienda la inclusión de parte de la microbiota propia de vegetales ya que los cultivos autóctonos pueden garantizar una vida útil prolongada y propiedades nutricionales, reológicas y sensoriales específicas. Por tal razón, es fundamental conocer y caracterizar la microbiología de la matriz alimentaria antes de cualquier montaje (Di Cagno et al., 2013).

2.4. Probióticos.

La palabra probiótico es un término en auge que significa “a favor de la vida” y es usada para catalogar a los microorganismos que ejercen beneficios sobre los

seres humanos y animales. Requieren de disponibilidad de carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y el control de variables como la temperatura para su rápido crecimiento.

Existen diversos tipos de probióticos como bacterias o levaduras los cuales cumplen con características para ejercer su efecto probiótico como (Bautista, S. & Escobar, K., 2023):

- Ser resistentes a medios ácidos y la bilis.
- Poseer una alta supervivencia y rápida multiplicación en el tracto digestivo
- No ser patógenos para el hospedador
- Tener una alta capacidad de adhesión a las superficies epiteliales
- Soportar el estrés durante la producción, procesamiento y distribución de los alimentos de manera que lleguen viables al intestino de los seres vivos.

En principio, cualquier componente de la microbiota de los organismos podría contemplarse como opción para catalogarse como probiótico siempre y cuando cumplan con lo descrito anteriormente. Sin embargo, en la práctica se han establecido al momento dos grupos microbianos por ser los únicos dentro de la microbiota colonizadora de mucosas como inoocuos bajo cualquier circunstancia y son: los lactobacilos y las bifidobacterias, por ello son reconocidos como organismos Generally Regarded As Safe (GRAS) y Qualified Presumption of Safety (QPS) por la FDA y la EFSA siendo las principales bacterias usadas en los alimentos (Pérez & Trinidad, 2022).

Genero *Lactobacillus*:

Bacterias de forma bacilar que, en condiciones puntuales pueden parecer cocos, catalasa negativo y no formadoras de esporas; comúnmente conocidas por producir ácido láctico como metabolito primario. Se encuentran principalmente en medios con alto contenido de carbohidratos.

Genero *Bifidobacterium*:

Son bacterias Gram positivas, catalogadas como pleomórficas, pero mayormente de forma bacilar, catalasa negativo y la mayoría de cepas anaerobias estrictas con algunas aerotolerantes, no forman esporas

Ambos géneros anteriormente descritos pertenecen al grupo de Bacterias ácido-lácticas (BAL).

2.5. Péptidos antimicrobianos.

Son una familia de sustancias peptídicas o polipeptídicas con un amplio espectro de actividad antimicrobiana (“antibacteriana, antifúngica, antiviral e incluso, en algunos casos antitumoral”) y múltiples mecanismos de acción como interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos o reclutamiento y promoción de otros elementos de la inmunidad. Estos péptidos son desarrollados por diversos organismos desde los procariotas con las bacteriocinas hasta los eucariotas vertebrados (Bulet et al., 2004; Téllez & Castaño, 2010)

La gran diversidad y producción de péptidos antimicrobianos no solo se debe a que son producidos por diferentes tipos de células, sino a su variada estructura química y composición. Se puede hablar de una evolución de estas sustancias dada la interacción de cada especie con su ambiente y patógenos específicos, obligando a mejorar sus mecanismos de acción por presión selectiva (Téllez & Castaño, 2010).

Las bacteriocinas, son sustancias biológicamente activas, sintetizadas por bacterias que pueden actuar como bactericidas o bacteriostáticos frente a otros microorganismos. Son compuestos creados en el ribosoma, resultantes del metabolismo secundario de ciertas bacterias y son de gran interés dado que presentan un amplio potencial como bioconservador, principalmente en los alimentos mínimamente procesados (Kumarinya et al., 2019; Favaro, 2015).

El reciente estudio de estos péptidos ha demostrado su potencial para mejorar la calidad microbiológica de distintos tipos de alimentos y prolongar la vida útil

de los productos, por lo que resultan ser alternativa a tener en cuenta en los procesos de producción, por otro lado, se perfilan como una opción que puede responder al interés de los consumidores por alimentos inocuos con conservantes naturales (García & Guerrero, 2023).

Las bacteriocinas que han sido principalmente estudiadas en la industria alimentaria, son las producidas por las BAL dado que, además de ser comúnmente empleadas en el procesamiento de alimentos por su gran contribución al sabor, textura, valor nutricional de las matrices alimentarias tienen el estatus de GRAS (Castellanos et al., 2022).

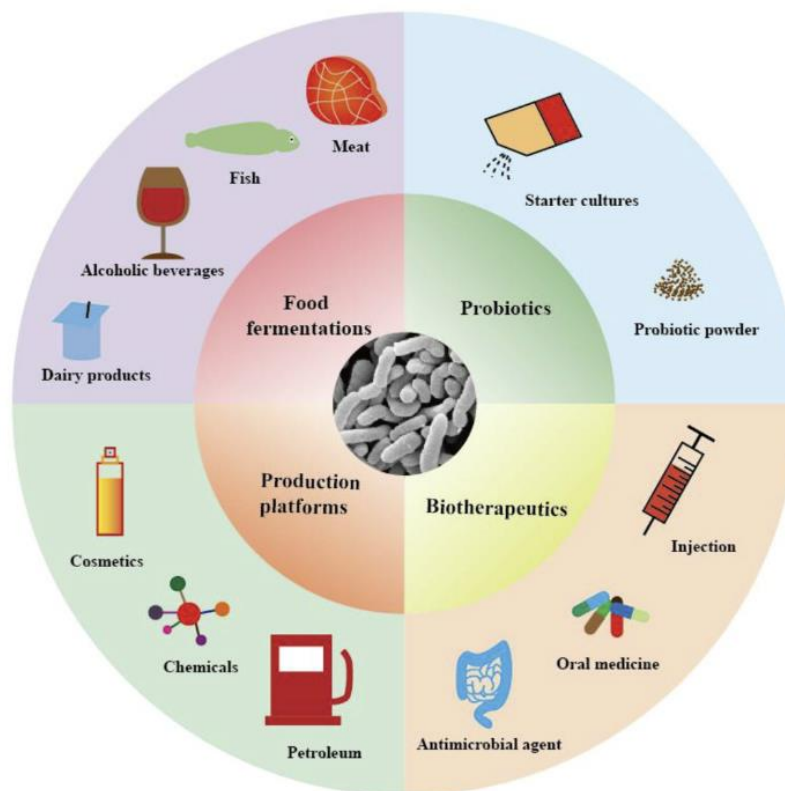
2.6. Bacterias ácido lácticas.

Las BAL, son microorganismos grampositivos, catalasa y oxidasa negativas y exigentes respecto a los requisitos nutritivos. La proliferación mejora considerablemente con condiciones micro aeróbicas, aunque en términos generales tienen una proliferación lenta y unas colonias de menor tamaño que otros microorganismos. Pueden crecer en medios no selectivos con una incubación prolongada.

Estos microorganismos tienen diversas aplicaciones estudiadas y usadas a nivel industrial (Figura 1)(Wang et al., 2022).

Teniendo en cuenta sus características fermentativas y productos finales, estas se agrupan como (Ramírez et al., 2011).

- Homofermentadoras: Poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de la glucosa. Ejemplos de este grupo se tienen especies de *Streptococcus*, *Pediococcus* y algunos *Lactobacillus*.
- Heterofermentadoras: consideradas las bacterias capaces de convertir hexosas a pentosas produciendo tras la fermentación además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos como acetato, etanol y CO₂. Dentro de este grupo se tienen las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus*.



Fuente (Wang et al., 2022).⁴

Figura 1 Aplicación industrial de bacterias ácido-lácticas.

En los procesos fermentativos su función es convertir los azúcares libres en ácido láctico, lo que genera la acidificación rápidamente de la matriz alimentaria proporcionando seguridad microbiana y extensión de vida útil.

⁴ Figura tomada de: Wang, Y., Zhang, C., Liu, F., Jin, Z. & Xia, X. . (2022). Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi:10.1080/10408398.2021.2025035

1. OBJETIVOS

El presente trabajo pretende hacer un análisis de la fermentación de la batata por método espontáneo realizando:

- Mediciones de parámetros fisicoquímicos como acidez total, pH y materia seca soluble.
- Valoración microbiológica buscando aislar los microorganismos que generan este proceso de manera natural y evaluar posibles beneficios de su metabolismo con la producción de moléculas antimicrobianas.
- Análisis sensorial descriptivo y hedónico de la batata fermentada en distintos estadios.

Finalmente, establecer la relación de los diferentes parámetros y un primer acercamiento a las posibles condiciones más favorables para generar una fermentación con cultivo iniciador.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

A continuación, se describen los materiales y equipos usados para cada etapa y los métodos empleados consignados en 3 fases de experimentación.

2.1. Proceso de fermentación:

- Batata adquirida en los supermercados de cadena en Sevilla (origen: España).
- Sal común de mesa
- Agua potable, no embotellada.
- Cortador y rallador de cocina
- Olla de acero inoxidable
- Recipientes de vidrio formato 125 ml con tapas Twist Off O66.
- Incubadoras de 20, 28 y 30 °C
- Autoclave

2.2. Análisis fisicoquímicos:

- Determinación del pH: se empleó el pH-metro digital de bolsillo Milwaukee pH 600, con un rango entre 0.0 - 14.0 pH, una precisión de ± 0.1 pH y una calibración manual usando patrones a pH 4 y pH 7 y vaso de precipitado de 100ml.
- Determinación de la acidez total por valoración: se empleó solución de NaOH a 0.5 M, fenolftaleína como indicador, pipeta Pasteur, bureta y vaso de precipitado.
- Determinación de la masa seca soluble: se utilizó el refractómetro manual ATAGO (escala 0-32 ° Brix, precisión 0,5° Brix) y pipeta Pasteur.

