

Estudio de la Microbiota del Proceso de Producción de Almidón Agrio de Yuca

Laura N. Chiquiza-Montaño^{(1)*}, Olga I. Montoya⁽¹⁾, Claudia Restrepo⁽²⁾ y Fernando Orozco-Sánchez⁽¹⁾

(1) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59A 63-20, Medellín-Colombia. (e-mail: Inchiqui@unal.edu.co)

(2) Fundación Intal, Carrera 50G # 12S – 91, Itagüi, Colombia.

*Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia.

Recibido Dic. 21, 2015; Aceptado Feb. 22, 2016; Versión final Abr. 22, 2016, Publicado Oct. 2016

Resumen

Se recolectaron muestras líquidas de diferentes etapas de producción de almidón agrio de una industria local con el fin de evaluar y caracterizar la microbiota presente en el proceso. Las muestras se inocularon en diferentes medios de cultivo y se cuantificó la carga microbiana de cada una de ellas. Posteriormente, se obtuvieron 29 aislados de levaduras y 47 de bacterias que fueron caracterizados macro y microscópicamente. Finalmente, se evaluó la presencia de actividad amilolítica de los aislados y se identificaron 12 microorganismos, entre ellos *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus cereus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Saccharomyces cerevisiae*. La investigación muestra la variedad de microorganismos que se ven involucrados en el proceso fermentativo del almidón de yuca y sirve como base para futuras investigaciones que busquen mejorar el proceso de producción de almidones modificados por vía biotecnológica.

Palabras clave: almidón de yuca; almidón agrio; bacterias; levaduras; actividad amilolítica

Microbiota Study of the Production Process of Sour Cassava Starch

Abstract

Liquid samples were collected from different stages of sour starch production from a local industry with the aim of evaluating and microbiologically characterizing this process. Samples were taken and inoculated in different culture media. The microbiota of each sample was quantified and subsequently, 29 yeast strains and 47 bacterial strains were isolated, purified and characterized macro and microscopically. Finally, amylolytic activity was evaluated and twelve microorganisms were identified, including *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus cereus*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. This research shows the variety of microorganisms that are involved in this fermentation process and also serves as a preliminary analysis for future research aiming to improve the production process of fermented starch.

Keywords: cassava starch; sour starch; bacteria; yeasts; amylolytic activity

INTRODUCCIÓN

El almidón es un polisacárido de reserva energética de los vegetales (Witczak *et al.*, 2015), es extraído de la yuca y utilizado de forma nativa (sin modificaciones) y con modificaciones físicas, químicas, enzimáticas o combinadas en las industrias de textiles, papel, adhesivos, farmacéuticas y de alimentos. En Colombia, dicho almidón es extraído de las raíces y se le llama almidón dulce; según su uso final, en algunos casos sufre de un proceso de fermentación natural dando como resultado el almidón agrio (Vargas Aguilar *et al.*, 2012). Este último se obtiene de forma artesanal en establecimientos rurales agroindustriales llamados rallanderías cuyo producto principal es el almidón hidrolizado, conocido como almidón agrio utilizado en la industria panadera (Velasco, 2008). En las rallanderías se toman las raíces frescas, se lavan y con unas aspas giratorias por fricción entre ellas mismas, se remueven las cáscaras. Posteriormente, se quitan las puntas y las raíces se llevan al rallador, en el que se libera el almidón separándose los gránulos de las fibras. De esta última etapa depende el rendimiento en la obtención de almidón, porque un rallado muy fino provoca daño físico en los gránulos, una sedimentación más lenta y un rápido deterioro enzimático. Finalmente, la extracción termina en unos canales en los que el almidón se sedimenta y después de retirar la fase acuosa, se seca y se obtiene el almidón nativo (Alarcón y Dufuor, 1998). Sin embargo, la etapa de extracción de almidón puede verse afectada por varios factores artificiales que influyen en el rendimiento del almidón, incluyendo las condiciones de secado de las materias primas (Olomo y Ajibola, 2003), el tiempo de la cosecha y el almacenamiento de la raíz, debido a que éste disminuye el contenido de almidón (Benesi *et al.*, 2008; Benesi *et al.*, 2004). Todos estos factores pueden ser controlados y con una cuidadosa selección de los parámetros, puede maximizarse el rendimiento de la obtención de almidón.

Este tipo de almidón es utilizado como aditivo en diferentes industrias o para su posterior fermentación y obtención de almidón agrio, el cual se lleva en tanques de fermentación y se cubre por una capa del líquido sobrenadante de la sedimentación en periodos que van 20 a 90 días (Alarcón y Dufuor, 1998). Este almidón es usado en la fabricación de productos de panadería tradicionales y se obtiene en procesos cuyos parámetros no están bien definidos, por lo cual existe variación en la calidad del producto final (Acosta, 2006), al darse de manera natural y bajo condiciones ambientales, no está controlado, ni estandarizado, y no se aplican los principios de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (Cadena *et al.*, 2006). Sin embargo, esta etapa depende de la presencia de microorganismos amilolíticos que degradan parcialmente el almidón, produciéndose azúcares simples que constituyen a su vez, el sustrato de microorganismos productores de ácidos orgánicos, como láctico, propiónico, acético y butírico (Nunes y Cereda, 1994). Este último paso implica la presencia de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*, además, de levaduras del género *Saccharomyces* (Cárdenas y Buckle, 1980; Figueroa *et al.*, 1995; George *et al.*, 1995), siendo las BAL más abundantes que las levaduras (Parada *et al.*, 1996).

Cereda (1975) concluyó que este proceso fermentativo se desarrolla en tres fases; en la primera, se desarrolla una microbiota poco exigente, que consiste principalmente en los grupos coliformes y mesófilos aerobios. En la segunda, intervienen microorganismos más exigentes identificados como productores de ácidos orgánicos, muchos de los cuales pertenecen a las BAL, y se caracterizan por ser microaerófilos o anaerobios; en cambio, en la tercera fase predominan las levaduras saprofitas. De las anteriores etapas, la acidificación láctica junto con la energía suficiente de los rayos UV, dan como resultado la depolimerización parcial de las moléculas del almidón, lo cual produce pequeños fragmentos lineales. Estos últimos, junto con algunos radicales, ayudan a la reticulación de las moléculas de almidón restantes, formando una red tridimensional que se traduce en las propiedades de expansión del almidón agrio durante la cocción (Alarcón y Dufuor, 1998).

Debido a las condiciones ambientales, a la falta de estandarización y a la diversidad microbiana en las que se dan los procesos de extracción y fermentación del almidón de yuca, se puede dar una mayor variabilidad en la obtención de dicho almidón. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar y seleccionar algunos microorganismos con actividad amilolítica que intervienen en cada una de las etapas de la producción de almidón agrio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se describe la obtención de muestras microbianas, la siembra y aislamiento de microorganismos, la identificación de los aislados y la determinación de capacidad amilolítica en lo que sigue.

