

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Estudio etnofermentológico y caracterización de la actividad celulolítica en  
masato procedente del Valle del Río Apurímac y Ene - 2004**

**Tesis para optar el título profesional de Bióloga,  
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

**Bach. Kusi Yaranga Palomino**

Asesor:

**Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua**

**Ayacucho - Perú**

**2006**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Octavio y Adela,  
quienes me apoyaron en la consecución de mis ideales

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por haberme permitido aprender en sus aulas las bondades e importancia de las Ciencias Biológicas.

A las municipalidades distritales de Pichari y Sivia, y a sus alcaldes Ing. Joaquín Dipas Huamán y Lic. Carlos Rúa Carbajal, respectivamente, por el apoyo logístico y dotación de personal guía para el recorrido y contacto con las comunidades nativas del Valle del Río Apurímac y Ene.

A los Señores profesores de la Escuela de Formación Profesional de Biología por sus sabias enseñanzas teóricas, prácticas y de aspectos formativos, los que contribuyeron a la consecución de mi carrera profesional.

Al Mg. Fidel Mujica Lengua, por su asesoramiento en la elaboración del presente trabajo de investigación.

## ÍNDICE

	Pag.
<b>DEDICATORIA.</b>	iv
<b>AGRADECIMIENTO.</b>	iv
<b>RESUMEN.</b>	iv
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO.</b>	3
2.1. Comunidades nativas de la amazonía peruana y del VRAE.	3
2.1.1. Diversidad.	3
2.1.2. Sistema de alimentación.	5
2.1.3. Forma de vida.	5
2.1.4. Salud y educación.	5
2.2. Bebidas fermentadas tradicionales.	6
2.2.1. Diversidad.	6
2.2.2. El masato.	7
2.2.2.1. Antecedentes.	7
2.2.2.2. Elaboración.	10
2.2.2.3. Consumo.	13
2.3. Celulosa.	14
2.3.1. Características e importancia.	14
2.3.2. Degradación biológica de la celulosa.	15
2.4. Organismos celulolíticos.	19
2.4.1. Bacterias.	19
2.4.2. Hongos.	20
2.4.3. Insectos.	21
2.4.4. Mamíferos.	23
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	24
3.1. Material.	24
3.1.1. Recolección de la muestra biológica.	24
3.2. Métodos.	24
3.2.1. Descripción de la tecnología tradicional de elaboración del masato.	24
3.2.2. Obtención del extracto enzimático crudo.	25
3.2.3. Caracterización de la actividad celulolítica en masato.	25

3.2.4. Determinación de azúcares reductores.	29
3.2.5. Determinación de acidez total titulable.	30
3.2.6. Determinación de pH.	30
3.2.7. Determinación de sólidos totales.	31
3.2.8. Determinación de azúcares totales.	31
3.2.9. Análisis estadístico.	32
<b>IV. RESULTADOS.</b>	<b>33</b>
<b>V. DISCUSIÓN.</b>	<b>51</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	<b>57</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.</b>	<b>59</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO</b>	<b>64</b>

## **Estudio etnofermentológico y caracterización de la actividad celulolítica en masato procedente del Valle de Río Apurímac y Ene – 2004.**

Autor: Yaranga Palomino, Kusi

Asesor: Mujica Lengua, Fidel R.

### **RESUMEN**

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante el año 2004. La finalidad del mismo, fue describir las variedades de masato elaboradas en el Valle de Río Apurímac y Ene (VRAE), prestando especial interés en la actividad celulolítica. Para tal fin se realizaron visitas a las comunidades nativas ubicadas a lo largo del Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE), y mediante observación directa se aplicaron encuestas para recabar información acerca de la elaboración y consumo del masato.

Las muestras de masato obtenidas fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, a partir de ellas se obtuvo el extracto enzimático crudo, con los cuales se ensayaron las determinaciones enzimáticas correspondientes a diferentes temperaturas (25, 37, 50°C) y pH (3.3, 4.3, 5.3). Como resultado se obtuvo que existe actividad de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en el extracto enzimático crudo de las diez muestras de masato; sin embargo se observó que la actividad de  $\beta$ -glucosidasas fue marcadamente mayor seguida de la actividad de exoglucanasas y por último de endoglucanasas; asimismo por las características propias de la fermentación del masato se pudo determinar que éstas son enzimas que actúan bajo condiciones ácidas. Adicionalmente, se realizó la caracterización del masato obteniéndose un pH comprendido entre 4.1 y 4.6; acidez total se encuentra en un rango de 0.078 a 0.142%; azúcares reductores, entre 1.71 y 2.68 mg/ml; azúcares totales, entre 2.10 y 4.10 mg/ml; y, sólidos totales, comprendido entre los valores de 5.2 y 8.3%.

La elaboración del masato en las comunidades nativas del Valle del Río Apurímac y Ene obedece a un patrón común, en cada una existen detalles que los hacen característicos, es decir se manejan proporciones diferentes respecto a la materia prima, cantidad de agua, tiempo de cocción de la yuca, tiempo de fermentación, pero los pasos que se siguen para obtener el producto final son los mismos.

**Palabras clave:** masato, actividad celulolítica, endoglucanasas, exoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas

## I. INTRODUCCIÓN

La elaboración de bebidas fermentadas ha sido una práctica común desde las culturas más antiguas. Una de las bebidas fermentadas tradicionales de gran importancia en las comunidades nativas de la amazonía, es el masato, llamado también cauim, que se obtiene por fermentación espontánea utilizando como sustrato yuca y camote. Esta bebida insalivada cumple una función en estas comunidades, toda vez que es utilizada no solamente como bebida sino también como alimento. Actualmente la información con que se cuenta acerca de los aspectos etnofermentológicos, bioquímicos y microbiológicos es muy escasa, motivo por el cual se justifica la necesidad de realizar diferentes estudios a fin de generar conocimiento científico sobre este producto fermentado, prestando especial interés en la naturaleza de la actividad celulolítica.