2.3. Análisis microbiológicos

- Diluciones, siembra en superficie y conteo: se requirió eppendorfs, gradillas, micropipetas de 100µL, asa, medios agar LS diferencial (SIGMA ALDRICH) y MRS (Thermo Scientific™ Oxoid™), bolas de cristal estériles, jarra de anaerobiosis, sobres de AnaeroGen 2.5L (Thermo Scientific™), mechero, cámara para siembra y contador de colonias (LBX CC100 Colony Counter).
- Tinción de gram: se empleó asa de siembra, mechero, agua destilada, colorantes de tinción Gram (cristal violeta, lugol, alcohol, safranina), varillas de tinción, portaobjetos y microscopio óptico.
- Pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa: se usó peróxido de hidrogeno al 30%, portaobjetos, papel filtro, solución al 1% de NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina (TDP) en agua destilada, palillos estériles y micropipeta.
- Péptidos antimicrobianos: Se emplearon medios de agar LS diferencial (SIGMA ALDRICH) y MRS (Thermo Scientific™ Oxoid™), palillos estériles, caldo inoculado con cepas de referencia para uso de laboratorio (*Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella tiphymurium*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) y agar de cobertera (0,6%).

2.4. Montaje de cultivo iniciador:

Se empleó solución salina al 1,5% estéril, placas con microorganismos previamente aislados y seleccionados, eppendorfs, gradillas, asa de siembra, mechero, vortex, campana para siembra, espectrofotómetro y cubetas estériles de lectura.

2.5. PCR y electroforesis.

Se empleó eppendorfs, micropipeta, puntas estériles, agua estéril, plancha de calentamiento para lisis, vortex, centrifuga (Thermo SCIENTIFIC), Kit de PCR (MM, primer Forward y Primer Reverso) y equipo de amplificación BIORAD.

Gel de agarosa, bromuro de etidio, equipo Mupid-one advance.

2.6. Métodos:

2.6.1. Fase 1.

- **Montaje para la fermentacion espontanea inicial.**

Se realizó la preparación de la salmuera al 1,5% y 3% de NaCl (dosificaron 15 g y 30 g de sal por cada litro de agua potable correspondientemente y se mezcló hasta disolverse).

Se lavo la batata retirando residuos de tierra visibles; se secó con toalla desechable y se cortó en trozos de 3 cm de largo y 0,5 cm de diámetro aproximadamente; se introdujeron los trozos de batata hasta alcanzar un peso de 95 g en cada frasco y se añadió la salmuera (170 ml), quedando un espacio de cabeza de 2,5 cm aproximadamente.

Se realizó la medición de pH inicial a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron muestras por duplicado de batata en salmuera de 1,5 y 3% en temperaturas de 20 y 28°C durante 69 horas. Una vez transcurrió el tiempo de incubacion se procedió a retirar los frascos de las cámaras de incubación y realizar analisis fisicoquimicos y microbiológicos a la salmuera, activamente fermentada.

- **Medición de pH:** se realizó mediante el uso del potenciómetro sumergiéndose en una alícuota previamente homogeneizada y agitándose dentro de la misma hasta encontrar un valor estable.
- **Medición de los sólidos solubles (°Brix):** usando el refractómetro, se dispensó muestra con ayuda de una pipeta Pasteur, de 3 a 5 gotas hasta cubrir el prisma principal, se bajó la cubierta y se realizó lectura por el lente con dirección a una fuente de luz y enfocando para definir la medida en la escala.

- Acidez valorable (acidez total): se realizó una valoración a 20 ml de muestra con NaOH 0.5M determinando su punto final con fenolftaleína como indicador de color. Se realizaron los cálculos aplicando la siguiente ecuación:

$$Acidez\ total = \frac{M * V_{NaOH}}{V_{Mtra}}$$

M= Concentración molar de solución tituable de NaOH.

V_{NaOH} = Volumen en litros de NaOH gastado en la titulación de la muestra

V_{Mtra} = Volumen en litros de muestra titulada.

- Recuento de microorganismos en placa: se realizó el método tradicional de diluciones microbiológicas seriadas a partir de una alícuota representativa de la salmuera fermentada y posterior siembra en superficie, transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo con ayuda del contador de colonias y a partir de las placas que muestran un crecimiento entre 30 y 300 colonias se realiza un promedio para obtener las UFC relacionadas a la dilución.
- Aislamiento de colonias: se tomó con asa estéril biomasa a partir de las placas de recuento seleccionadas, se ubicó en un área periférica de la placa Petri con medio de cultivo MRS y LS estéril y por medio de la técnica de siembra por agotamiento y flameando el asa en los intermedios se obtuvieron colonias aisladas al final de las estrías.
- Tinción de Gram: se realizó siguiendo la técnica básica de esta tinción microbiológica así, se extendió la muestra a analizar sobre el portaobjetos en una gota de agua destilada, se esperó que seicara y se fijó con calor. Se procedió a la aplicación de cristal violeta (2min), lugol (1min), alcohol (30seg) y safranina (2min), realizando lavados con agua en los intermedios de cada sustancia. Se dejó secar el portaobjetos y se observó

al microscopio catalogando Gram positivos los microorganismos color violeta y Gram negativos los microorganismos color rosa.

- Oxidasa: En cámara de siembra se tomó, con ayuda de un palillo estéril parte de la colonia a evaluar crecida previamente en medio sólido, se colocó sobre un trozo de papel de filtro en un portaobjetos. Se agregaron unas gotas del reactivo de TPD (NNN'N', tetrametil, 1-4 fenilendiamina) sobre la colonia hasta impregnar totalmente el papel de filtro. La aparición de un color morado sobre la muestra durante los primeros segundos se considera como una prueba positiva
- Catalasa. En cámara de siembra se tomó, con ayuda de un palillo estéril, parte de la colonia a evaluar crecida previamente en medio sólido y se colocó sobre un portaobjetos y se agregaron unas gotas de peróxido de hidrógeno (3%) sobre la biomasa. La prueba positiva se manifiesta por la formación de burbujas debido a la descomposición del H_2O_2 .

2.6.2. Fase 2.

- **Montaje de fermentación espontánea con variables controladas.**

Partiendo de los resultados experimentales de la fase 1 se estableció realizar la fermentación desde una preparación de mezcla madre con concentración de salmuera de 1,5% de NaCl e incubación a 30°C, así:

Se realizó la preparación de la salmuera al 1,5% de NaCl (se dosificaron 15 g de sal por cada litro de agua potable y se mezcló hasta disolverse).

Se lavó la batata con agua y se realizó acción mecánica minuciosamente con ayuda de una esponja nueva con el fin de retirar residuos de tierra entre otros; se secó con toalla desechable y se cortó en trozos de 3 cm de largo por 0,5 cm de diámetro aproximadamente; se realizó la preparación madre en una olla de acero inoxidable previamente higienizada, se homogeneizó la mezcla y se dispensó uniformemente en peso los trozos de batata y la salmuera en 5 frascos previamente esterilizados dejando un espacio de cabeza de 1 cm (justo el cuello

del recipiente) con el fin de desfavorecer el crecimiento de microorganismos aerobios.

Se realizó medición de pH y acidez inicial a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron los cinco frascos a 30 °C y se fue retirando uno por día realizando las correspondientes mediciones de pH, acidez total, sólidos solubles y conteo microbiológico.



Figura 2 Montaje fermentación, Fase 2.

- **Evaluación de Péptidos antimicrobianos**

Para la evaluación de péptidos antimicrobianos se realizó por dos métodos.

1. Previo crecimiento de bacterias a evaluar: Se realizó siembra en medios MRS y LS teniendo en cuenta el medio de procedencia de crecimiento inicial de los microorganismos. Transcurridas 24 horas de incubación a 30 °C y tras observar crecimiento de colonia se dispuso la cobertera inoculada con 20 µL de *E. coli* y se incubó nuevamente 24 horas a 30 °C.
2. Inoculación de bacterias a evaluar y puesta de cobertera inoculada con 20 µL de *E. coli* el mismo día y se procedió a incubar durante 24 horas a 30 °C.

Teniendo en cuenta un mejor resultado usando el método 1, se procedió a replicar con coberteras inoculadas con: *E. fecalis*, *E. cloacae*, *S. tiphymurium*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*

- **Comparativo de crecimiento entre temperaturas de 28 °C y 30 °C de incubación.**

Se realizó siembra de las colonias seleccionadas de fase 1 y 2 identificadas en agar LS y en agar MRS, se incubaron durante 48 horas en cámara de anaerobiosis y en las temperaturas a evaluar.

- **PCR y electroforesis.**

A partir de las colonias aisladas se realizó lisis celular para obtención de ADN, se procedió a realizar montaje de PCR y posterior amplificación.

Para comprobar que la PCR se había desarrollado adecuadamente se procedió a realizar la electroforesis en gel de agarosa esperando un tamaño de banda de 1500 pb dados los cebadores usados.

2.6.3. Fase 3

- **Preparación de inóculo:**

Para el desarrollo del cultivo iniciador específico para la batata, se seleccionaron y agruparon los microorganismos de entre los aislados en fase 1 y 2 con características morfológicas y bioquímicas similares.

Se preparó la dilución en salmuera estéril de cada microorganismo a una densidad óptica alrededor de 0,5 a 650 nm y se realizó el montaje de 5 consorcios con 100 µL de cada dilución de microorganismos (Figura 2).

- **Montaje de fermentación con cultivo starter.**

Se realizó la preparación de la salmuera al 1,5% de NaCl dosificando 15 g de sal por cada litro de agua potable, se homogeneizó y se sometió a proceso de esterilización.

Se lavo, retiró la corteza y cortó la batata en trozos de 3 cm de largo por 0,5 cm de diámetro aproximadamente y se reservó en una olla de acero inoxidable previamente higienizada; en campana se dosificaron 148g de batata cortada en cada frasco previamente esterilizado y se añadió a cada uno la salmuera estéril cubriendo completamente la batata dejando aproximadamente 1 cm de espacio de cabeza. Para la incorporación del cultivo iniciador se valoró la metodología de inoculación directa dado que el consorcio fue preparado en salmuera estéril, posteriormente se homogeneizó e incubó a 30 °C.