Obtención de muestras microbianas

Se recolectaron muestras de varias etapas del proceso de extracción y fermentación de almidón, de una rallandería localizada en el municipio de Sampedra, departamento de Sucre, Colombia; figura 1. Se tomaron un total de 40 muestras al azar, sin repeticiones; 22 líquidas, cada una aproximadamente de 200 mL y 18

sólidas cada una de 500 g peso húmedo, posteriormente fueron llevadas a bolsas estériles Nasco Whirlpak, divididas en muestras del proceso de extracción y proceso de fermentación; cinco muestras líquidas y una sólida provenientes del primer proceso: desde los flujos de entrada de agua y entrada a la sedimentación, flujos de salida del rallador y salida del colador y agua que queda como sobrenadante en la sedimentación (agua de fermentación). La muestra sólida corresponde al almidón extraído. Además, del segundo proceso (fermentación), se tomaron 17 muestras sólidas y 17 líquidas procedentes de cuatro tipos de tanques. En el lugar, a cada una de las muestras líquidas se les midió pH y temperatura. Las muestras fueron transportadas en contenedores de plástico estériles refrigerados al laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y al laboratorio de microbiología de la fundación intal y almacenadas a 4 ± 2 °C hasta el momento de los análisis.

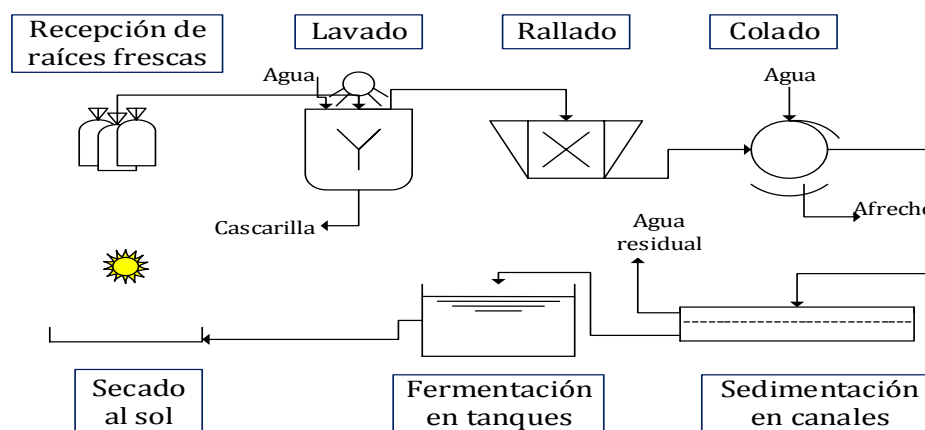


Fig. 1. Proceso de obtención de almidón agrio a partir de raíces de yuca.

Siembra y aislamiento de microorganismos

Una vez recolectadas y transportadas las muestras, se procedió a inocularlas en diferentes medios de cultivo sólidos: agar tripteína soya (TSA) para microorganismos viables a 37 ± 2 °C por 24 a 48 horas, diclorán rosa de bengala-cloranfenicol (DRBC) para hongos a 25 ± 2 °C de 3 a 5 días, Man Rogosa y Sharpe (MRS) para bacterias ácido lácticas a 37 ± 2 °C por 72 horas en cámaras con anaerocult y agar nutritivo enriquecido con 0,1% p/v de almidón soluble para microorganismos con actividad amilolítica a 37 ± 2 °C por 24 a 48 horas; por el método de agotamiento en superficie. Posteriormente, a cada uno de los cultivos microbianos se les realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL mediante la técnica de recuento en placa en superficie. Para esto se inoculó 0.1 mL de las diluciones 10^2 y 10^4 en cajas Petri con los medios de cultivo estériles. Los conteos se realizaron en cuenta colonias. Además, se realizó la prueba de actividad amilolítica y se seleccionaron las cajas con mejor actividad, para así, aislarlas, purificarlas e identificarlas (Madigan *et al.* 2014).

El aislamiento de las colonias se realizó teniendo en cuenta las condiciones aerobias y aquellas que presentaron mejor actividad amilolítica. En el caso de los mohos y las levaduras se inocularon en agar extracto de levadura glucosa cloranfenicol (YGC) a 22 ± 2 °C durante 5 días y las bacterias en agar Nutritivo enriquecido con almidón a 37 ± 2 °C por 24 a 48 horas. Se procedió a la purificación de cada uno de los aislados, con base, a la caracterización macroscópica de la colonia con el uso del estereoscopio y microscopio y la morfología del microorganismo como tal, mediante el microscopio por medio de la tinción de Gram (Rojas-Triviño 2011).

Identificación de los aislados.

Al azar, dieciocho aislados fueron identificados por pruebas bioquímicas. Una vez caracterizados macroscópicamente y microscópicamente se llevaron a análisis al laboratorio de Tecnimicro, Medellín, donde se utilizó el equipo Vitek 2 Compact 60, versión instalada Systems 06.01 de BioMérieux, que consta de una serie de tarjetas para levaduras (YST), bacilos formadores de esporas Gram positivos (BCL), bacilos Gram negativos (GN), cocos y bacilos no formadores de esporas Gram positivos (GP) impregnadas con reactivos colorimétricos, los cuales se inocularon con la suspensión del cultivo puro. El perfil se interpretó de manera automática. Cada una de las tarjetas cuenta con 64 pozos y se midieron las actividades enzimáticas como consecuencia de la producción de metabolitos que cambian el pH hacia ácido o alcalino y son detectados por los indicadores de pH presentes en cada sustrato. Finalmente, el equipo arrojó una probabilidad de

identificación del microorganismo según la comparación que realiza con su base de datos que da una precisión de 93% para GP, 94% para GN, 87% para BCL y 84% para YST. (BioMérieux 2015).

Determinación de capacidad amilolítica

A cada aislamiento puro, se le determinó la actividad amilolítica, inoculando los microorganismos en cajas de Petri con Agar Nutritivo enriquecido con 0.1% p/v de almidón soluble, incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas y $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 120 horas, bacterias y levaduras respectivamente. Posteriormente, se adicionó al cultivo microbiano una cantidad de solución de yodo (KI-5,0% p/v y I 2-0,5% p/v). La presencia de un complejo helicoidal entre amilosa y yodo, da lugar al típico azul profundo de dispersiones de almidón teñidos con yodo (McGrance, Cornell, y Rix 1998). La formación de halos claros o transparentes mayores a 1 mm de radio alrededor del crecimiento demostraron la actividad amilolítica; a mayor halo mayor actividad, por lo que la distancia de la zona desde el borde de la colonia hasta el límite externo, demuestran la capacidad del microorganismo de hidrolizar dicho sustrato (Madigan *et al.* 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados de la caracterización de las muestras recolectadas, de la caracterización microbiana y de la identificación de los aislados y la actividad amilolítica de los aislados

Caracterización de las muestras recolectadas

Se tomaron muestras de todo el proceso en la rallandería, desde la extracción hasta la fermentación del almidón, figuras 2 a 5, y datos de temperaturas y pH. Para el segundo proceso, también se tuvo en cuenta el tiempo que llevaba el almidón en el mismo.