Dicha actividad es realizada por la celulasas, éstas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en la celulosa, que representa uno de los materiales más utilizados por el hombre, se encuentra comercialmente disponible en una gran variedad de presentaciones, siendo el papel una de las más conocidas.

Los complejos multienzimáticos producidos por microorganismos celulolíticos son de gran importancia y presentan un alto potencial biotecnológico en diferentes industrias: pulpa y papel, vitivinícola, cervecera, jugos, panadería, detergentes, textil, entre otras.

La presente investigación se centra en el estudio de aspectos básicos referidos a la elaboración y consumo del masato, así como a la actividad celulolítica a diferentes condiciones de pH y temperatura a las cuales alcanza la máxima actividad y estabilidad. Los objetivos que se plantearon fueron:

1. Describir y caracterizar las variedades de masato que se elaboran en el Valle del Río Apurímac y Ene, así como su consumo.
2. Evaluar la actividad celulolítica en muestras de masato que se elaboran en el Valle del Río Apurímac y Ene.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. COMUNIDADES NATIVAS DE LA AMAZONÍA PERUANA Y DEL VALLE DEL RIO APURIMAC Y ENE (VRAE)

#### 2.1.1. Diversidad

La palabra etnia es considerada bajo la acepción de comunidad humana definida por afinidades raciales, lingüísticas, culturales, etc. Los grupos étnicos se identifican a sí mismos como poseedores de un origen común y portadores de elementos, rasgos o características importantes de una cultura propia, y cuyos miembros además participan en actividades y prácticas grupales que sirven para mantener y reproducir o recrear dichas características culturales (19).

Bajo este panorama podemos afirmar que, en la selva peruana, los grupos nativos se hallan en número de 64, presentan una vasta riqueza cultural así como una notable diversidad. La frecuencia de caza varía considerablemente, en algunas áreas es abundante, pero puede ser rápidamente depredada por la cacería, en otros, especialmente donde el clima es muy húmedo o muy seco resulta casi imposible hallar caza que no sean pájaros. Existe vida acuática en los numerosos ríos y arroyos, pero es difícil la pesca en grandes cantidades, especialmente en la época de crecida, muchas de las tribus dependen grandemente de insectos, incluyendo hormigas, larvas,

escarabajos y caracoles, durante una parte del año. Los nativos viven en pequeños asentamientos familiares cazando y recolectando la mayor parte del tiempo (11). La selva peruana se extiende hasta algunas áreas andinas, la porción por encima de los 2,500 metros está casi todo el tiempo cubierto de neblina densa, a pesar de que la precipitación anual generalmente no excede los 2,000 mm, también existen zonas de fuerte precipitación (sobre los 3,800 mm anuales, sin estación seca), los nativos permanecen donde hay estación seca, aunque sea corta (10). Es en ésta porción de territorio donde se encuentra el Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE).

El VRAE es una cuenca hidrográfica formada por los ríos que llevan su nombre, está ubicado en la parte sur-oriental del Perú. Su población está dividida en dos estratos: urbano y rural; el segmento urbano lo constituyen básicamente las capitales de los distritos, mientras que la población rural se encuentra en las comunidades, a este segmento pertenece la población nativa del valle, constituida básicamente por el grupo nativo Asháninka o Campa (2), cuyo territorio se extiende por los ríos Perené, Ene y Apurímac, por los ríos Pongoa y Tambo (que al unirse con el río Urubamba forma el Ucayali). Los Asháninkas se extienden también por el bajo Urubamba, Alto Ucayali y afluentes de éste como el Sheshea, Yurúa, Pachitea y Pichis (10). Cabe destacar que aproximadamente el 90% de las comunidades nativas presentes en el VRAE pertenecen a este grupo. Las razones de un mayor asentamiento de este grupo parece ser el factor de la calidad de la tierra, temperaturas más bajas, la menor cantidad de insectos, el aislamiento proteccionista y también la mayor facilidad de desplazamiento, a pesar del terreno escabroso. Además la población Asháninka es posiblemente una de las más numerosas de la selva peruana, pues no sólo habitan la selva en sí, sino que penetran parte de los andes centrales, ahora su densidad

poblacional incluye la presencia de colonos, que son personas de fuera que comparten sus costumbres y por tanto también su territorio (11).(Anexo N° 01).

Finalmente otro grupo nativo presente en el VRAE pertenece a los Matsiguengas, aunque en menor proporción que el antes mencionado, se hallan ubicados en Kimbiri y Vilcabamba (2).

#### 2.1.2. Sistema de Alimentación

La alimentación de las comunidades nativas del VRAE tiene como base a la agricultura y se caracteriza por un marcado énfasis en el cultivo de la yuca dulce o amarga, consumida bajo la forma de masato o simplemente cocida, además la yuca es considerada como el alimento más significativo y representativo, su utilización es parte de la vida cotidiana, no prescindiendo de ella en ningún momento. El maíz, alimento nutricionalmente más completo que la yuca, es invariablemente un fruto de menor importancia. Las principales fuentes de proteínas y grasas son esencialmente el pescado, huevos, aves, insectos y animales salvajes (11).

#### 2.1.3. Forma de Vida

Los nativos habitan en viviendas construidas según los patrones culturales tradicionales, a base de troncos, palmeras y hojas de platanales. Está presente la poligamia, practicada por el jefe de la comunidad, mas no en los demás miembros de ella; además, las decisiones y futuro de la comunidad nativa son responsabilidad del jefe, elegido por ser el más fuerte y con mayor experiencia. Se hallan establecidos en un territorio fijo, es decir hay ausencia de movimientos migratorios (2).