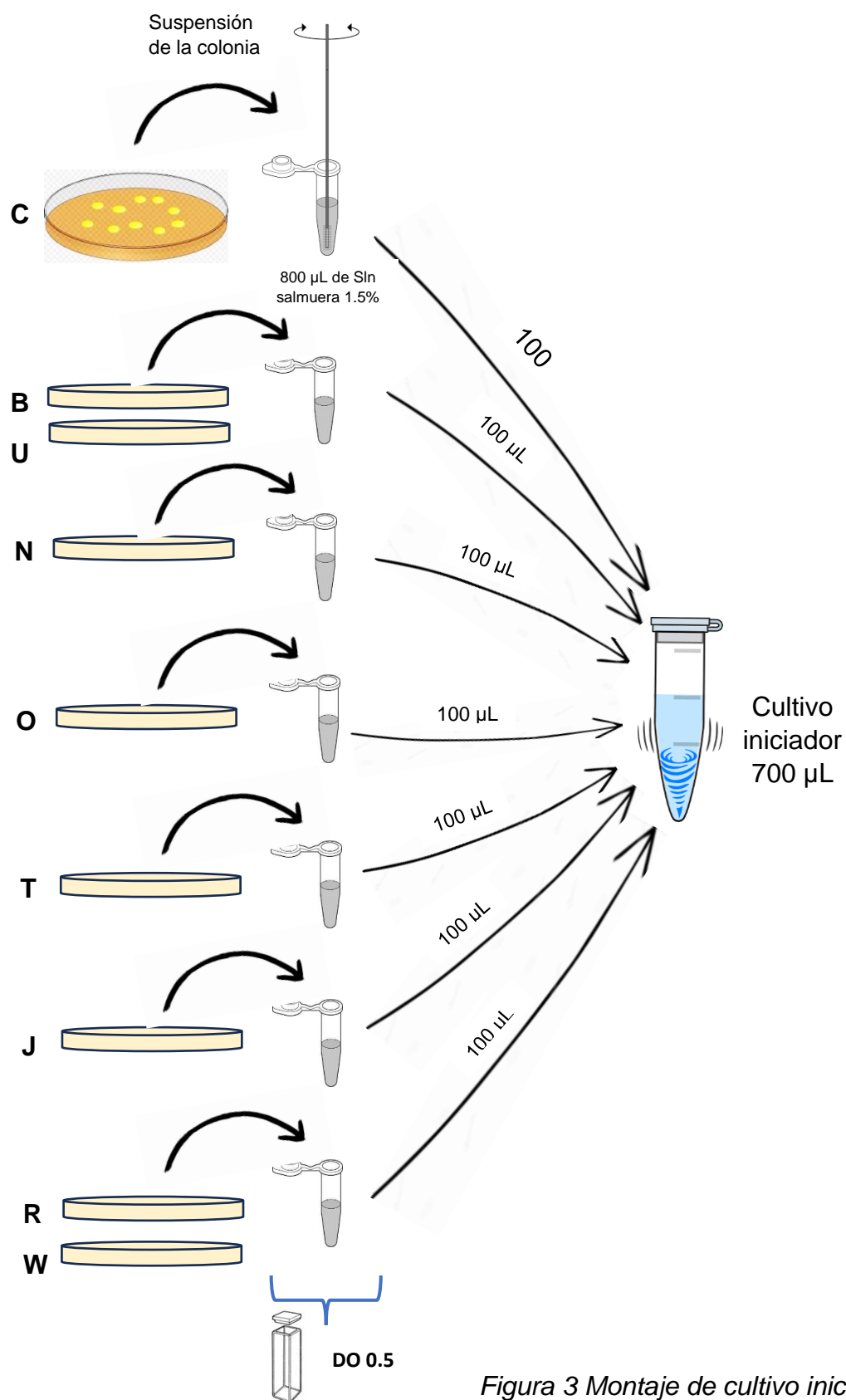


Figura 3 Montaje de cultivo iniciador.

3. RESULTADOS.

3.1. Fase 1.

Transcurridas las 69 horas de incubación se procedió a evaluar la fermentación, se evidenció crecimiento de mohos en algunos frascos incubados en ambas temperaturas y cuya concentración de salmuera era 3%, presentando un olor a tierra intenso, por el contrario los que no presentaron este crecimiento de mohos desarrollaron únicamente un olor afrutado con notas ácidas agradables principalmente, en cuya salmuera era 1,5% de concentración.

A partir de esta apreciación se seleccionaron los frascos sin crecimiento de moho y se procedió a homogeneizar para realizar mediciones de pH, acidez total y sólidos solubles, obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 2. Se tomó una alícuota representativa de cada frasco como suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico hasta 10^{-6} efectuando su respectiva siembra en superficie en agar MRS y LS, posteriormente se incubaron en cámara de anaerobiosis durante 72 horas y se realizó el conteo (Tabla 3).

Tiempo (horas)	Temperatura (°C)	Concentración de Salmuera (%)	pH (upH)	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez Total (mol/L)
0	ambiente	1,5	7,8	-	-
		3	7,5	-	-
68	20	1,5	5	2,5	-
		3	5	3,5	-
	28	1,5	4	4	-
		3	3,5	4,5	-
140	20	1,5	4	4	0,26
		3	3,8	5	0,31
	28	1,5	3,6	4	0,4
		3	3,4	4,5	0,43

Tabla 2 Resultados de análisis físico- químicos en fermentación, Fase 1.

Temperatura de incubación (°C)	[NaCl]	Crecimiento en Medio de cultivo LS Diferencial (UFC/ml)	Crecimiento Medio de cultivo MRS (UFC/ml)
20	1,5	2,4 x 10 E9	3,2 x 10 E8
	3	2,2 x 10 E9	3,0 x 10 E8
28	1,5	6,4 x 10 E9	5,1 x 10 E9
	3	5,5 x 10 E8	3,7 x 10 E8

Tabla 3 Conteo microbiológico a 69 horas de incubación, Fase 1.

A partir de las colonias obtenidas tras las diluciones para el conteo en placa se realizó un aislamiento de 17 microorganismos usando técnicas de microbiología clásica teniendo en cuenta su medio de procedencia, tras de su incubación se realizó la evaluación morfológica macro y microscópica junto con pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa para lograr una clasificación inicial, los resultados se consignan en la tabla 4 donde se asigna una codificación para manejo interno, guardar trazabilidad, conservación y continuar con su estudio.

T de incubación	[NaCl]	Medio de cultivo	Id. interna	Morfología de colonia	Morfología microscopia en 100x	Prueba de catalasa	Prueba de Oxidasa
28	1,5	LS	A	Circular, rosa claro y borde blanco, brillante y convexa y borde entero.	Bacilos gram positivos	+	-
			B	Punteada, rosa brillante, plana y borde entero.	Bacilos gram positivos, dispuestos en pares.	-	-
	3		C	Forma irregular rosa con borde claro	Bacilos gram positivos	-	-

				brillante, elevada.			
			D	Circular, rosa claro y borde blanco, brillante y convexa y borde entero.	Bacilos gram positivos	+	-
			E	Punteada, rosa brillante, plana y borde entero.	Bacilos gram positivos	-	-
20	1,5	MRS	F	Punteada, rosa brillante, plana y borde entero.	Cocos gram Positivos	-	-
			G	Circular, Rosa intenso brillante, lisa y de borde Traslucido a blanco.	Bacilos gram negativos	+	-
	3		H	Punteada, rosa brillante, plana y borde entero.	Cocos gram positivos	-	-
			I	Circular, Rosa intenso brillante, lisa y de borde Traslucido a blanco.	Bacilos gram negativos	+	-
			J	Forma rizoide, café claro, opaca, prominente, superficie rugosa y borde rizoide.	Bacterias filamentosas , gram positivas	+	-
28	1,5	MRS	K	Mediana circular, color crema brillante, mucosa, convexa y de borde entero.	Bacilos gram positivos	-	-
			L	Mediana circular color Blanco, plana, opaca	Bacilos gram positivos	+	-

	3		y de borde entero.			
		M	Forma rizoide, café claro, opaca, prominente, superficie rugosa y borde rizoide.	Bacilos gram positivos, observados en 100x	+	-
		N	Mediana circular, color crema brillante, mucosa, convexa y de borde entero.	Coco-Bacilos gram positivos.	-	-
		O	Mediana circular color Blanco, concentrica, opaca y de borde entero.	Bacilos gram positivos.	+	-
	20	1,5	P	Punteada y brillante.	Coco gram positivos.	-
	3	Q	Punteada y brillante	Coco gram positivos.	-	-

Tabla 4 Descripción de las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos aislados en Fase 1

Teniendo en cuenta la caracterización fenotípica mediante cultivo en placa, tinción de gram y resultado de pruebas bioquímicas se agruparon los microorganismos con presunta similitud así: A-D, B-E, C, F-H, G-I, J-M, K-N, L-O y P-Q.