Fig. 2. Lavado de yuca.



Fig. 4. Tanques de fermentación Rotoplast



Fig. 3. Canales de sedimentación y tanques de fermentación



Fig. 5. Tanques de fermentación de plástico

La rallandería en la cual se realizó la recolección se encuentra ubicada en la periferia del municipio de Sampedro, Sucre; en esta región se cultiva yuca, por lo que esta no sufre de largas distancias de transporte que afecte su procesamiento, cuenta con una temperatura promedio de 32°C y una humedad relativa de 74%. Se registraron temperaturas desde 25 hasta 39.5°C en los procesos (extracción y fermentación), las cuales no presentaron un cambio drástico, y corresponden a la temperatura ambiental del lugar y la hora de la toma de muestra (cerca al mediodía), a excepción de la temperatura del agua de entrada, la cual no se encuentra expuesta a las mismas condiciones ambientales. Estas temperaturas favorecen el crecimiento y metabolismo de microorganismos mesófilos.

Por el contrario, en el proceso de fermentación, llevado a cabo en diferentes tipos de tanques; de cemento (TC), de plástico blanco cúbico (TP), de plástico negro cilíndrico de 1000 L (TR) y de plástico negro cilíndrico de 2000 L (TRG) y en el líquido para la fermentación (AS) se presentó una disminución de pH, que

alcanzó valores de 3.3 que difieren del valor promedio de la extracción (6.6 ± 1.4) posiblemente por la producción de ácidos orgánicos de los microorganismos asociados al proceso (Marcon *et al.* 2006). El cambio que muestra el pH no presenta una relación directa con el número de días de la fermentación, esto puede explicarse por la degradación de almidón que genera moléculas de glucosa precursoras de la síntesis de ácidos. Como es un sistema expuesto al ambiente, la superficie es susceptible a contaminaciones que alteren los datos al interior de éste. Estos valores de pH registrados corresponden a los reportados por Cadena (2006) que se encuentran en un intervalo de pH de 3 a 6, quienes tampoco observaron una tendencia de estos datos en comparación con el número de días de fermentación, ni con las características tecnológicas que presentan las diferentes rallanderías que fueron evaluadas en ese trabajo.

Caracterización microbiana

Durante el proceso de extracción, los recuentos de mohos y levaduras oscilaron entre 2×10^2 y 1.5×10^4 UFC/mL, y las BAL entre 55 y 21×10^5 UFC/mL. Por otra parte, en el proceso de fermentación para la obtención de almidón agrio, los mohos y levaduras se cuantificaron en un intervalo de >10 hasta 28×10^4 UFC/mL y las BAL de 14×10^2 hasta 15×10^8 UFC/mL. No todas las muestras dieron positivo a la prueba de hidrólisis realizada con lugol Tabla 1. Figueroa (Figueroa, Davila, y Pourquié 1995) y Ampe (Ampe, Sirvent, y Zakhia 2001) observaron en la fermentación natural de yuca, que los grupos microbianos predominantes son BAL (10^8 a 10^9 UFC log/g) y levaduras (10^1 a 10^4 log UFC/g).

Tabla 1. Carga microbiana muestras proceso producción almidón dulce y agrio

Código	Act. Amilolítica	Mohos (UFC/mL)	Levaduras (UFC/mL)	BAL (UFC/mL) $\times 10^3$
Agua de entrada	+	960	1600	0,55
Agua salida del rallador	+	3700	15000	2100
Agua salida del colador	+	230	200	190
Agua salida al sedimentador	-	650	4100	5
Agua de fermentación	+	820	4000	420000
TC 5	+	10	100	500
TC 7	+	10	200	1300
TC 8	+	100	56000	3,5
TC 12	+	20	300	5,4
TC 13	+	<10	25000	24
TC 16	+	<10	55000	15
TC 17	+	<10	280000	1400
TC 22	+	30	60	350
TR 4	+	7500	8100	500
TR 9	-	20	4600	51
TR 15	-	<10	<10	320
TRG 1	-	100	80	1300
TRG 9	+	<10	<10	3400
TRG 12	-	<10	<10	600
TRG 15	+	<10	<10	1,4
TP 2	+	940	150	520
TP 8	-	200	84000	1500000

Aunque, el recuento microbiano no arrojó una tendencia clara de la presencia o cantidad de los mismos en las etapas del proceso extracción y fermentación, ni en los diferentes días de fermentación, es posible observar una menor cantidad de mohos, en algunos casos <10 y un aumento de BAL que alcanza 1.5×10^9 UFC/mL en la etapa fermentativa, lo cual concuerda con la disminución del pH en la misma. Asimismo, los aislados de mejor actividad amilolítica provenían de las muestras que correspondían a 3 días diferentes de fermentación, 2 de salidas del proceso y el agua que queda luego de la sedimentación.

Se purificaron y aislaron un total de 29 colonias de levaduras diferentes y 47 colonias bacterianas diferentes (datos no mostrados), la mayoría bacilos esporulados y como era de esperarse muchas de estas

presentaban características muy semejantes entre ellas. Aunque, la caracterización macro y microscópica es útil para diferenciar, no garantiza que no se trata del mismo microorganismo, por lo tanto, es necesario hacerle un perfil bioquímico amplio o una caracterización molecular. Dadas las condiciones de pH, un número significativo de cepas bacterianas es encontrado en el agua inicial de la fermentación

Identificación de los aislados

Mediante identificación bioquímica y posterior comparación en las bases de datos se encontraron 12 microorganismos diferentes.

Saccharomyces cerevisiae. Encontrada en el agua de fermentación. El crecimiento obtenido presentó características macroscópicas de colonias de textura cremosa, forma circular, borde entero y superficie lisa y características microscópicas de levadura. Este microorganismo es una levadura facultativa, cuando crece en medios anerobios ricos en glucosa, maltosa, fructosa o sacarosa, produce etanol y CO₂. Se utilizó la tarjeta YGC para su identificación que obtuvo un 95% de probabilidad. Detalles bioquímicos: LysA (-), IMLTa (-), LeuA (+), ARG (-), ERYa (-), GLYLa(-), TyrA (-), BNAG (-), ARBa (-), AMYa (-), dGALa (+), GENa (-), dGLUa (+), LACa (-), MadGa (-), dCELa (-), GGT (-), dMALa (-), dRAFa (+), NAGA1 (-), dMNEa (+), dMELa (-), dMLZa (-), ISBEa (-), IRHAa (-), XLTa (-), dSORa (-), SACa (+), URE (-), AGLU (-), dTURa (-), dTREa (+), NO3a (-), IARA (-), dGATa (+), ESC (-), IGLTa (-), dXYLa (-), LATa (-), ACEa (+), CITa (-), GRTas (-), IPROa (-), 2KGa (-), NAGa (-), dGNTa (-).