#### 2.1.4. Salud y Educación

El VRAE cuenta con 01 hospital, 07 centros de salud y 41 puestos de salud, estos últimos son los encargados de la atención a las comunidades nativas a través de movilidad motorizada o visitas médicas realizadas por el

personal de salud, sin embargo no cuentan con infraestructura ni equipamiento adecuado. Por otro lado, el agua es consumida directamente de los ríos y no cuentan con ningún tipo de instalación sanitaria (2).

En cuanto al sistema educativo, en el VRAE existen 310 centros educativos entre PRONOEI, nivel inicial, primario y nivel secundario, donde trabajan aproximadamente 799 docentes y la población estudiantil se estima en 27,797 niños y adolescentes, pero la calidad educativa es deficiente, el caso de las comunidades nativas es un ejemplo de esta situación. Hay un déficit en la oferta de docentes ya que en Pichari hay más de 27 comunidades nativas y sólo tienen nueve centros educativos con profesores nombrados, y es la municipalidad la que se encarga de solventar los salarios (2).

## 2.2. BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONALES

### 2.2.1. Diversidad

La elaboración de bebidas fermentadas ha sido una práctica común desde las culturas más antiguas, las que tuvieron en ellas una fuente de alimentación, un instrumento fundamental de cohesión, socialización y hospitalidad, un elemento importante en las actividades mágico-religiosas, y finalmente una forma de evasión junto a las danzas y cantos, en fiestas y acontecimientos colectivos o familiares (13).

Para denominar estas bebidas a través del tiempo se ha empleado el término "chicha" palabra aplicada principalmente a la bebida preparada con maíz fermentado, sin embargo es posible utilizar para su elaboración yuca o frutas, dicho elemento ha jugado un papel importante tanto en los rituales religiosos como en los ritos primitivos de fertilidad. Dicha palabra deriva de la forma de elaboración desde épocas precolombinas, donde la utilización de la saliva era importante para permitir la conversión de los almidones en azúcares y consecuentemente facilitar la fermentación y aumentar el volumen de alcohol, su

preparación difiere dependiendo del área geográfica donde se elabora y la materia prima con que se cuenta (7).

Existe una gran variedad de bebidas fermentadas siendo la gran mayoría de ellas tradicionales, es decir, que su difusión y consumo únicamente se conoce dentro de áreas geográficas limitadas. Entre éstas podemos mencionar a la chicha de jora, siete semillas, cabuya, molle, y el masato (25).

### 2.2.2. El Masato

El masato es una bebida tradicional indígena, se le considera una cerveza insalivada, por la forma peculiar de su elaboración, su consumo data desde épocas precolombinas. Se emplearon varios términos para denominar a esta bebida, como cauim, debido a que las primeras investigaciones realizadas al respecto se dieron en territorio brasilero, específicamente en la tribu Tupinambá, asimismo, en la selva peruana; como masato o simplemente chicha de yuca, en el Valle del Río Apurímac y Ene, con el nombre de pearenche.

#### 2.2.2.1. Antecedentes

Los primeros contactos entre europeos y aborígenes en tierras americanas durante el primer viaje de Cristóbal Colón, se dieron en condiciones desfavorables o en rápidos encuentros, por lo que, no hay ningún informe específico en cuanto a la forma de preparación de las bebidas de aquel pueblo, en todo el diario de navegación. Sin embargo, parece demostrarse la existencia de dos tipos de cerveza: la blanca como la leche, tal vez el cauim de mandioca, y la de maíz, la chicha; además del vino de fruta, como vino verde (18).

La verdadera cerveza insalivada es mencionada en el libro de Staden, H. (1557), su descripción es completa, como resultado del examen cotidiano de la vida tribal y de las costumbres de aquel pueblo. Según su minuciosa exposición, la preparación del cauim era confiado a las mujeres, inicialmente la mandioca era cocida en grandes vasijas y después trasvasada a otro recipiente

en el que las dejaban enfriar, entonces las jóvenes se sentaban en torno y mascaban los pedazos de yuca, arrojando el material insalivado en potes vertiéndoles agua hasta llenarlos, lo mezclaban todo y calentaban de nuevo la masa. Seguidamente el líquido era cambiado a recipientes especiales parcialmente enterrados para finalmente ser cubiertos. La fermentación se desarrollaba espontáneamente sin que se acondicionara semilla o inóculo. Así permanecía durante dos días, hasta que la bebían y se embriagaban (18).

Por otro lado, Anchieta, J. (1587) hace referencia al cauim como una especie de vino, preparado específicamente por mujeres, que luego de ser elaborado de la manera antes mencionada, se hervía por un intervalo de dos días, período después del cual lo bebían casi caliente para no sentir el efecto embriagador por mucho que la bebiesen bajo esa forma (18).

La siguiente descripción pertenece a Jean de Léry, durante su viaje a Brasil en el Siglo XVI, aplicada a los nativos Tupinambá que vivieron a lo largo de la costa central de Brasil, sin embargo, es típico de otras tribus ubicadas en ese territorio, el proceso de elaboración es descrito de manera semejante al mencionado líneas arriba, además agrega que según los archivos contemporáneos el servido del cauim en las fiestas era también tarea de las mujeres. Este se consumía muy caliente, para ello las mujeres ponían las ollas a fuego lento en la plaza central de la tribu. Una fiesta con cauim podía seguir durante dos o tres días. A veces los hombres se inducían al vómito para continuar bebiendo (39).