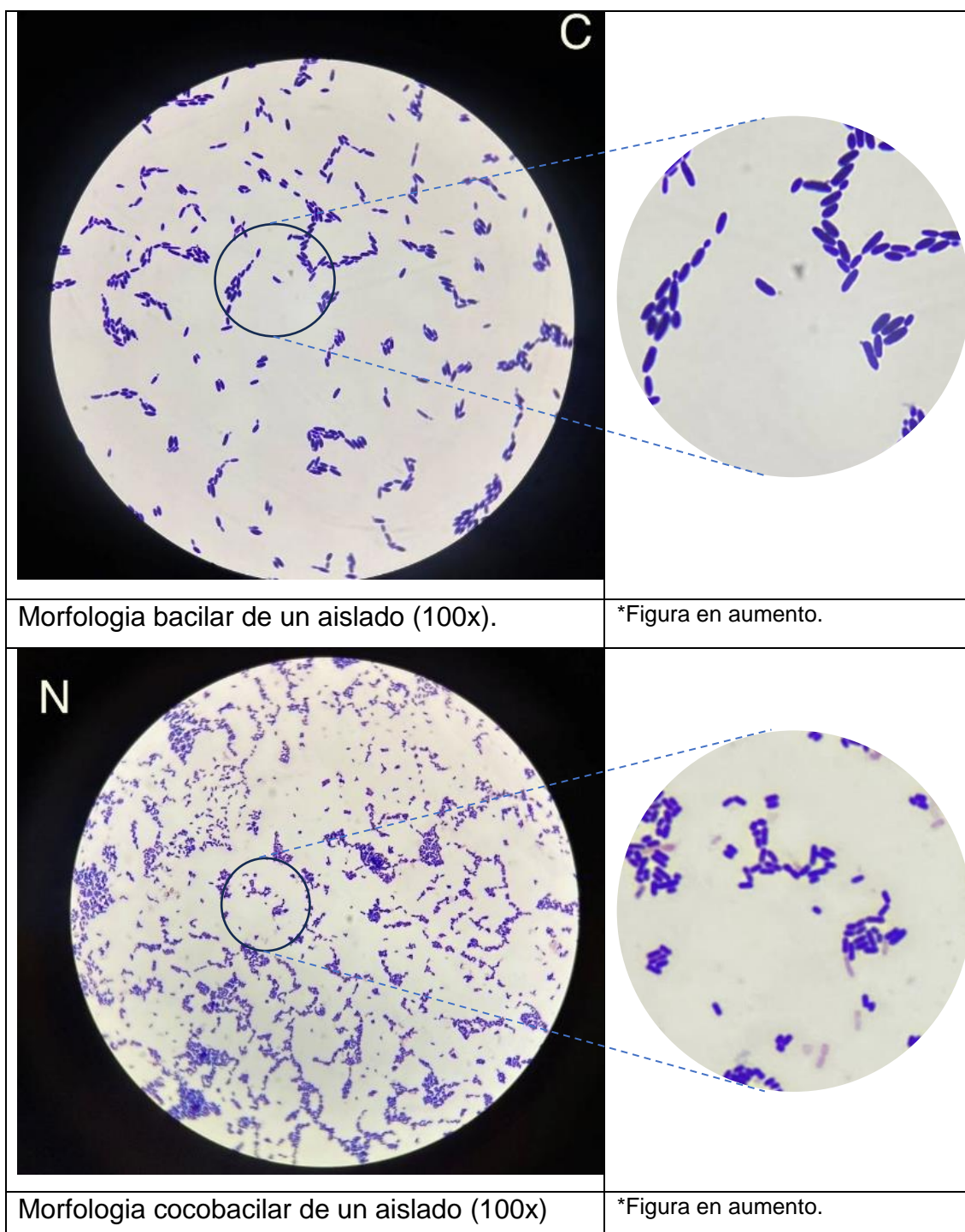


Figura 4 Tinción de Gram de algunas colonias aisladas.

3.2. Fase 2.

A partir de los resultados de la fase 1, al percibirse los mismos aromas y ausencia de crecimiento de mohos ambientales con la combinación de variables de temperatura a 28°C y salmuera al 1,5% de concentración, se realizó montaje de

la fermentación estableciendo estos parámetros. Para contribuir en la homogeneidad de la ecología microbiana se parte de una preparación madre. Se dosificó en frascos independientes para realizar un seguimiento poblacional microbiano, evitando interferencia por la manipulación de muestras a la hora de los análisis. Las mediciones día a día arrojaron los siguientes resultados en torno a parámetros físico-químicos y crecimiento microbiológico (Tabla 5).

Tiempo (horas)	pH (upH)	Acidez total (mol/L)	Solidos solubles (°Brix)	UFC/ml en medio:	
				LS	MRS
0	7.3	0.013	1,5	ND	ND
23	5.1	0.055	2	4,5 x 10 E8	1,1 x 10 E6
47	4.0	0.155	2,5	2,7 x 10 E9	1,2 x 10 E8
71	3.8	0.310	4,2	1,8 x 10 E9	2,9 x 10 E8
115	3.7	0.488	4,5	6,6 x 10 E8	3,4 x 10 E8
190	3.5	0.875	4	ND	ND

ND: No determinado.

Tabla 5 Resultado de parámetros físico-químicos y conteo microbiológico durante el proceso de fermentación, Fase2.

La caída de pH, que teóricamente se considera óptima para los procesos fermentativos está alrededor de 4 o menos, este valor se alcanzó en las primeras 48 horas observando a su vez, un aumento de acidez total en la salmuera (Figura 1).

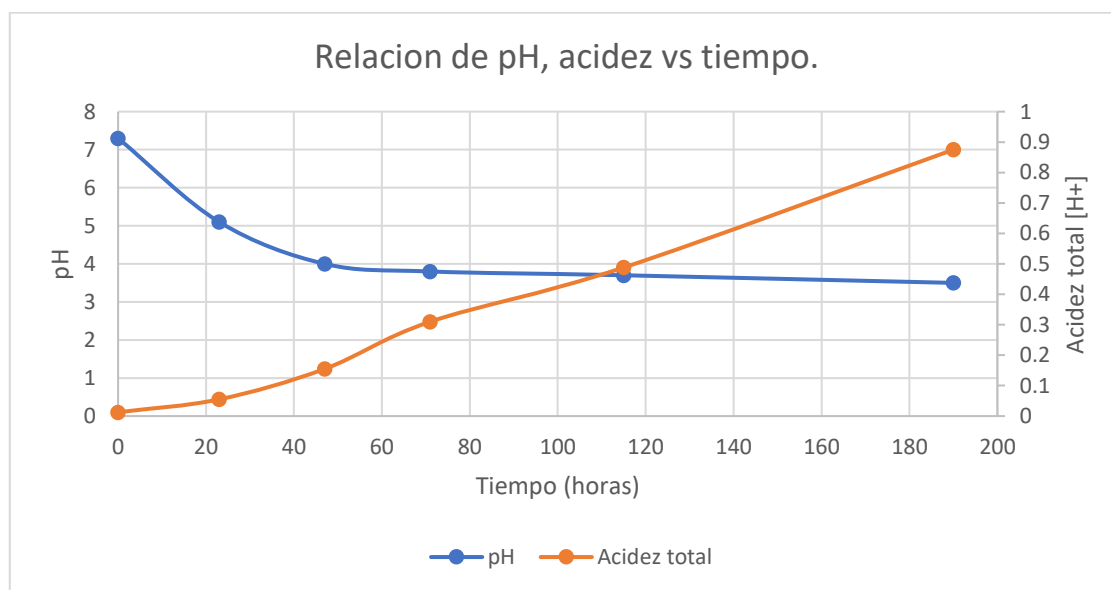


Figura 5 Evaluación del pH y acidez total durante la fermentación. Fase 2.

Las diluciones sembradas en placa Petri para conteo microbiológico fueron incubadas en cámara de anaerobiosis durante 72 horas para ambos medios de cultivo, mostrando un mayor crecimiento en medio LS.

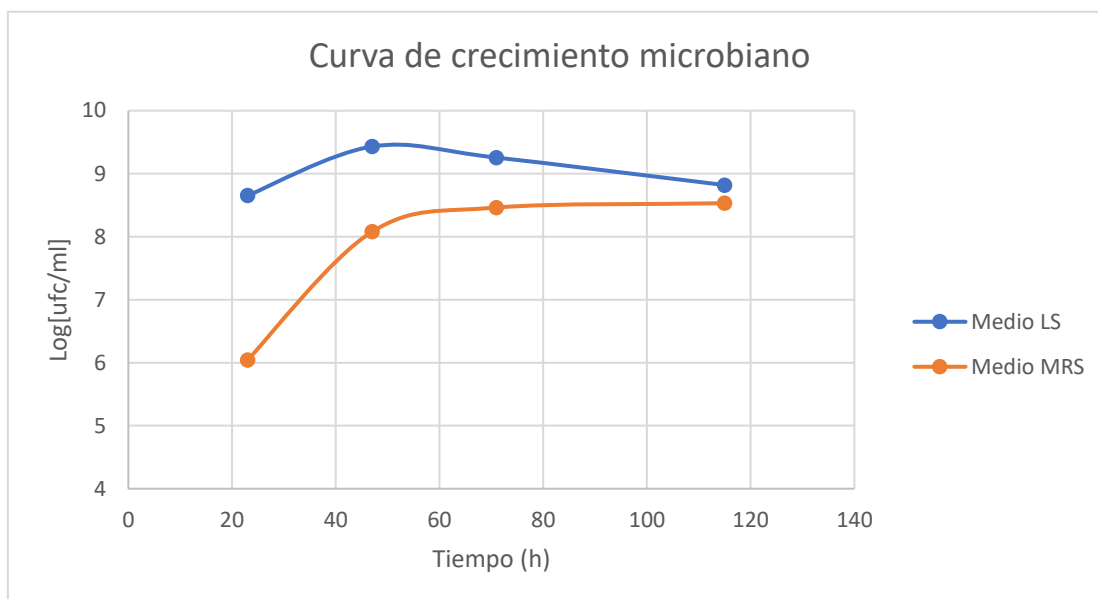


Figura 6 Conteo microbiológico en medio LS Diferencial y MRS durante el proceso fermentativo en fase 2.

A partir del crecimiento obtenido en las diluciones realizadas a las 71 horas de fermentación se aislaron 4 microorganismos para su posterior caracterización fenotípica mediante cultivo en placa, pruebas de catalasa y oxidasa, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 6.

Medio de cultivo	Id. interna	Morfología de colonia	Prueba de catalasa	Prueba de Oxidasa
MRS	R	Mediana circular color crema, convexa, opaca y de borde entero.	+	-
	S	Mediana circular, color crema brillante, mucosa, convexa y de borde entero.	-	-
LS	T	Punteada, color blanco y leve punto rosa central, brillante y de borde entero	Débil +	-
	U	Punteada, rosa brillante, plana y borde entero.	-	-

Tabla 6 Caracterización fenotípica de microorganismos aislados en 71 horas de fermentación, Fase 2.

A las 71 horas del proceso de fermentación se observa en los frascos la formación de una capa blanca superficial siendo más consistente en los recipientes que no han sido abiertos ni homogenizados previamente para análisis, se realizó montaje al microscopio y siembra directa de dicha película en agar MRS y posteriormente replicas para lograr un mejor aislamiento, desarrollando morfología de colonia mediana, circular, color crema, convexa, opaca y de borde entero propia de levaduras, como se observa en la ilustración 4.