Leuconostoc mesenteroides ssp. *Dextranicum*. Encontrada en el agua de fermentación. Estas colonias presentaron unas características de crecimiento macroscópicas de textura cremosa, forma circular y borde entero, y microscópica de bacilos Gram positivos. Estas bacterias producen dextranos a partir de glucosa, es anaerobia facultativa y se encuentra presente en vegetales. Se obtuvo un 88% de probabilidad utilizando la tarjeta GP. Detalles bioquímicos: AMY (+), PIPLC (-), dXYL (-), ADH1 (-), BGAL (+), AGLU (+), APPA (-), CDEX (-), AspA (-), BGAR (-), AMAN (-), PHOS (-), LeuA (-), ProA (-), BGURr (-), AGAL (+), PyrA (-), BGUR (-), AlaA (-), TyrA (-), dSOR (-), URE (-), POLYB (+), dGAL (-), dRIB (-), ILATk (-), LAC (+), NAG (-), dMAL (+), BACI (+), NOVO (+), NC6.5 (-), dMAN (-), dMNE (+), MBdG (+), PUL (-), dRAF (-), O129R (+), SAL (+), SAC (+), dTRE (+), ADH2s (-), OPTO (+).

En uno de los tanques de fermentación de cemento (1) y en el agua de fermentación se encontró *Bacillus amyloliquefaciens*. Presentó características macroscópicas (borde irregular, planas y consistencia mucosa) y microscópicas de bacilos Gram positivos esporulados. Este bacilo es aerobio, productor de α -amilasa y se encuentra fácilmente en el suelo. En los dos casos fue usada la tarjeta BCL y se logró un 88% de probabilidad de la muestra proveniente del tanque de fermentación y un 94% de probabilidad del agua de fermentación. Detalles bioquímicos de la muestra del tanque de fermentación: BXYL (+), LysA (-), AspA (-), LeuA (+), PheA (+), ProA (-), BGAL (+), PyrA (+), AGAL (+), AlaA (-), TyrA (+), BNAG (-), APPA (+), CDEX (+), dGAL (-), GLYG (-), INO (+), MdG (+), ELLM (-), MdX (-), AMAN (-), MTE (+), GlyA (+), dMAN (+), dMNE (-), dMLZ (-), NAG (-), PLE (-), IRHA (-), BGLU (+), BMAN (-), PHC (-), PVATE (-), AGLU (+), dTAG (-), dTRE (+), INU (-), dGLU (+), dRIB (-), PSCNa (-), NaCl 6.5% (+), KAN (-), OLD (-), ESC (+), TTZ (-), POLYB_R (-). Detalles bioquímicos en que difiere la muestra del agua de fermentación de la del tanque de fermentación: TyrA (-), GLYG (+), GlyA (-), dMNE (+), PLE (+), PVATE (+), INU (+), dGLU (+), dRIB (+), TTZ (+), POLYB_R (+).

En la muestra del agua de salida del colador, se encontró *Streptococcus mutans*. El crecimiento obtenido presentó características macroscópicas (colonias de forma circular, textura cremosa y planas) y microscópica de bacilos Gram positivos cortos. Es un microorganismo anaerobio facultativo, acidófilo, metaboliza sacarosa para producir polisacáridos, frecuente en la cavidad bucal humana. Se obtuvo un 99% de probabilidad utilizando la tarjeta GP. Detalles bioquímicos: AMY (+), PIPLC (-), dXYL (-), ADH1 (-), BGAL (-), AGLU (-), APPA (-), CDEX (-), AspA (-), BGAR (-), AMAN (-), PHOS (-), LeuA (+), ProA (-), BGURr (-), AGAL (-), PyrA (-), BGUR (-), AlaA (+), TyrA (-), dSOR (+), URE (-), POLYB (-), dGAL (-), dRIB (-), ILATk (-), LAC (-), NAG (+), dMAL (+), BACI (+), NOVO (+), NC6.5 (-), dMAN (+), dMNE (+), MBdG (+), PUL (-), dRAF (-), O129R (-), SAL (+), SAC (+), dTRE (+), ADH2s (-), OPTO (+).

En el agua de salida del colador, el agua de fermentación y uno de los tanques de fermentación de cemento (1) se encontró *Bacillus vallismortis*. Se presentaron características macroscópicas (colonias de textura mucosa, planas, borde irregular y opacas) y microscópicas de bacilos Gram positivos esporulados. Éstas son bacterias aerobias, que hidrolizan almidón, y están presentes en suelo. Utilizando en los tres casos la tarjeta BCL se obtuvo un 85% de probabilidad en el agua de salida del colador y un 93% de probabilidad en el agua de fermentación y uno de los tanques de fermentación. Detalles bioquímicos: BXYL (+), LysA (+), AspA (-), LeuA (+), PheA (-), ProA (-), BGAL (+), PyrA (+), AGAL (+), AlaA (-), TyrA (-), BNAG (-), APPA (+), CDEX (+), dGAL (-), GLYG (+), INO (-), MdG (+), ELLM (+), MdX (-), AMAN (-), MTE (+), GlyA (-), dMAN (+),

dMNE (+), dMLZ (-), NAG (-), PLE (+), IRHA (-), BGLU (+), BMAN (-), PHC (-), PVATE (-), AGLU (+), dTAG (-), dTRE (-), INU (-), dGLU (-), dRIB (-), PSCNa (-), NaCl 6.5% (+), KAN (-), OLD (-), ESC (+), TTZ (-), POLYB_R (+). Detalles bioquímicos en que se diferencia la muestra del agua de fermentación de la muestra del agua a la salida del colador: INO (+), PVATE (+), AGLU (-), dTRE (+), INU (+), dGLU (+), dRIB (+). Detalles bioquímicos en que es diferente la muestra del tanque de fermentación de la muestra del agua de la salida del colador: LeuA (-), INO (+), PVATE (+), AGLU (-), dTRE (+), INU (+), dGLU (+), dRIB (+),

En uno de los tanques de fermentación de plástico negro cilíndrico de 1000 L (1) se encontró *Candida famata*. El crecimiento de estas colonias presentó características macroscópicas (colonias de textura cremosa, consistencia blanda y superficie lisa) y microscópicas de levaduras. Éstas pueden fermentar glucosa, galactosa y sacarosa, es variable a almidón, asociada a la cavidad bucal humana. 85% de probabilidad utilizando la tarjeta YST. Detalles bioquímicos: LysA (-), IMLTa (+), LeuA (+), ARG (+), ERYa (-), GLYLa(+), TyrA (-), BNAG (-), ARBa (+), AMYa (-), dGALa (+), GENa (-), dGLUa (+), LACa (+), MadGa (+), dCELa (+), GGT (+), dMALa (+), dRAFa (+), NAGA1 (-), dMNEa (+), dMELa (+), dMLZa (+), ISBEa (-), IRHAa (-), XLTa (-), dSORa (+), SACa (+), URE (-), AGLU (+), dTURa (+), dTREa (+), NO3a (-), IARA (+), dGATa (+), ESC (+), IGLTa (+), dXYLa (+), LATa (+), ACEa (+), CITa (+), GRTas (+), IPROa (+), 2KGa (+), NAGa (+), dGNTa (+).