Otra versión acerca del cauim indica que éste, era el vino de los nativos Tupinambá que permitía alcanzar un estado alterado de la conciencia induciendo a visiones premonitorias y otros fenómenos paranormales. La vida social y religiosa de este pueblo era muy calurosa e incluía fiestas donde los miembros de la tribu la consumían profusamente (48).

Ana Paula Simão (1997), realizó estudios acerca de ésta bebida en los indios Guaraní, pudo comprobar que las celebraciones eran fiestas básicamente de carácter social y eventualmente religiosas. Dichas fiestas incluían un número alto de personas que variaban entre 2 y 5 mil. La bebida consumida alcanzaba a miles de litros. Estas fiestas tenían una duración de 2 a 5 días, en ese lapso de tiempo no se consumía ningún tipo de alimento, la bebida era considerada como una alternativa al consumo de alimentos. Los Guaraní se preparaban desde pequeños a través de una serie de rituales para beber y no embriagarse. En tales celebraciones bebían todos, incluso mujeres y niños (48).

La bebida era producida a partir de frutas y vegetales a través de un proceso de fermentación del almidón presente en ellos como la yuca, el maíz, la batata dulce y la guayaba. La fermentación se mantenía hasta alcanzar el grado alcohólico deseado, que normalmente no era muy alto. Cuando se deseaba un grado alcohólico mayor se agregaban azúcares bajo la forma de miel o frutas, hongos y otros vegetales. Tal bebida u otra con capacidad de embriagar la denominaron cauim independientemente de la materia prima empleada o forma de elaboración. Una vez lista, la bebida era servida, empleando conchas en vasijas, este trabajo también era realizado por las mujeres (48).

Se justifica entonces la afirmación de que las cervezas primitivas fueron a un tiempo bebida y alimento, fueron sopas predigeridas y fermentadas por bacterias y levaduras. La relación entre el proceso de fermentación y el estado fisiológico de la mujer, fue una creencia arraigada en todos los pueblos que ejercían la práctica de la elaboración de bebidas alcohólicas. El fenómeno bioquímico tuvo todas las características de un acto mágico, tanto por el inusitado acto de un "hervido en frío" como por la emisión misteriosa del dióxido de carbono, y aún por la mutación operada, en el gusto, en el aroma y en las propiedades engendradas en el líquido sacarino primitivo. La mujer por azar

vinculada con la elaboración de un fermentado debía de estar “pura” para que el proceso no se corrompiera, o en todo caso, si se tratara de una mujer casada debía abstenerse por unos días de mantener relaciones sexuales. Los hombres tenían la firme opinión de que si ellos masticaran las raíces para hacer la bebida, ésta no saldría buena, y creían indecente para los individuos de su sexo ponerse a hacer ese trabajo (18).

#### 2.2.2.2. Elaboración

##### **Materia Prima**

##### **YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

La palabra yuca deriva del portugués manioc . En Brasil se le conoce con los nombres nativos de “mandioca”, “aypin”, “macaxeira”, “maniba”, en Venezuela, Colombia, Cuba, Costa Rica y Perú; con el de “yuca”, palabra adoptada por los españoles en las Antillas y diseminada por ellos en todo el territorio de su dominio; en México el nombre antiguo era “quauhcamotli” en el presente se usa como “huacamote” o “yuca” (3, 18), por último, en los países de habla inglesa es llamado “cassava” (34).

Miembro de la familia de las Liláceas (Euphorbiáceas), es originaria de la región amazónica (América tropical); tal es así que, las muestras más antiguas, encontradas en la frontera colombo-venezolana, datan, según la prueba del carbono 14 del año 800 A. C. Con el descubrimiento de América, el cultivo de la yuca se extendió rápidamente a África y Asia, siendo actualmente, estos continentes los mayores productores (49). La yuca es un arbusto perenne que alcanza una altura entre los 90 y 150 centímetros, tiene grandes hojas palmeadas y sus raíces son comestibles (las hojas se pueden usar como forraje). Las flores nacen en el extremo del tallo y su color varía del púrpura al amarillo. La planta es monoica, lo que significa que en ella misma, crecen

separadas flores masculinas y femeninas; las femeninas maduran más pronto y el cruce con otras plantas ocurre mediante la polinización con insectos (34)(49).

Todas las partes de la planta de yuca (raíz, follaje y tallo) son utilizadas en la alimentación humana, animal y en usos no alimentarios. A excepción del follaje, los productos y subproductos de la yuca son esencialmente energéticos (124 Kcal/100g, mientras que la papa contiene 76 Kcal/100g), dado su alto contenido de almidones y su bajo nivel de proteínas. La raíz es rica en vitamina C, calcio, potasio y contiene niveles aceptables del complejo B (47). El análisis bromatológico de la yuca muestra los siguientes resultados:

**Cuadro Nº 01:** Características bromatológicas de la yuca.

<b>Componentes</b>	<b>Base húmeda % en peso</b>	<b>Base seca % en peso</b>
Humedad	63.58	-
Almidón	33.12	81.75
Glucosa	0.06	0.13
Proteínas	0.98	2.42
Grasas	0.48	1.18
Fibra cruda	1.03	2.54
Cenizas	0.75	1.86

Fuente: (34).

Su utilización en la industria alimentaria es extensa, se emplea para la producción de glucosa a partir de almidón y de la harina de yuca, como sustituto en la industria cervecera, también en la industria de la panificación, entre otros, la yuca es la principal proveedora de almidón como nutriente para la etapa inicial del proceso de producción de etanol (1).