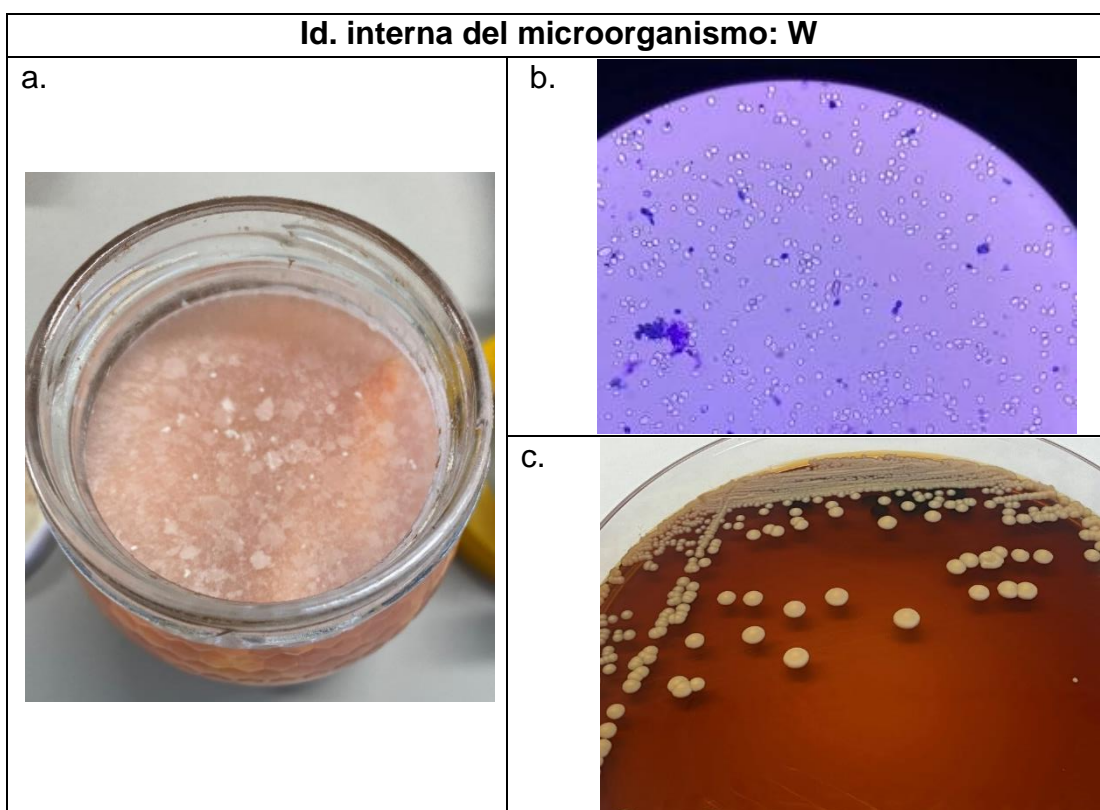


Figura 7 Caracterización microscópica y macroscópica de capa formada en fermentación a 71 horas.

(a.) Capa blanca superficial. (b.) Levaduras en gemación observadas en aumento 40X. (c.) Colonias en medio MRS

3.2.1. Péptidos antimicrobianos

Se realizó el montaje por los dos métodos descritos en la sección 4.5.2 con cobertera inoculada con *E. coli* encontrando un mejor desarrollo y visibilización del halo de inhibición de crecimiento por el método n°2 donde se realiza una

siembra previa del medio con los microorganismos a evaluar e incubación durante 24 horas garantizando un crecimiento antes de dispensar la cobertera inoculada. Así mismo se evidenció un mejor desarrollo de la técnica en el medio LS dado que en MRS no se percibe crecimiento ni inhibición. Los halos de inhibición se observaron tras 48 horas de incubación. Los microorganismos evaluados fueron los siguientes: C, B, F, T, U, O, N, P, R, S y J.

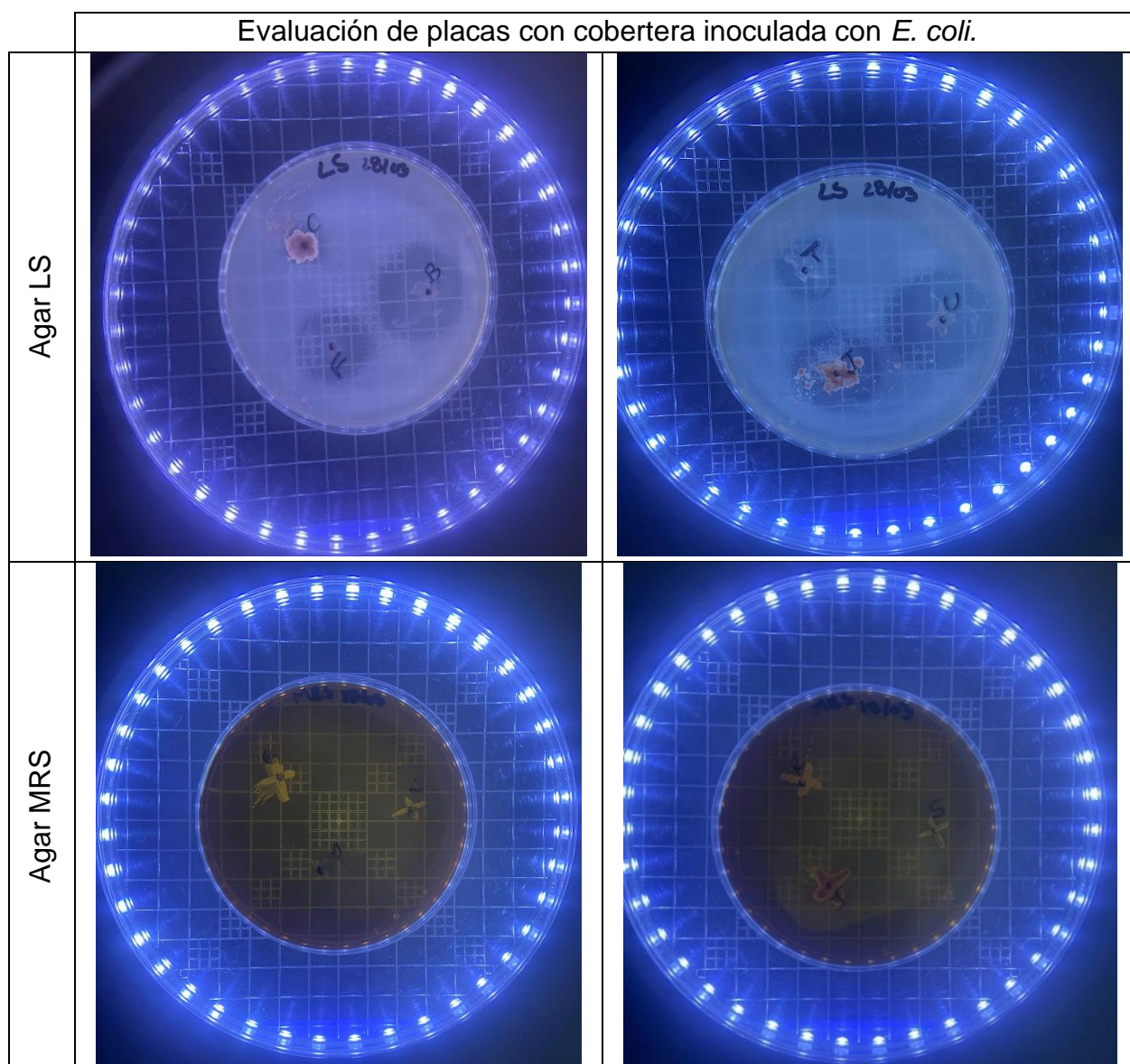


Figura 8 Resultados de evaluación de péptidos antimicrobianos por el método N.º 2 con previo crecimiento, en medios LS y MRS

Partiendo de esto se realizó el mismo montaje únicamente sobre medio LS previamente sembrados con los microorganismos aislados y con coberteras que contenían *E. fecalis*, *E. cloacae*, *S. tiphymurium*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. y se incubaron durante 48 horas.

Se realiza interpretación basada en cuatro criterios de evaluación:

- Inhibición nula (NO)
- Inhibición baja (+) cuando el halo que expresa es menor a 5 mm
- Inhibición media (++) cuando el halo que expresa esta entre 5 mm y 25 mm.
- Inhibición alta (+++) cuando el halo que expresa es mayor a los 25 mm. obteniendo los resultados que se muestran a continuación en la Tabla 7

Inoculo Colonia	<i>E. coli</i>	<i>E. fecalis</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. tiphymurium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
C	+	+	No	+	No	+++	No
B	++	No	No	No	No	No	No
F	++	No	No	No	No	No	No
J	++	No	+	No	No	No	No
T	++	No	No	No	No	No	No
U	++	No	No	No	No	No	No
N	-	No	+	No	No	No	No
O	-	No	No	No	No	No	No
P	-	No	No	No	No	No	No
R	-	+++	No	No	+	No	No
S	-	No	+++	No	No	No	No
W	-	+++	No	No	+	No	No

Tabla 7 Evaluación de producción de péptidos antimicrobianos en microorganismos aislados en fase 1 y fase 2

Las bacterias que presentaron halos de inhibición se percibieron mejor dejando su incubación 48 horas adicionales a las iniciales para un total de 96 horas. Algunos ejemplos de los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 9.