En uno de los tanques de fermentación de cemento (2) se encontró *Aeromonas salmonicida*. Estas colonias presentaron características macroscópicas (colonias de borde entero, opacas y superficie lisa) y microscópicas de bacilos Gram negativos. Esta bacteria es anaerobia facultativa, presente en un medio acuoso y suelo. Patógena en peces. Usando la tarjeta GN se obtuvo un 92% probabilidad. Detalles bioquímicos: APPA (-), ADO (-), PyrA (+), IARL (-), dCEL (-), BGAL (-), H2S (-), BNAG (-), AGLTp (-), dGLU (-), GGT (-), OFF (-), BGLU (-), dMAL (-), dMNE (-), BXYL (-), BALap (-), ProA (+), LIP (-), PLE (-), TyrA (-), URE (-), dSOR (-), SAC (-), dTAG (-), dTRE (-), CIT (-), MNT (-), 5KG (-), ILATk (+), AGLU (-), SUCT (-), NAGA (-), AGAL (-), PHOS (-), GlyA (-), ODC (-), LDC (-), IHISa (-), CMT (-), BGUR (-), O129R (-), GGAA (-), IMLTa (-), ELLM (+), ILATa (-).

En la salida del colador y un tanque de fermentación de cemento (3) se encontró *Sphingomonas paucimobilis*. El crecimiento obtenido presentó características macroscópicas (colonias de consistencia blanda, planas y superficie lisa) y microscópicas de cocobacilos Gram negativos. Este microorganismo es aerobio, patógeno, se encuentra fácilmente en un medio acuoso y suelo. En los dos casos se utilizó la tarjeta GN, para la muestra de la salida del colador se obtuvo un 93% de probabilidad y para el tanque de fermentación un 88% de probabilidad. Detalles bioquímicos de la muestra de la salida del colador: APPA (+), ADO (-), PyrA (-), IARL (-), dCEL (-), BGAL (-), H2S (-), BNAG (-), AGLTp (+), dGLU (+), GGT (-), OFF (-), BGLU (-), dMAL (-), dMNE (-), BXYL (-), BALap (-), ProA (-), LIP (+), PLE (-), TyrA (+), URE (-), dSOR (-), SAC (-), dTAG (-), dTRE (-), CIT (-), MNT (-), 5KG (-), ILATk (+), AGLU (+), SUCT (+), NAGA (-), AGAL (-), PHOS (+), GlyA (+), ODC (-), LDC (-), IHISa (-), CMT (+), BGUR (-), O129R (-), GGAA (+), IMLTa (-), ELLM (+), ILATa (-). Detalles bioquímicos en que difiere la muestra del tanque de fermentación: APPA (-), dCEL (+), BGAL (+), AGLTp (-), GGT (+), BGLU (+), dMAN (+), dMNE (+), BXYL (+), LIP (-), SAC (+), dTAG (+), dTRE (+), ILATk (-), AGLU (-), SUCT (-), PHOS (-), GlyA (-), CMT (-), GGAA (-), ELLM (-).

En uno de los tanques de fermentación de plástico negro cilíndrico de 2000 L se encontró *Acinetobacter lwoffii*. El crecimiento obtenido presentó características macroscópicas (colonias de borde entero, opacas, consistencia blanda y superficie lisa) y microscópicas de bacilos largos Gram negativos. Es aerobio, patógeno, frecuente en el suelo. 92% de probabilidad utilizando la tarjeta GN. Detalles bioquímicos: APPA (-), ADO (-), PyrA (-), IARL (-), dCEL (-), BGAL (-), H2S (-), BNAG (-), AGLTp (-), dGLU (-), GGT (-), OFF (-), BGLU (-), dMAL (-), dMAN (-), dMNE (-), BXYL (-), BALap (-), ProA (-), LIP (-), PLE (-), TyrA (+), URE (-), dSOR (-), SAC (-), dTAG (-), dTRE (-), CIT (+), MNT (-), 5KG (-), ILATk (+), AGLU (-), SUCT (+), NAGA (-), AGAL (-), PHOS (-), GlyA (+), ODC (-), LDC (-), IHISa (-), CMT (+), BGUR (-), O129R (-), GGAA (-), IMLTa (-), ELLM (+), ILATa (-).

En uno de los tanques de fermentación de plástico negro cilíndrico de 1000 L (2) se encontró *Cryptococcus laurentii*. El crecimiento obtenido presentó características macroscópicas (colonias de borde entero, opacas, superficie lisa) y microscópicas de levaduras. Es un hongo patógeno, saprófito, no fermenta glucosa, sacarosa ni lactosa y asociado al suelo. Con la tarjeta YST arrojó un 87% de probabilidad. Detalles bioquímicos: LysA (+), IMLTa (+), LeuA (+), ARG (+), ERYa (-), GLYLa(+), TyrA (+), BNAG (-), ARBa (+), AMYa (-), dGALa (+), GENa (-), dGLUa (+), LACa (+), MadGa (-), dCELa (-), GGT (+), dMALa (+), dRAFa (+), NAGA1 (-), dMNEa (+), dMELa (+), dMLZa (-), ISBEa (+), IRHAa (-), XLTa (-), dSORa (-), SACa (+), URE (+), AGLU (+), dTURa (-), dTREa (+), NO3a (-), IARA (+), dGATa (+), ESC (+), IGLTa (+), dXYLa (+), LATa (+), ACEa (+), CITa (+), GRTas (+), IPROa (+), 2KGa (+), NAGa (+), dGNTa (+).

En el agua de salida del colador, el agua de fermentación y uno de los tanques de fermentación de plástico se encontró *Bacillus cereus*. El crecimiento obtenido presentó características macroscópicas (crecimiento de colonias de consistencia mucosa, planas y opacas) y microscópicas de Bacilos Gram positivos esporulados. Es aerobio, causa intoxicación alimentaria y es frecuente en el suelo. En los tres casos se utilizó la tarjeta BCL, se obtuvo un 93% de probabilidad para la muestra del agua a la salida del colador, un 95% de probabilidad para la muestra del agua de fermentación y un 89% de probabilidad para la muestra del tanque de fermentación. Detalles bioquímicos de la muestra de la salida del colador: BXYL (-), LysA (-), AspA (-), LeuA (-), PheA (+), ProA (-), BGAL (-), PyrA (-), AGAL (-), AlaA (-), TyrA (-), BNAG (+), APPA (-), CDEX (-), dGAL (-), GLYG (-), INO (-), MdG (-), ELLM (+), MdX (-), AMAN (-), MTE (+), GlyA (-), dMAN (-), dMNE (-), dMLZ (-), NAG (-), PLE (-), IRHA (-), BGLU (-), BMAN (-), PHC (-), PVATE (+), AGLU (-), dTAG (-), dTRE (+), INU (-), dGLU (+), dRIB (+), PSCNa (-), NaCl 6.5% (+), KAN (+), OLD (-), ESC (+), TTZ (-), POLYB_R (+). Detalles bioquímicos de la muestra del agua de fermentación: PyrA (+), APPA (+), ELLM (-). Detalles bioquímicos de la muestra del tanque de fermentación: LeuA (+), PyrA (+), TyrA (+), APPA (+), MTE (-).