#### **CAMOTE (*Ipomoea batatas*)**

La palabra camote es de origen nahuatl, dialecto de los antiguos habitantes de Centroamérica y México. En algunas regiones de África, el camote es llamado cilera abana, que significa “protector de los niños”, aludiendo al papel

que cumple en las densamente pobladas planicies semiáridas de África oriental, donde miles de aldeas dependen de su cultivo para combatir el hambre (14).

A pesar de que la traducción literal de su nombre en inglés es “papa dulce”, el camote no es pariente de la papa. Las papas pertenecen a la familia de las solanáceas, que incluyen también al tomate, pimiento y berenjena, mientras el camote pertenece a la familia de convolvuláceas (*Convolvulaceae*). A diferencia de la papa, que es un tubérculo o esqueje engrosado, el camote es una raíz reservante (38).

El camote es nativo de los trópicos de América Latina, centro y sur de México, centro américa y selva peruana. Es una raíz perenne, aunque cultivada como anual. Crece a nivel o un poco arriba de la superficie del suelo. Los primeros tubérculos se pueden cosechar en aproximadamente 4 meses, pues es de rápido desarrollo. Existen aproximadamente 500 especies. Es una fuente de carbohidratos para la alimentación humana y animal. Las raíces se consumen cocinadas y procesadas de diferentes formas, puede enlatarse o envasarse en conserva y procesarse para la fabricación de harina y almidón (41).

El camote de pulpa naranja contiene más vitamina A que ningún otro alimento, incluyendo la zanahoria: cien gramos proporcionan más del cien por ciento de la vitamina A requerida diariamente (14), además es rico en carbohidratos y puede producir más energía comestible por hectárea por día que el trigo, arroz o yuca. Tiene una gran diversidad de usos que incluyen el consumo de las raíces frescas, o de las hojas procesadas como forraje, almidón, harina, caramelos y alcohol (38).

### **Preparación**

Se inicia con la selección de la yuca o mandioca, luego del lavado es cortada en trozos, para llevarlos a cocinar hasta quedar tiernos, seguidamente se retiran del fuego y dejan enfriar, transfiriendo todo el material cocido a una

artesa de madera, donde unas mujeres van moliendo y desmenuzando los trozos de yuca cocida con la ayuda de un palo, mientras que otras, van masticando y removiendo en la boca sin engullir la yuca, para después devolverlos a la artesa, al mismo tiempo otro grupo de nativas van masticando y devolviendo camote morado crudo. Toda la mezcla de yuca y camote morado insalivados, se pasa a otro recipiente, donde se añade agua de manantial y se deja fermentar por espacio de tres días o más. Después de que se espuma y fermenta, el recipiente se cubre y se deja así hasta que la quieren beber (25).

#### 2.2.2.3. Consumo

Esta bebida es de aspecto lechoso y de consistencia ligeramente densa, podría consumirse treinta ollas o más de cauim en una sola fiesta; según estudios el cauim podía ser consumido tranquilamente por una o dos personas, pero en la mayoría de las fiestas lo hacían decenas o centenares de personas, a menudo de dos o más pueblos. Se consideraba una gran vergüenza dejar las celebraciones, curiosamente, los Tupinambá no comían durante sus fiestas, así como ellos no bebían mientras comían; ellos consideraban muy extraña la costumbre europea de mezclar las dos cosas (39).

Las fiestas del cauim tenían fechas precisas como para celebrar el nacimiento de un nuevo miembro de la tribu, el primer período menstrual de una joven india, después de la perforación del labio inferior, en las ceremonias mágicas previas a la partida de los guerreros o su retorno, en los rituales de sacrificio de los prisioneros, o durante el trabajo colectivo para cultivar las tierras. El consumo de cauim en estas ocasiones era imprescindible. Si los indios no fabricasen el cauim para beberlo hasta la embriaguez, entonces se creía, ocurrirían eventos que significarían la ruina de los miembros de la tribu (43).

## 2.3. CELULOSA

### 2.3.1. Características e Importancia

La celulosa es un polímero lineal no ramificado compuesto de unidades de glucosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, dicha configuración, permite a la celulosa formar cadenas muy largas y rectas. Cada residuo de glucosa, está girando con una rotación de  $180^\circ$  respecto al residuo siguiente, de modo que el oxígeno del anillo piranósido se une por un puente de hidrógeno al grupo hidroxilo en el C-3 de la unidad siguiente, haciendo que la cadena recta formada por uniones  $\beta$  sea óptima para construir fibras con una elevada fuerza tensil (32).

Dichas cadenas lineales interaccionan entre sí por medio de enlaces de puentes de hidrógeno generando la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático, que reciben la denominación de regiones cristalinas. Cuando a lo largo del haz de cadenas se rompen los puentes de hidrógeno se forman regiones más desordenadas que se conocen con el nombre de amorfas, que permiten su hidratación y mejor accesibilidad al ataque enzimático (20)(22)(40).

La estructura fina ha sido estudiada en varios tipos de celulosa y muy particularmente en la fibra de algodón. Así, unas 60 a 70 cadenas moleculares paralelas de celulosa se reúnen para formar una micela; 20 micelas aproximadamente forman la llamada microfibrilla, que es visible solamente en el microscopio electrónico, unas 250 microfibrillas forman una fibrilla o macrofibrilla, observable mediante la utilización del microscopio óptico, y finalmente unas 1500 fibrillas forman la fibra de algodón (24)(44).

La celulosa es el principal constituyente de la pared celular de las plantas, ésta es una sustancia fibrosa, resistente, insoluble en agua, se encuentra

particularmente en los tallos, troncos y en todas las porciones leñosas de los tejidos de las plantas. La madera está constituida en su mayor parte, por celulosa y otras sustancias polímeras, el algodón es celulosa casi pura. Aproximadamente la mitad del dióxido de carbono atmosférico que fijan las plantas en la fotosíntesis queda en forma de celulosa. La celulosa es no solamente el polisacárido extracelular más abundante del mundo vegetal, sino que también es la más abundante de todas las biomoléculas (9)(33).