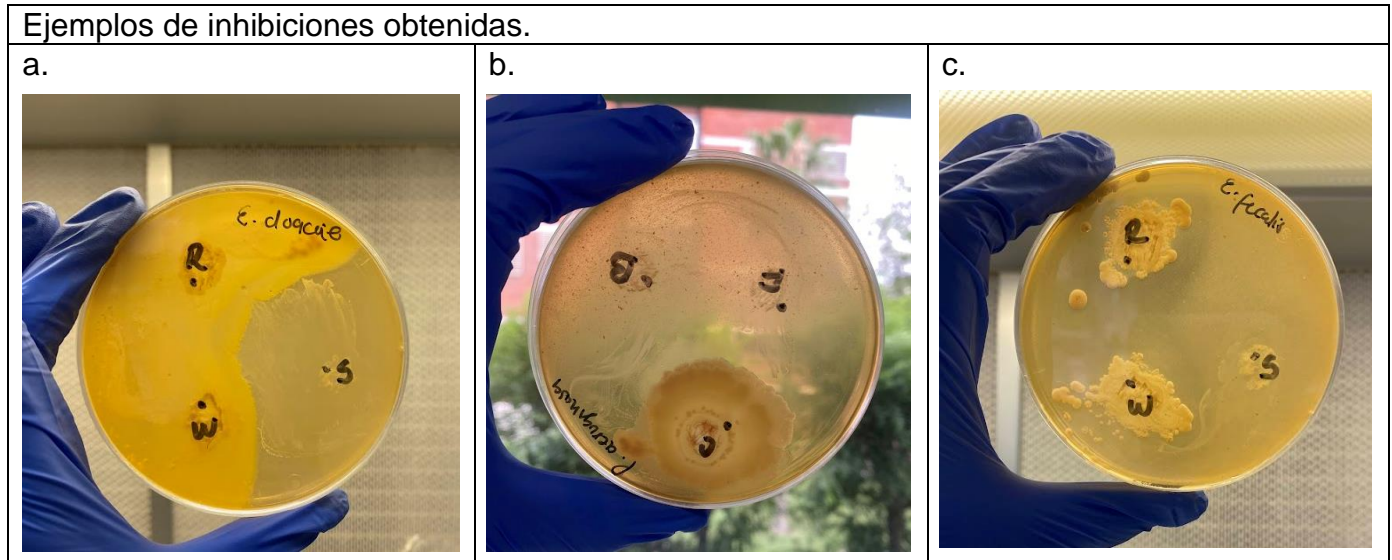


Figura 9 Ejemplos de inhibiciones obtenidas:

a. Cobertera inoculada con *Enterobacter cloacae*, b. Cobertera inoculada con *P. aeruginosa*, c. Cobertera inoculada con *E. fecalis*.

3.2.2. Comparativo de temperatura

Se realizó el análisis comparativo para las colonias identificadas como C, B, F, T, U en agar LS y O, N, P, S y J. en agar MRS. Transcurridas las 48 horas de incubación en cámara de anaerobiosis se realizaron las siguientes observaciones:

- En la lectura de las placas de MRS, no se observó crecimiento de la colonia P para ninguna de las temperaturas, la colonia S no presentó crecimiento a 28°C y tuvo un débil crecimiento a 30°C, para las colonias N, O y P, se observó crecimiento en ambas temperaturas siendo mejor a 28°C.
- En la lectura de las placas de LS, no se observaron diferencias significativas de crecimiento de colonia en términos de velocidad y cantidad de biomasa aparente, sin embargo, se aprecia una diferencia en la aparición de un pigmento rojo como se muestra la figura 9. A 30°C se

observa en todas las colonias tanto en el anverso como reverso de la caja, una mayor concentración de pigmentos a excepción de la colonia C, que desarrolló mayor pigmentación a 28°C.

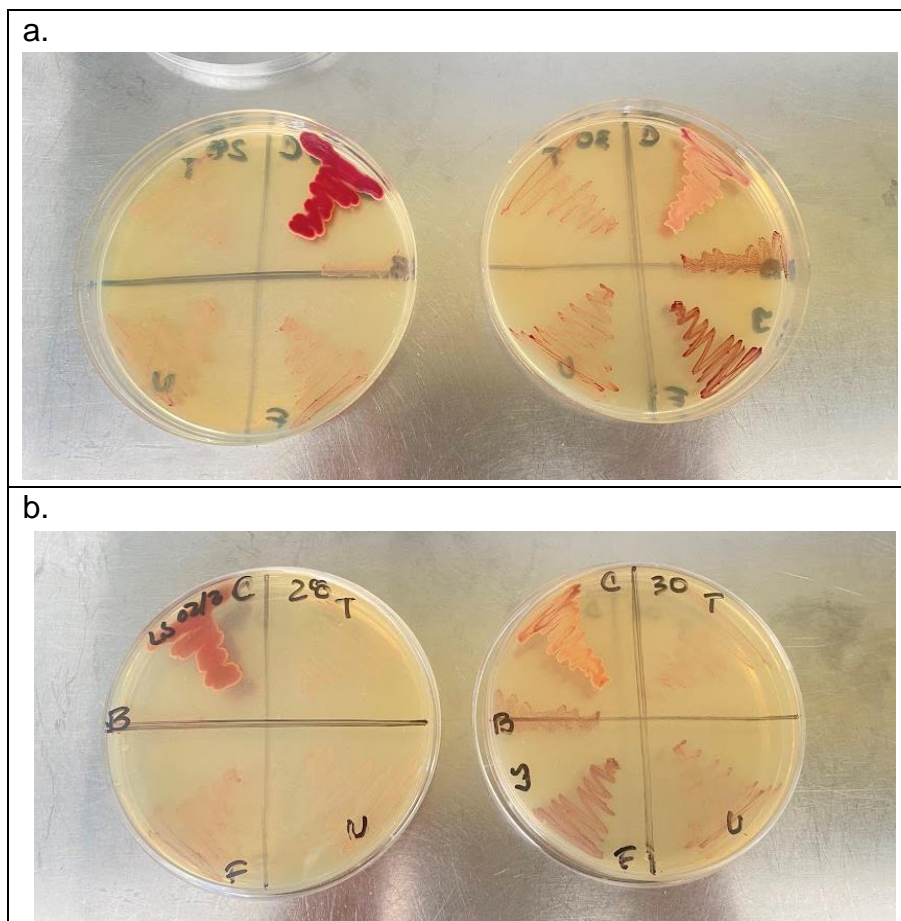


Figura 10 Comparativo de crecimiento con variable de temperatura.
 a. Anverso de la placa (derecha a 28°C, izquierda a 30°C.)
 b. Reverso de la placa (derecha a 28°C, izquierda a 30°C).

3.2.3. Conservación:

De las muestras analizadas y homogeneizadas (generando ruptura de capa blanca) se procedió a dejar una en incubación y otra en refrigeración durante 2 meses obteniendo los siguientes resultados fisicoquímicos

Parámetro	Incubación a 30°C	Refrigeración 4°C
pH (upH)	3,0	3,2
Acidez total (mol/L)	1,4	0,725

Tabla 8 Análisis fisicoquímicos con variable de temperatura de conservación.

3.2.4. PCR y electroforesis.

No fue posible la obtención de muestras para secuenciación dado que se presentó contaminación en los controles procesados y en los reactivos usados.

3.3. Fase 3.

A partir del análisis de los resultados de fase 1 y fase 2, se seleccionaron y agruparon los microorganismos con características morfológicas y bioquímicas similares, identificadas como J, R-W, B-U, C, N, O y T para el montaje del cultivo iniciador como se describió en el apartado 4.4. Se procedió a efectuar la fermentación, manteniendo las variables de temperatura a 30°C y concentración de salmuera al 1,5%. En esta ocasión se retiró la cáscara y se percibió una mejor presentación visual del producto.

Se realizaron evaluaciones diarias para los parámetros fisicoquímicos y conteo microbiológico por duplicado en medio LS y MRS únicamente a 44 horas de fermentación teniendo en cuenta la reducción significativa de pH, tras lo cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Tiempo (horas)	pH (upH)	Acidez total (mol/L)	Solidos solubles (°Brix)	UFC/ml en medio:
				LS
0	6.4	0.008	2	-
20	3.8	0.135	3	-
44	3.6	0.343	4	4,7 x 10 E9
92	3.6	0.398	4	-
164	3.4	0.650	3.9	-

Tabla 9 Resultado de parámetros físico-químicos y conteo microbiológico durante proceso de fermentación, Fase3

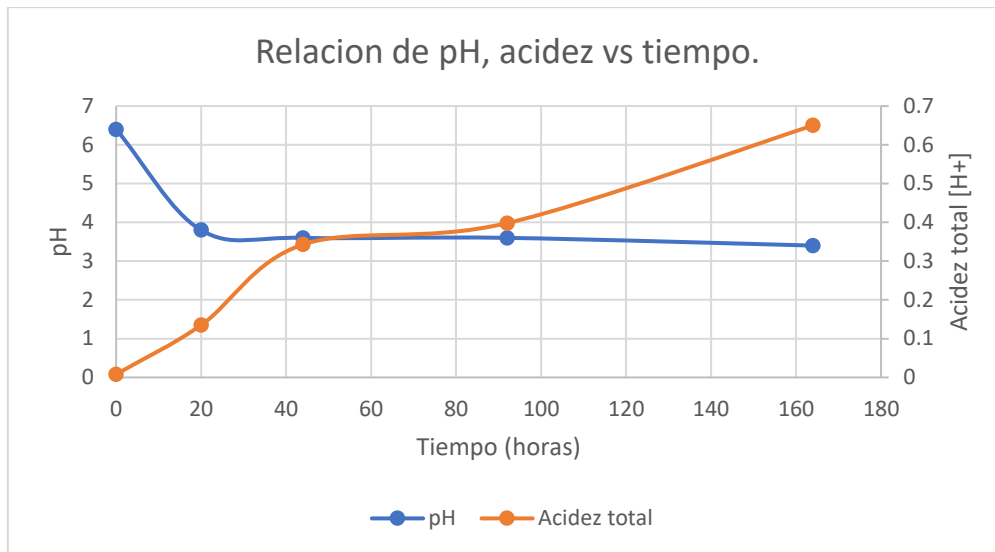


Figura 11 Evaluación del pH y la acidez total durante la fermentación con cultivo iniciador

En la Figura 11 se observa la relación de tiempo transcurrido de fermentación frente al pH y acidez total expresando su relación en el descenso y aumento correspondiente.

Al igual que el descenso de pH y aumento de acidez total a tan solo 20 horas de incubación, se obtuvo la formación de la capa superficial blanca en este caso un poco más compacta como se observa en la Figura 12 y de la cual se tomó una porción de muestra, se sembró directamente en placa y se observaron nuevamente colonias con morfología correspondiente a levaduras.



Figura 12 Formación de capa blanca tras 20 horas de incubación, Fase 3.