En uno de los tanques de fermentación de cemento (4) se encontró *Geotrichum capitatum*. Las colonias presentaron características macroscópicas (textura cremosa, elevación convexa y borde entero) y microscópicas de levaduras. Hongo levaduriforme patógeno, ambiental cosmopolita. 93% de probabilidad utilizando la tarjeta YST. Detalles bioquímicos: LysA (+), IMLTa (-), LeuA (+), ARG (+), ERYa (-), GLYLa(+), TyrA (+), BNAG (-), ARBa (-), AMYa (-), dGALa (-), GENa (-), dGLUa (+), LACa (-), MadGa (-), dCELa (-), GGT (-), dMALa (-), dRAFa (-), NAGA1 (-), dMNEa (+), dMELa (-), dMLZa (-), ISBEa (+), IRHAa (-), XLTa (-), dSORa (-), SACa (-), URE (+), AGLU (-), dTURa (-), dTREa (-), NO3a (-), IARA (-), dGATa (+), ESC (-), IGLTa (+), dXYLa (-), LATa (+), ACEa (+), CITa (-), GRTas (+), IPROa (+), 2KGa (+), NAGa (-), dGNTa (+).

En Colombia, la fermentación de almidón de yuca se utiliza para la producción de almidón agrio, llevado a cabo principalmente, en condiciones de anaerobiosis y la cual requiere de una etapa posterior de secado. Sin embargo, hay pocos estudios relacionados con el aislamiento e identificación de microorganismos aerobios procedentes de estos procesos. Sánchez (Sánchez H. *et al.* 2005), encontraron en muestras de almidón de yuca: 8 colonias del género *Bacillus*, una de *Kurtia* y otra de *Clostridium*, identificadas bioquímicamente; por otro lado, Ampe (2001) reportó *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Weisella paramesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus casei*, identificados molecularmente. Asimismo, Omar (Omar *et al.* 2000) en otros estudios, encontró las mismas especies de *Lactobacillus* y adicionalmente, reporta *Lactobacillus hilgardii*, *Lb. buchneri* y *Lb. fermentum*.

En este estudio, también se aislaron microorganismos patógenos como *Aeromonas salmonicida*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Cryptococcus laurentii*, *Geotrichum capitatum* causando infecciones hospitalarias entre otros; y en particular *Bacillus cereus* por su constante presencia en las muestras, a pesar de su capacidad amilolítica, genera riesgo de intoxicación diarreica y emética por consumo en alimentos. Los cuales deben ser descartados para futuros procesos de fermentación industrial o extracción de enzimas. Actualmente, los productos de estas modificaciones artesanales son utilizados para la industria de la panadería, por lo que sufren un proceso térmico que es suficiente para evitar efectos negativos que pueden provocar estos patógenos. Sin embargo, esto depende del buen procesamiento en la cocción o de la concentración de estos en el producto final

Por el contrario, *Bacillus amiloliquefaciens* y *Bacillus vallismortis* serían buenos candidatos para procesos de almidones modificados, debido a su capacidad de hidrolizar almidón, característica principal en la cual se basó esta investigación y que difiere de otros estudios. Kimaryo (2000) sugiere la inoculación con una o varias especies o cepas de BAL seleccionadas para proporcionar un mejor control y calidad de productos fermentados de almidón de yuca, como el kivunde en Tanzania. Sin embargo, Quintero (2012) sugiere el uso de *Aspergillus niger*.

Por su alta actividad amilolítica, varias cepas proporcionan azúcares tales como glucosa o maltosa que puede ser utilizado como una fuente de energía por otros microorganismos, Ampe (2001) sugiere que bacterias como *Lb. manihotivorans* está presente sólo durante el primer período de fermentación, al degradar el almidón, mientras que *Lb. plantarum* se encuentra en todo el proceso y contribuye a la acidificación del producto. Otras investigaciones en la fermentación de la yuca de Brasil, Lacerda (2005) documentó la presencia de los hongos *Geotrichum*, *Galactomyces* y *Issatchenkia* spp.

La presencia de aislamientos patógenos en la producción natural de almidón agrio muestra la importancia de la implementación de BPM (Torres *et al.* 2010). Además, éstos plantean la necesidad de una producción estandarizada en la que se garantice que estos cultivos bacterianos se encuentran libres de los mismos. Por otro lado, la identificación de bacterias amilolíticas se presenta como antecedente para futuros procesos en que se quiera estudiar el uso de una única cepa o cepas específicas como modificadoras de almidones.

Presencia de hidrólisis de almidón o actividad amilolítica

De los microorganismos aislados y purificados, se descartaron las levaduras y 11 aislamientos de bacterias tras encontrar poca o nula actividad amilolítica (menor a 1 mm de radio). A un total de 36 aislamientos bacterianos diferentes con actividad amilolítica se les midió el radio del halo de hidrólisis de almidón y se reporta la distancia promedio de los halos y el error estándar, además se realizó una comparación múltiple utilizando el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) DE Fischer con un nivel del 95% de confianza (Tabla 2) como método de clasificación de un mayor potencial de producción de amilasas. Algunos de estos microorganismos provenían de más de una fuente, por lo que fueron renombradas como FD (fermentación y salida del rallador), FA (fermentación y salida del colador), las otras son nombradas sólo por la fuente de la que provenían; AD (líquido inicial de fermentación), DS (salida del rallo), FC (Fermentación en tanque de cemento).

Tabla 2. Actividad amilolítica en microorganismos aislados del almidón de yuca en una rallandería artesanal.