Debido a ello es posible que en el futuro constituya una fuente inagotable de materias primas (proteínas, grasas) para la industria de los alimentos, y de otras sustancias (estimulantes, saborizantes) cuando se consiga, por medios técnicos apropiados, aumentar su escasa sensibilidad a los ataques bioquímicos y elevar la actividad celulolítica de los preparados celulares (9)(36).

### 2.3.2. Degradación Biológica de la Celulosa

La degradación microbiana de la celulosa consiste en la conversión de las microfibrillas cristalinas insolubles de celulosa en azúcares solubles, primariamente celobiosa y glucosa, que luego son asimilados por la célula y utilizados como fuente de carbono y energía (4).

#### 2.3.2.1. Celulasas

Los microorganismos capaces de hidrolizar celulosa producen un conjunto de enzimas denominadas celulasas, las que poseen diferentes especificidades. Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\beta$  -1,4 de la celulosa, ésta no es una enzima aislada sino es un sistema enzimático que cuenta por lo menos con tres actividades. Puesto que la terminación "asa" se emplea únicamente para enzimas independientes y no para conjuntos de enzimas parece más correcto emplear en su lugar el término "enzimas celulolíticas" (35).

La actividad de estas enzimas se mide en función de la degradación de los derivados solubles de la celulosa, sobre todo de la Carboximetilcelulosa (9). (Ver Figura N° 01).

Las hemicelulasas y celulasas comerciales convencionales no son capaces de licuar completamente éstos materiales complejos, ya que, para la degradación total se necesitan varias enzimas, entre ellos: celulasas, glucanasas, galactanasas, arabinasas y pectinasas (36).

#### 2.3.2.2. Clasificación

Las celulasas, por su función, han sido clasificadas como:

Endoglucanasas: Llamadas también endo- $\beta$ -glucanasa o  $\beta$ -1,4-glucanohidrolasa (EC.3.2.1.4) o CMCasa, que rompen los enlaces- $\beta$ -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa, produciendo nuevos sitios de ataque complementados por las exoglucanasas. Como resultado, hay una rápida disminución en el largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores, son activas sobre la celulosa amorfa. El mejor sustrato para la medición de la actividad de endoglucanasas es un derivado soluble tal como la Carboximetilcelulosa (CMC) (5)(24)(30)(35).

Exoglucanasas: llamadas también exo- $\beta$ -glucanasa o  $\beta$ -1,4-glucancelobiohidrolasa (EC.3.2.1.91) o avicelasa, que atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los terminales no reductores liberando subunidades de celobiosa, degradan preferentemente celulosa cristalina de manera progresiva, exhiben acción sinérgica altamente cooperativa en presencia de endoglucanasas. Tienen muy limitada acción sobre sustitutos de celulosa como Carboximetilcelulosa(CMC) e hidroximetilcelulosa (HEC) (5)(24)(30)(35).