A partir de las diluciones y placas sembradas para el conteo microbiológico se realizó la caracterización y se analizó la proporción de las poblaciones microbianas. Para ello se llevó a cabo una diferenciación de características macroscópicas y se determinaron los grupos microbianos (Tabla 10, Figura 13). Cabe resaltar que estas placas fueron incubadas en cámara de anaerobiosis durante 48 horas, transcurrido este periodo se observó crecimiento en las diluciones de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} en placas de LS donde fue posible identificar las bacterias y determinar su concentración. Por el contrario, las placas de MRS expresaron un crecimiento débil para las mismas diluciones. Teniendo en cuenta que se puede tratar de microorganismos anaerobios facultativos y que el proceso fermentativo es en sí una competencia microbiana, se continuó su incubación en aerobiosis durante 72 horas.

Id de colonia	Descripción de colonia	UFC/ml		Colonia de cultivo iniciador con morfología similar.
		Medio LS por duplicado		
1	Color rosa con borde claro brillante, convexa y borde entero.	$3,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	C
2	Punteada, rosa intenso brillante, plana y borde entero.	$4,7 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$	B-U
3	Circular, rosa claro y borde blanco, brillante y convexa y borde entero	$8,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	O / T
4	color blanco y leve punto rosa central, brillante y de borde entero	$4,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	T

Tabla 10 Caracterización y conteo de colonias en agar LS

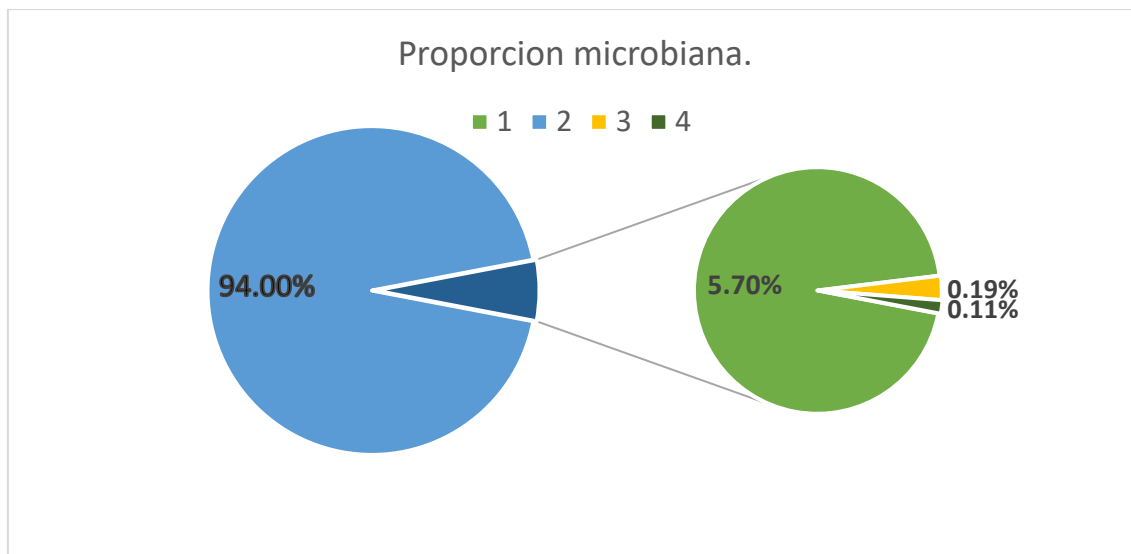


Figura 13 Proporción de las poblaciones microbianas recuperadas en agar LS diferencial.

Transcurrido el tiempo de incubación aerobia para el medio MRS, se observó crecimiento de colonias con características similares a las usadas en cultivo iniciador:

Id de colonia	Descripción de colonia	UFC/ ml Dilución de 10^{-6}	Colonia de cultivo iniciador con morfología similar.
6	Mediana circular color crema, convexa, opaca y de borde entero.	5	R-W
7	Mediana circular color Blanco, plana, opaca y de borde entero.	2	O
8	Forma rizoide, café claro, opaca, prominente, superficie rugosa y borde rizoide	4	J

Tabla 11 Caracterización de colonias en MRS, 24 horas de incubación anaerobia + 72 horas incubación aerobia.

3.3.1. Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial descriptivo y hedónico (subjetivo y cualitativo) para determinar la aceptación del producto fermentado de la fase 2, de manera

espontánea y conservada en refrigeración durante tres meses, y de fase 3, con cultivo iniciador, cumpliendo siete días de fermentación.

Producto Fase 2.

- **Observación general del producto envasado:** los sedimentos ya se encuentran en el fondo y la salmuera no se observa turbia, dado que ha permanecido en reposo durante 3 meses.
- **Textura:** visualmente, se mantienen los trozos de batata íntegros y al paladar se siente turgencia
- **Color:** naranja intenso
- **Olor:** afrutado y butírico
- **Sabor:** los catadores percibieron notas acidas, butíricas y afrutadas.

Producto Fase 3.

- **Observación general del producto envasado:** se observó una capa superficial blanca y ligera turbidez en la salmuera.
- **Textura:** visualmente, los trozos se mantienen íntegros sin embargo al consumo, se percibe muy suave y blanda, se deshace con facilidad en la boca.

Se observó la textura de todos los frascos correspondientes a los diferentes días donde se evaluaron los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos encontrando que a más tiempo de fermentación se intensifica la textura blanda.

- **Color:** naranja intenso
- **Olor:** afrutado y butírico.
- **Sabor:** los catadores percibieron notas acidas, butíricas y afrutadas, pero menos intensas que en la fase 2.

4. DISCUSIÓN.

En la actualidad, aunque se encuentran estudios de fermentación de vegetales , hay pocos registros relacionados a la batata fuera de una fermentación alcohólica o en obtención de productos a base de harina. Sin embargo, con la literatura revisados acerca de la fermentación de batata de forma inducida que relacionaban BAL, se pudo observar un comportamiento similar en cuanto a la textura al generar ablandamiento con el paso de los días de fermentación y afirmar que un proceso inducido acelera la fermentación y reduce en gran medida la microbiota contaminante (Neti, 2013).

Durante el montaje de la fermentación se estima que:

En cuanto a la dosificación del líquido de gobierno en este caso la salmuera, es adecuado limitar al mínimo el espacio de cabeza y asegurar que la material vegetal quede completamente sumergida para favorecer la anaerobiosis, impidiendo el crecimiento de microbiota interferente del ambiente o manipulación. Bajo esta condición, la fermentación comienza inmediatamente y el producto al final del proceso no presentará crecimiento de mohos como se generó en la fase 1, a diferencia de la fase 2, donde se reduce el espacio a más de la mitad del inicial logrando obtener un producto sin aparente contaminación ambiental.

En cuanto a las variables del proceso, como la temperatura, se observa que el objetivo de la fermentación enlazado al descenso de pH, se logra con mayor velocidad cuando se incuba a 28°C frente al de 20°C, lo cual sirvió de indicativo para para que el desarrollo de las demás fases experimentales se ejerciera bajo una temperatura de 30°C.

A partir de los análisis fisicoquímicos se tiene que:

El pH tuvo un comportamiento diferente en las tres fases, en cada una se alcanzó un valor de 4 en diferentes tiempos: en fase 1 a 68 horas de incubación, en fase 2, a 47 horas de incubación y en fase 3, a las 20 horas de incubación ya había

logrado un pH de 3,8. Es importante tener en cuenta que, el pH inicial no fue el mismo entre las fases y que está relacionado a la calidad de agua con la que se trabajó, sin embargo fue evidente que el uso de un consorcio para la fermentación genera mayor velocidad en las reacciones. Esto mismo se constató con la formación superficial de la capa blanca de microorganismos correspondiendo a levaduras, en la fase 3 siendo su aparición más rápida frente las fases 2 y 1.

Los datos de acidez total son correspondientes en tiempo a este fenómeno presentado en relación al pH. Se alcanza un valor alrededor de 0,4 de mol/l en fase 1 a las 140 horas de proceso, en fase 2 a las 115 horas y en fase 3 a las 92 horas lo que relaciona una actividad microbiana con mayor velocidad en la última fase experimental.

Una vez finalizados los procesos de fermentación el pH tiende a estabilizarse, como se pudo observar en los resultados obtenidos a partir de las muestras de fase 2 reservadas en incubación a 30°C y refrigeración a 4°C durante dos meses, donde se registran resultados con una diferencia de 0,1 unidades, lo cual se puede atribuir a la desviación del equipo lo que da una visión favorable como producto estable a nivel microbiológico. Sin embargo, la acidez total fue mayor para la muestra que permaneció en incubación registrando 1,4 mol/l frente a 0,725 mol/l en refrigeración. Doblar su valor supone una degradación mayor del alimento en favor de la aparición de moléculas cortas de naturaleza ácida, pero no disociada, de ahí que no afecte al valor de pH.

En cuanto a los sólidos solubles (°Brix), con forme avanza el tiempo de fermentación, van aumentando, lo que quiere expresar un aumento de moléculas de cadena corta asociadas a los carbohidratos que tiene la batata y que, gracias a la actividad microbiana quedan en disolución, indicando una descomposición de la materia, ya sea generándose azúcares simples como moléculas ácidas débiles que afectan el sabor, como se ha mencionado previamente.

Análisis microbiológico:

La batata cuenta con una microbiota propia y también diversa derivada de su proceso de cultivo, cosecha, ambiente y manipulación. Esto se constata después de ver los microorganismos aislados en las fases experimentales donde se usaron batatas adquiridas en diferentes momentos y que guiados por las características fenotípicas, se evidencia la recuperación de microorganismos con similitud y otros que presentan mayor o menor crecimiento durante los tres procesos fermentativos.

La obtención de colonias en la superficie de un medio de cultivo a partir de la salmuera fermentada permitió el aislamiento y selección de los microorganismos propios de la batata. Tras la aplicación de técnicas de microbiología convencional se logró colonias aisladas facilitando las tareas de identificación fenotípica. Sin embargo, un estudio más completo puede ser el desarrollo de tipificación de las colonias por PCR. Las técnicas moleculares permiten identificarlas para un posterior estudio individual a profundidad, en relación a las características metabólicas y tener una elaboración de consorcio microbiano con bases teóricas y productos finales deseables.