Cód.	D. prom ± EE (mm)	Cód.	D. prom ± EE (mm)	Cód.	D. prom ± EE (mm)	Cód.	D. prom ± EE (mm)
FD1	7.3 ± 0.3 ^a	AD2	7.0 ± 0.0 ^{ab}	FD3	6.7 ± 1.2 ^{abc}	AD4	6.7 ± 0.3 ^{abc}
FC5	6.7 ± 0.6 ^{abc}	AD6	6.7 ± 0.3 ^{abc}	AD7	6.7 ± 0.3 ^{abc}	FC8	6.3 ± 0.3 ^{abcd}
DS9	6.3 ± 0.3 ^{abcd}	AD10	6.3 ± 0.3 ^{abcd}	AD11	6.3 ± 0.9 ^{abcd}	AD12	6.3 ± 0.9 ^{abcd}
AD13	6.0 ± 0.6 ^{abcde}	AD14	6.0 ± 0.0 ^{abcde}	AD15	6.0 ± 0.6 ^{abcde}	FC16	5.7 ± 0.3 ^{bcdef}
AD17	5.7 ± 0.3 ^{bcdef}	DS18	5.7 ± 0.9 ^{bcdef}	FA19	5.7 ± 0.9 ^{bcdef}	FA20	5.7 ± 0.3 ^{bcdef}
DS21	5.3 ± 0.7 ^{cdef}	FC22	5.3 ± 0.3 ^{cdef}	AD23	5.3 ± 0.7 ^{cdef}	AD24	5.3 ± 0.3 ^{cdef}
AD25	5.3 ± 0.3 ^{cdef}	AD26	5.3 ± 0.9 ^{cdef}	AD27	5.3 ± 0.3 ^{cdef}	DS28	5.3 ± 0.7 ^{cdef}
AD29	5.3 ± 0.9 ^{cdef}	AD30	5.0 ± 0.0 ^{defg}	AD31	5.0 ± 0.6 ^{defg}	FC32	4.7 ± 0.3 ^{efg}
AD33	4.3 ± 0.3 ^{fg}	FC34	4.3 ± 0.3 ^{fg}	FC35	4.3 ± 0.3 ^{fg}	AD36	3.7 ± 0.7 ^g

Los microorganismos con mayores halos de hidrólisis de almidón coinciden con algunos de los identificados como *Bacillus amyloliquefaciens* (FD1, AD4), *Bacillus vallismortis* (AD2, FD3, FC5) y *Leuconostoc mesenteroides* (FC8) son bacterias prometedoras para procesos industriales como la producción de amilasas o la degradación de almidón y producción de dextrinas y etanol, entre otros. También sugiere su uso como bacterias nativas en fermentaciones naturales como la producción de almidón agrio, de la cual se recolectaron las muestras. Además, estas podrían ser parte de procesos de modificación combinado en el que se requiera una etapa de hidrólisis de almidón, debido a la producción de azúcares como glucosa o maltosa que además son fuente energética de otros tipos de microorganismos.

CONCLUSIONES

En el proceso de producción artesanal de almidón agrio se caracterizaron macro y microscópicamente un total de 76 aislamientos microbianos aerobios. El almidón nativo en este proceso está expuesto a diferentes condiciones ambientales, lo que hace que la obtención de almidón agrio no sea un proceso controlado ni estandarizado. Las condiciones ambientales, así como el tipo de tanque que se utiliza en la fermentación, influyen en la variabilidad de la carga microbiana de cada uno de los tanques y más aún cuando no se presentan condiciones específicas para favorecer o inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos de interés.

La identificación de microorganismos demuestra la variedad de microorganismos presentes en las fermentaciones, entre los que se encontraron *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus cereus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Saccharomyces cerevisiae*. Con base en los microorganismos patógenos encontrados, es clara la necesidad de controlar el proceso, usando microorganismos benéficos o no patógenos que posean actividad amilolítica. Los microorganismos patógenos encontrados como *Aeromonas salmonicida*, *Geotrichum capitatum*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter lwolfii*, *Cryptococcus laurentii* y *Bacillus cereus* evidencian la necesidad de la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura en la producción de almidones agrios.

Este estudio puede ser utilizado como antecedente para investigaciones de mejoramiento de producción de almidón fermentado, por ejemplo, en los procesos de hidrólisis de almidón, en los que una gran variedad de microorganismos se ven involucrados. Es importante medir la actividad amilolítica de los microorganismos debido a que éstas pueden actuar en conjunto en diferentes etapas fermentativas. Además, medir la actividad amilolítica en aislamientos, que podrían utilizarse para la extracción de amilasas en la hidrólisis del almidón.

NOTACIÓN

2KGa: Asimilación Ceto-D-Gluconato	GlyA: Glicina-Arllamidasa
5KG: 5-Ceto-D-Gluconato	GLYG: Glicogeno
ACEa: Asimilación Acetato	GLYLa: Asimilación Glicerol
ADH1: Arginina Dihidrolasa 1	GRTas: Asimilación Glucuronato
ADH2s: Arginina Dihidrolasa 2	H2S: Producción de H2S
ADO: Adonitol	INO: myo-Inositol
AGAL: Alfa-Galactosidasa	INU: Inulina
AGLU: Alfa-Glucosidasa	LAC: Lactosa
AGLTp: Glutamil Arilamidasa Pna	LACa: Asimilación Lactosa
AlaA: Alanina-Arilamidasa	IARaA: Asimilación L-Arabinosa
AMAN: Alfa-Manosidasa	IARL: L-Arabitol
AMY: D-Amigdalina	LATa: Asimilación D-Lactato
AMYa: Asimilación Amigdalina	LDC: Lisina Decarboxilasa
APPA: Alanina-Fenilalanina–Prolina-Arilamidasa	LeuA: Leucina-Arilamidasa
ARBa: Asimilación Arbutina	IGLTa: Asimilación L-Glutamato
ARG: Arginina GP	IHiSa: Asimilación L- Histidina
AspA: L-Aspartato Arilamidasa	LIP: Lipasa
BACI: Resistencia a Bacitrina	ILATa: Asimilación L-Lactato
BAlap: Beta-Alanina-Amilamidasa-pNA	ILATk: L- Lactato-Alcanilización
BGAL: Beta-Galactosidasa	IMLTa: Asimilación L-Malato
BGAR: Beta-Galatopiranosidasa	IPROa: Asimilación L-Prolina
BGLU: Beta-Glucosidasa	IRHAa: Asimilación Ramnosa
BGUR: Beta–Glucoronidasa	ISBEa: Asimilación L-Sorbosa
BMAN: Beta-Manosidasa	KAN: Resistencia Kanamicina
BNAG: Beta-N-Acetil-Glucosaminidasa	LysA: L-Lisina-Arilamidasa
BXYL:Beta-Xilosidasa	MagGa: Asimilación Metil-D-Glucopiranosido
CDEX: Ciclodextrina	MBdG: Metil-B-D-Glucopiranosido
CIT: Citrato (sodio)	MdX: Metil-D-Xilosida
CITa: Asimilación Citrato (sodio)	MTE: Maltotriosa
CMT: Coumarato	MNT: Malonato
dCEL: D-Celobiosa	NAG: N-Acetil-D-Glucosamina
dCELa: Asimilación D-Celobiosa	NAGa: Asimilación N-Acetil-Glucosamina
dGAL: D-Galactosa	NAGA: Beta-N-Acetil-Galactosamidasa
dGATa: Asimilación D-Galacturonato	NAGA1: PNP-N-Acetil-BD- Galactosaminidasa 1
dGALa: Asimilación D-Galactosa	NC 6.5/NaCl 6.5%: Crecimiento en 6.5% NaCl
dGLU: D-Glucosa	NO3a: Asimilación Nitrate
dGLUa: Asimilación D-Glucosa	NOVO: Resistencia a Novobiocina
dGNTa: Asimilación D-Gluconato	O129R: O/Resistencia 129
dMAL: D-Maltosa	ODC: Ornitina Decarboxilasa
dMALa: Asimilación D-Maltosa	ODEC: Base Decarboxilasa
dMAN: D-Manitol	OFF: Fermentación/Glucosa
dMELa: Asimilación D-Melibiosa	OLD: Resistencia Oleandomicina
dMLZ: D-Melesitosa	OPTO: Resistencia a Optochina
dMLZa: Asimilación D-Melesitosa	PheA: Fenilalanina Arilamidasa
dMNE: D-Manosa	PHC: Fosforil Colina
dMNEa: Asimilación D-Manosa	PHOS: Fosfatasa
dRAF: D-Rafinosa	PIPLC: Fosfatidilinositol Fosfolipasa C
dRAFa: Asiilación D- Rafinosa	PLE: Palatinosa
dRIB: D-Ribosa	POLYB/ POLYB_R: Resistencia Polimixina B
dSOR: D-Sorbitol	ProA: L-Prolina-Arylamidasa
dSORa: Asimilación D-Sorbitol	PUL: Pululan
dTAG: D-Tagatosa	PVATE: Piruvato
dTRE: D-Trealosa	PSCNa: Asimilación Putrecina
dTREa: Asimilación D-Trealosa	PyrA: L-Pirrolidonil-Arilamidasa
dTURa: Asimilación D-Turanosa	SAC: Sacarosa/Sucrosa
dXYL: D-Xilosa	SACa: Asimilación Sacarosa/Sucrosa
dXYLa: Asimilación D-Xilosa	SAL: Salicina
ELLM: Ellman	SUCT: Succinato-Alcalinización
ERYa: Asimilación Eritritol	TyrA: Tirosina-Arilamidasa
ESC: Hidrólisis Esculina	TTZ: Tetrazolium Red
GENa: Asimilación Gentiobiosa	URE: Ureasa
GGAA: Glutamina-Glicina-Arginina Arilamidasa	XLTa: Asimilación Xilitol
GGT: Gamma-Glutamil-Transferasa	