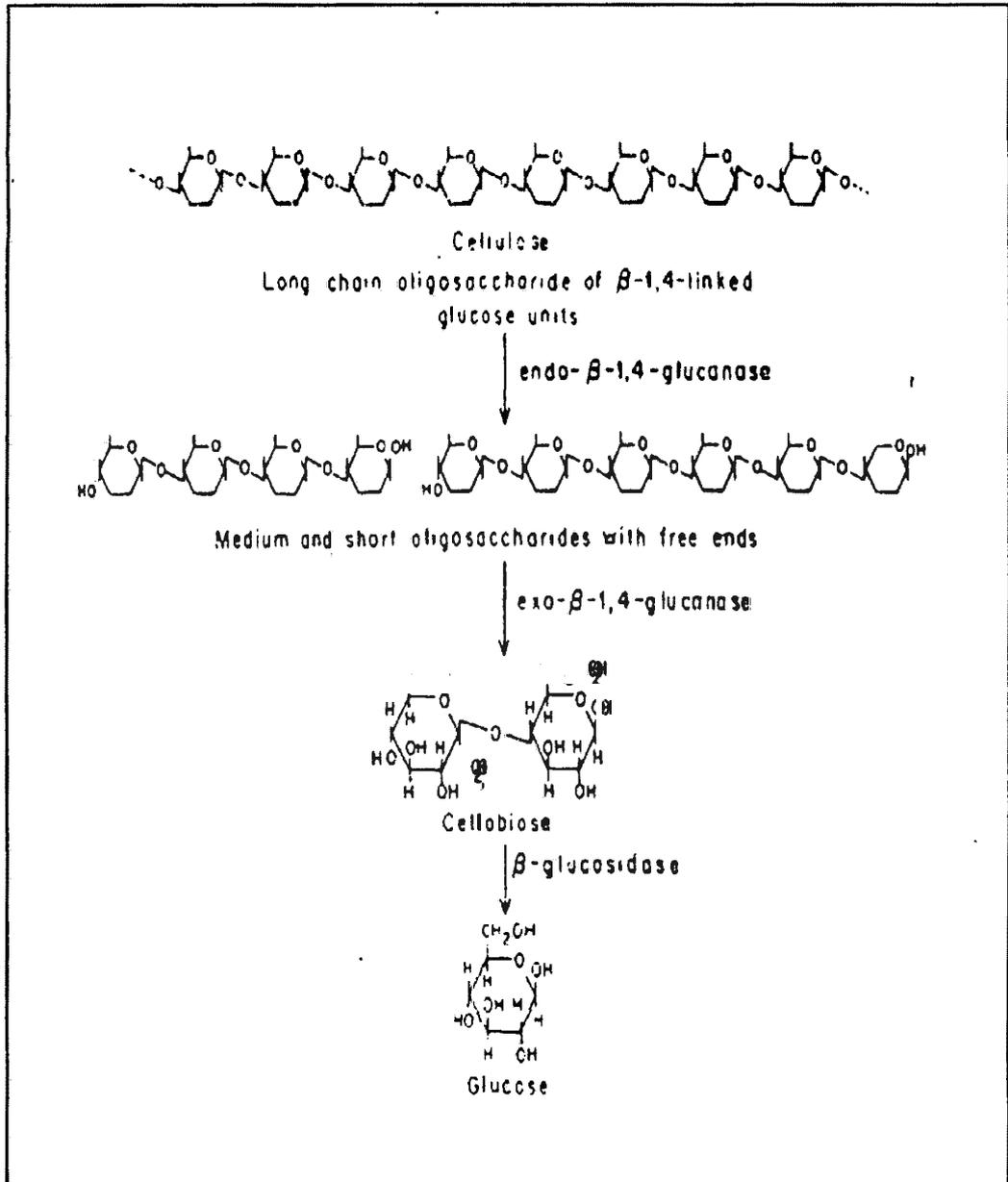


Figura Nº 01.- Degradación microbiana de la celulosa

Fuente: (26)

Glucosidasas: Llamadas también  $\beta$ -1,4-glucosidasas(EC.3.2.1.21) o celobiasas que hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa (5)(24)(30)(35).

Se estima que las celulasas actúan más al azar a lo largo de la cadena de celulosa y son más activas sobre celulosa amorfa (8)(22), el número y tipo de celulasas involucradas en cada paso de la degradación microbiana de la celulosa puede variar también de un organismo a otro (26).

### 2.3.2.3. Celulosomas

En algunas bacterias las celulasas son organizadas en un complejo multienzimático denominado celulosoma. En 1983, el concepto de celulosoma fue establecido en *Clostridium thermocellum*, donde las celulasas se encontraban organizadas dentro de un complejo celulolítico de alto peso molecular. En los años siguientes varios genes de celulasas de ésta bacteria fueron clonados y secuenciados y su estructura modular fue reconocida (4). Se supo entonces que las celulasas están conformadas por unidades discretas independientes en plegamiento, estructura y función llamadas dominios o módulos. Tanto las celulasas de sistemas asociados y no asociados tienen estructura modular (12), es decir consisten en módulos estructurales y funcionales múltiples. Además, las enzimas no asociadas contienen típicamente un dominio catalítico responsable de la relación de hidrólisis y un dominio de unión a la celulosa (CBD) que media la unión de las enzimas al sustrato; ambos dominios están unidos por un péptido conector que está altamente enriquecido en prolina e hidroxiaminoácidos y debe ser lo suficientemente largo y flexible para proporcionar una eficiente orientación y operación a los dos dominios (31). Las enzimas asociadas o celulosomales están unidas de modo no covalente a una proteína sin actividad catalítica denominada proteína de integración del celulosoma (Cip) que porta un CBD

grande en un extremo. Un celulosoma completo consiste en al menos 14 tipos diferentes de polipéptidos que incluyen endoglucanasas, xilanasas y  $\beta$ -glucosidasas (6)(16).

## 2.4. ORGANISMOS CELULOLÍTICOS

### 2.4.1. Bacterias

Los enlaces  $\beta$ -1,4 de la celulosa normalmente se digieren de manera lenta. La celulosa forma largas fibrillas y los organismos capaces de digerirla se encuentran con frecuencia estrechamente asociados a ellas. La digestión de la celulosa ocurre tanto aeróbica como anaeróticamente (21). Los sistemas de celulasa bacteriana no son directamente comparables con los de los hongos. La degradación bacteriana de celulosa se da por la acción de un grupo de enzimas y en el caso de los hongos por endo y exoglucanasas. La falta de  $\beta$ -1,4-glucosidasas en algunas bacterias hace que se empleen fosforilasas para la degradación de celobiosa (31).

Las celulasas de bacterias aerobias, como las especies de *Cellulomonas* aparecen ligadas a los sustratos de celulosa y aparecen en el medio de cultivo sólo en la fase estacionaria. Varias especies celulolíticas de bacilos, como el *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymixa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus cereus*, han sido descritas. Todas estas especies tienen la capacidad de hidrolizar carboximetilcelulosa hasta celobiosa como producto principal. Las especies de *Pseudomonas* celulolíticas han sido estudiadas por Ueda et al. 1952 y la mejor estudiada fue *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *Cellvibrio gilvus*, se desarrolla bien en celulosa, celobiosa y otras celodextrinas, tienen un sistema de celulasa extracelular complejo similar a *Pseudomonas fluorescens*. Los productos de degradación son principalmente celobiosa y celotriosa (31).

En condiciones anóxicas la digestión de la celulosa es realizada por unas cuantas especies de *Clostridium* que son frecuentes en los sedimentos lacustres, en el tracto intestinal de animales y en los sistemas de digestión anaeróbica de aguas residuales (21). *Clostridium thermocellum* produce un multicomponente celulolítico denominado celulosoma.