El ritmo de crecimiento microbiano siempre fue más acelerado en el medio LS frente al MRS, teniendo en cuenta que este último es un medio para recuperación de *Lactobacillus* que guiados por su fundamento indica un crecimiento lento.

El proceso fermentativo y considerando los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo experimental se da con mayor facilidad con el uso de un consorcio y tiene lugar a las 48 horas, momento en el cual el producto estaba siendo transformado, la microbiota interferente disminuyó, las BAL proliferaron y se registró una caída significativa de pH.

El desarrollo de cultivos iniciadores requiere microorganismos propios de la matriz alimentaria para evitar el cambio estructural radical de la misma. En este estudio experimental se realizó, siguiendo esta base teórica, un cultivo iniciador equiproporcional en lo relativo a las distintas bacterias usadas. Sin embargo, también se requiere tener cifras de la proporción microbiana dado que, al hacer

el montaje con un estimado igualitario en densidad óptica no se obtienen los mismos resultados en cuanto a textura del alimento obtenido en el proceso fermentativo espontaneo frente al inducido. Tener definida esta proporción puede evitar, por ejemplo, el ablandamiento por enzimas pectinolíticas microbianas propias de algún microorganismo presente en el consorcio, como ocurrió en la fase 3.

En cuanto a la actividad de los péptidos antimicrobianos se observó que este proceso fermentativo, partiendo de la ecología microbiana natural global del tubérculo genera inhibición a microorganismos como *E. fecalis*, *E. cloacae*, *S. tiphymurium*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Los montajes con *E. coli*, reportaron mayor actividad antimicrobiana. Por el contrario, para los montajes con *B. cereus* y *K. pneumoniae* no se observó ningún tipo de reacción antimicrobiana.

Aunque, del grupo de bacterias estudiado se conocen como principales patógenos alimentarios a *Salmonella* y *E. coli*, las demás cepas que mostraron inhibición por colonias aisladas en el proceso (*J*, *N*, *R* y *W*), podrían ser base de estudio para otras utilidades diferentes a seguridad alimentaria.

Evaluación del producto final:

- Es importante cuidar de todas las características del producto, lo que pone en evidencia la necesidad de elaborar cultivos iniciadores, relacionando también la distribución microbiológica natural a nivel cuantitativo.
- A pesar de que, evaluar sus características organolépticas a nivel de olor y sabor no representó una tarea fácil de describir en términos técnicos para los catadores, se manifestó una aceptabilidad del producto dejando en evidencia la similitud tanto en la fase 2 como la fase 3.

5. CONCLUSIONES.

- A partir de la fermentación espontánea se obtuvieron 17 colonias iniciales diferentes, que tras técnicas microbiológicas para identificación fenotípica y los resultados de una segunda fermentación espontánea se reunieron en 12 colonias.

- Las condiciones más favorables para la fermentación fueron a una temperatura de 30°C, en una solución de salmuera de 1,5% y un con un espacio de cabeza menor a 1 cm. La duración para el proceso espontáneo estaría adecuado hasta 7 días. Estos parámetros garantizaron el proceso y evitaron un acentuado sabor salado y ablandamiento indeseado en el producto final.

- La fermentación desarrollada con el consorcio, afectó las características organolépticas al estar constituido por las diferentes colonias igualmente en términos de densidad óptica, a diferencia de una distribución espontánea y natural donde una población microbiana puede tener mayor presencia que otra, con un estilo de vida y adaptación variable. Por lo anterior, es necesario tener un descriptivo cuantitativo de la microbiota propia de la matriz para poder evitar resultados indeseables como por ejemplo el deterioro de textura obtenido en la fase 3.

- La fermentación con cultivo iniciador alcanzó un descenso de pH con mayor velocidad generando la selección de microorganismos y generación de metabolitos en menor tiempo, en comparación con la fermentación espontánea. Esto podría traducirse a una mayor productividad en términos de escalamiento piloto- industrial.

- Se observó que la microbiota propia de la batata tiene capacidad bactericida. La identificación molecular, es necesaria para aterrizar y continuar con el

estudio de péptidos antimicrobianos en el campo de la industria alimentaria dado los resultados de los montajes con los microorganismos evaluados.

- Dejando de un lado la evaluación de textura, la expresión de sabor y olor tanto en la fermentación espontánea como por cultivo iniciador fue el mismo lo que da una posibilidad de estandarización de producto con facilidad. En términos generales es un producto atractivo a nivel organoléptico con potencial salida en el mercado.

- La estructura de la investigación y los resultados obtenidos sirven de guía para próximos desarrollos del proceso fermentativo no solo de la batata, si no en general, para vegetales que no han sido estudiados.

- La fermentación de la batata se puede considerar como un proceso rentable evaluando sus características nutricionales como tubérculo frente al tiempo e insumos que requirió el montaje experimental.

BIBLIOGRAFIA

- Andrade, RD., Torres, R., Montes, E., Perez, O., Acuna, C., Narvaez, G.. (2009). Obtencion de aguardiente a partir de batata (*Ipomoea batatas*). *Temas agrarios*, 14(1): 39-45.
- Andreu, M. & Saavedra-Coutado, C. (2022). El rol de los fermentos en la sostenibilidad alimentaria. *Nutricion hospitalaria*.
- Bautista, S. & Escobar, K. (2023). Levaduras probióticas y proteína de papa, una opción para la nutrición animal. *Elementos*, 97-100.
- Bello, J. (2013). *Calidad de vida, alimentos y salud humana*. Madrid: Diaz de santos.
- Bulet P, Stöcklin, R, Menin L. (2004). Anti-microbial peptides from invertebrates to vertebrates. *Immuoll Rev.*, 198:16.
- Caldas, Y. (2020). *Formulacion de una compota a base de Ipomea batatas L. "Camote" y Daucus carota "Zanahoria" para su determinacion de polifenoles y capacidad antioxidante*. . [Tesis de grado,Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion] <http://repositorio.unjfsc.ed>.
- Castellanos, J., Galvis, JA., Perez, P., Grande, MA., Lucas, R. & Galvez, A. (2022). Las bacteriocinas y su efecto sinérgico con tecnologías emergentes en alimentos. *MUTIS*, 12(2). Obtenido de <https://doi.org/10.21789/22561498.1841>
- Chintha, P., Sarkar, D., Pecota, K., Dogramaci, M. & Shetty, K. (2021). Improving Phenolic Bioactive-Linked Functional Qualities of Sweet Potatoes Using Beneficial Lactic Acid Bacteria-Based Biotransformation Strategy. *Horticulturae*, 7(10), 367.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food microbiology, Elsevier.*, 1-10.

- Favaro, L. B. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses- Application in biopreservation? *Trends in food science & technology*, 37-48.
- Ferrari, A., Vinderola, G., Weill, R. (2020). Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura. Buenos Aires.: Instituto Danone del Cono Sur.
- Florez, DH., Contreras C., & Uribe, CP. (2016). *Perspectivas tecnológicas y comerciales para el cultivo de la batata en Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica. Mosquera, Colombia. 110p.* Obtenido de Disponible desde internet en: <https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500,12324,13141>.
- Garcia Bautista, A., & Guerrero Barrado, A. (2023). Bacteriocinas como bioconservador alimentario: características generales y aplicación en alimentos. *Pubsaude*, 12, a366. doi:<https://dx.doi.org/10.31533/pubsaude12.a366>
- Icamina, P. (Octubre de 1985). La batata alcanza nueva posición. . *El CIID Informa*, págs. 35-37.
- Kumarinya, R., Kumari, A., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177.
- Marti, H., Corbino, G. & Chludil, H. (2011). La batata: el redescubrimiento de un cultivo. *Ciencia hoy*, 21(121), 17-23.
- Montaño, A., De Castro, A., & Rejano, L. (1992). Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasa y aceites*, 43(6), 352-360.
- Mudoor Soorash, M., Wiling, BP, Bourrie, BCT. (2023). Opportunities and Challenges of Understanding Community Assembly in Spontaneous Food Fermentation. *Foods*, 3(12 (3)), 673.
- Mukhopadhyay, S.K., Chattopadhyay, A., Chakraborty, I. (2011). Sweetpotato. Sweetpotatoes for income and food security. *Food Security*, 3, 283-305.

- Neri, M. (2016). *Aprovechamiento del camote (Ipomoea batatas) para el desarrollo de harinas funcionales y su aplicacion en la elaboracion de muffins reducidos en gluten.* . [Tesis profesional, Universidad de Puebla] Repositorio Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/home>.
- Neti, Y., Nurdijanah, S., Sugiharto, R., Amethy, D. (2014). Effect of spontaneous lactic acid fermentation on Physico-Chemical properties of Sweet Potato flour. *Microbiology Indonesia*, 8(1), 1-8.
- Neti, Y., Nurdjanah, S., Margareta, M. (2013). The effect of a mixed-starter culture of lactic acid Bacteria on the characteristics of pickled Orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Microbiology Indonesia*, 7(1), 1-8.
- Pérez, R. & Trinidad, RE. (2022). *Manual para el aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas [Tesis de licenciatura]* . Chiapas: Universidad de Ciencias y Artes de Chipas. Repositorio <https://repositorio.unicach.mex>.
- Pizard, M. (2022). Fermentados: encurtidos, alcoholes, vinagres, quesos, carnes curadas y mas. *Garage gourmet. Ed. Grijalbo Ilustrados, ISBN 9789915667355*.
- Plestsch, M. (2023). *Batata: un cultivo cosmopolita y versátil*. Recuperado el 29 de Junio de 2023, de Camara de sanidad agropecuaria y fertilizantes.: <https://www.casafe.org/batata-un-cultivo-cosmopolita-y-versatil/>
- Ramirez, JC., Ulloa, P., Velazquez, M., Ulloa, JA. & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7(2), Abril-Junio, ISSN 2007-0713.
- Rezac, S., Kok, CR., Heermann, M. & Hutkins, R. . (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of live organisms. *Frontiers in microbiology*. 9: 1785.
- Téllez, GA., Castaño, JC. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-67.
- Wang, Y., Zhang, C., Liu, F., Jin, Z. & Xia, X. . (2022). Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented

foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
doi:10.1080/10408398.2021.2025035