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias, Luz Marina Gómez (Laboratorio de Microbiología de la Fundación Intal) Sebastián Ochoa, Rosalba Alzate y Angela Mora del Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos y al Laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

- Acosta, H.A.; Villada, H. S. y Prieto P. A., Envejecimiento de almidones termoplásticos agrios de yuca y nativos de papa por microscopía de fuerza atómica, *Información tecnológica*. [online]. 2006, vol.17, n.3, pp. 71-78. ISSN 0718-0764. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642006000300011>
- Alarcón, M. y Dufuor D. Almidón agrio de yuca en Colombia, en *La yuca en el tercer milenio* Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización, primera edición, CIAT, 470–502, Cali, Colombia (1998)
- Ampe, F.; Sirvent, A. y Zakhia, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *International Journal of Food Microbiology* 65 (1-2): 45–54 (2001)
- Benesi, I. R. M y otros cuatro autores. The effect of genotype, location and season on cassava starch extraction. *Euphytica* 160(1): 59–74 (2008)
- Benesi, I. R. M.; Labuschagne, M. T.; Dixon, A. G. O. y Mahungu, N. M. Stability of native starch quality parameters, starch extraction and root dry matter of cassava genotypes in different environments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(11): 1381–88 (2004)
- BioMérieux, Inc. Vitek 2: Healthcare. *Biomérieux*. <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>. (2015)
- Cadena, M. P.; Villarraga, E. C.; Luján, D. E. y Salcedo, J. G. Evaluación de la agroindustria del almidón agrio de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Córdoba y Sucre. *Temas agrarios* 11(1): 43–53 (2006)
- Cárdenas, O. S. y Buckle, T. S. Sour cassava starch production: a preliminary study. *Journal of Food Science* 45(6): 1509–12 (1980)
- Cereda, M. P. Microorganismos e ácidos orgânicos ocorrentes na fermentação de fécula de mandioca. *Anais da academia brasileira de ciências* 47: 361–62 (1975)
- Figuroa, C.; Davila A. M. y Pourquié J. Lactic acid bacteria of the sour cassava starch fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 21(2): 126–30 (1995)
- George, M.; Moorthy, S. N. y Padmaja, G. Biochemical changes in cassava tuber during fermentation and its effect on extracted starch and residue. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69(3): 367–71. (1995)
- Kimaryo, V.M.; Massawe, G.A.; Olasupo, N.A. y Holzapfel, W.H. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of 'kivunde', a traditional Tanzanian food product. *International Journal of Food Microbiology* 56(2-3): 179–90 (2000)
- Lacerda, I y otros cinco autores. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 105(2): 213–19 (2005)
- Madigan, Michael T. y otros cinco autores. *Brock Biology of Microorganisms*. 14th edition. Pearson, 85 - 117 San Francisco, Estados Unidos (2014)
- Marcon, M.J.A. y otros cinco autores. The effect of fermentation on cassava starch microstructure. *Journal of Food Process Engineering* 29(4): 362–72 (2006)
- McGrance, S. J.; Cornell H. J. y Rix C. J. A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. *Starch - Stärke* 50(4): 158–63 (1998)
- Nunes, O. L. G. S. y Cereda, M. P. Efeito de inóculos na fermentação da fécula de mandioca: qualidade organoléptica. En *VIII Congresso brasileiro de mandioca* (1994)
- Olomo, V. y Ajibola, O. Processing factors affecting the yield and physicochemical properties of starch from cassava chips and flour. *Starch - Stärke* 55(10): 476–81 (2003)
- Omar, N. B. y otros cuatro autores. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Systematic and applied microbiology* 23(2): 285–91 (2000)

- Parada, J. L.; Zapata E.; Fabrizio, S. V. y Martínez, A. Microbiological and technological aspects of cassava-starch fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12(1): 53–56 (1996)
- Quintero C.; Giraldo, V. G. y Lucas J. Modificación del almidón de yuca por *A. niger*. *Vitae* 19(1) (2012)
- Rojas-Triviño, A. *Conceptos y práctica de microbiología*. Primera edición. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira 13 - 68, Palmira, Colombia (2011)
- Sánchez H., Claudia P. y otros seis autores. Estudio de cepas nativas amilolíticas. *Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica* 12(2): 21–28 (2005)
- Torres, Patricia y otros cuatro autores. Una mirada a la agroindustria de extracción de almidón de yuca, desde la estandarización de procesos. *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia* 14: 23–38 (2010)
- Vargas, P.; Araya, Y.; López, R. y Bonilla, A.R. Características de calidad y digestibilidad in vitro del almidón agrío de yuca (*Manihot esculenta*) producido en Costa Rica. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 3(1): 1–13 (2012)
- Witczak, M.; Ziobro, R.; Juszcak, L. y Korus, J. Starch and starch derivatives in gluten-free systems – A review. *Journal of Cereal Science* (2015)