#### 2.4.2. Hongos

Muchos hongos son capaces de digerir la celulosa y son los principales responsables de la descomposición de materiales vegetales en el suelo de los bosques (21). Los hongos que producen las enzimas necesarias capaces de degradar la celulosa cristalina pertenecen a los grupos denominados:

Pudrición blanca: Este es un grupo heterogéneo, sin embargo tiene en común la capacidad de degradar la lignina así como otros componentes lignocelulósicos. El hongo más estudiado se aisló inicialmente de pilas de astilla de madera y se le dió el nombre de *Chrysosporium lignorum*, que luego fue cambiado a *Sporotrichum pulverulentum* para su fase imperfecta y luego a *Phanerochaete chrisosporium* para su fase perfecta, se caracteriza por su termotolerancia y un óptimo crecimiento alrededor de 38°C. Produce cinco endo – 1,4 -  $\beta$  - glucanasas, una exo – 1,4 -  $\beta$  - glucanasas y dos 1,4 -  $\beta$  - glucosidasas (31).

Pudrición parda: Son capaces de depolimerizar de manera rápida a la celulosa, pareciera que utilizan un mecanismo de degradación diferente al empleado por *Phanerochaete chrisosporium*. Los hongos de este grupo no cuentan con la acción sinérgica de las endo – exo – glucanasas para degradar la celulosa cristalina porque carecen de la actividad de la exo – 1,4 -  $\beta$  - glucanasas. Entre los hongos de este grupo tenemos a: *Poria placenta*, *Tyromyces palustris*, y *Lanzitus trabeum*, como ejemplos más conocidos con actividad celulolítica (31).

Putridión ligera: Estos hongos son capaces de degradar polisacáridos y lignina, sin embargo son los polisacáridos el sustrato principal, la habilidad de producir enzimas extracelulares para degradar la celulosa cristalina varía. El ejemplo más conocido de producción de sistemas enzimáticos completos es *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus Niger*, son otros ejemplos bien conocidos de hongos celulolíticos (31)(34).

De otro lado, los hongos anaeróbicos habitantes del rumen tienen la capacidad de actuar sobre la celulosa. La fermentación de celulosa en dicho medio da lugar a la formación de acetato, CO<sub>2</sub>, formiato, lactato e hidrógeno. El sistema de enzimas celulolíticas en uno de los hongos anaeróbicos del rumen, específicamente en *Neocalimastix frontalis*, ha sido estudiado por varios grupos, siendo el mayor producto de digestión sobre Avicel (celulosa microcristalina), glucosa y no celobiosa (31).

Los actinomicetos forman una parte importante de la comunidad microbiana responsable de la degradación de la lignocelulosa. Generalmente, las celulasas de los actinomicetos son enzimas inducibles extracelulares que atacan a la celulosa en una ruta similar a las celulasas fúngicas.

Las especies termofilicas de *Thermonospora* y T1,4 *Thermoactinomyces* y las especies mesofilicas de *Streptomyces*, son las más estudiadas (31).

#### 2.4.3. Insectos

Se han realizado experimentos en animales productores de celulasas, que demuestran la presencia de organismos simbioses como bacterias, hongos y protozoarios que albergan los sistemas digestivos de los invertebrados y el ganado herbívoro. Esta teoría se propuso primero por Cleveland en su trabajo con termitas de la especie *Reticulitermes flavipes*, concluyendo que la fauna

protozoaria presente en su intestino era responsable de la digestión de la celulosa (8)(15)(37).

Tanto las “termitas” como las “cucarachas” de la madera, tienen en su intestino una fauna protozoaria simbiote que facilita la digestión de la celulosa ingerida. Es probable que la vida social en este grupo se originase en forma de colonias familiares centrales en torno a la diseminación de los simbiotes, como las que se encuentran actualmente en las cucarachas de la madera del género *Cryptocercus punctulatus*, esta especie se alimenta de madera en descomposición y vive en los troncos de árboles muertos, los géneros que viven en simbiosis en su intestino posterior son *Trichonimpha*, *Barbulonimpha* y Polimastiginos, ellos segregan las celulasas y las celobiasas que faltan en el blátido, que no sobrevive si se le priva de sus flagelados (8)(15)(37).

Además, existen tres especies de Sirícidos (Himenópteros) que son conocidos por su aptitud para digerir la celulosa, éstos son *Sirex cyaneus*, *Sirex gigas*, y *Syrex Phantoma*. Entre los coleópteros, se encuentra el mayor número de especies capaces de digerir la celulosa y pertenecen a 4 familias: Anóbidos, Bupréstidos, Cerambícidos y Escarabeidos (15). Un Cerambícido, específicamente la larva de *Stenodontes spinibarbis* “joti” fue objeto de estudios recientes, se demostró que presenta actividad enzimática tanto de endoglucanasas y exoglucanasas, siendo ésta última mucho mayor, lo que explicaría su carácter xilófago y su alta capacidad para degradar sobre todo las regiones cristalinas de la celulosa de la madera, así como su gran habilidad para construir profusas galerías larvarias cuyas consecuencias se traducen en la muerte de la planta hospedera (29).

Numerosos invertebrados adquieren las enzimas en mención al ingerir en sus alimentos un conjunto complejo de bacterias, protozoarios y hongos, éstos

microorganismos son la fuente de enzimas que, una vez liberadas quedan en el tubo digestivo de los animales que encuentran así un medio de aumentar sus capacidades digestivas respecto a sustratos como la celulosa, las hemicelulosas, la pectina, la lignina y otras moléculas difícilmente degradables (15).

El papel de las enzimas adquiridas ha sido puesta en evidencia por primera vez en la termita *Macrotermes natalensis*, ésta termita no tiene protozoarios simbioses, vive asociada con diversos hongos entre ellos los Termitomyces. Estos son asociados y suministran la enzima exoglucanasa mientras que la enzima exoglucanasa es aportada por otros hongos. Asimismo, *Sirex cyaneus* posee enzimas adquiridas capaces de hidrolizar los polisacáridos de la madera; éstas enzimas provienen del hongo simbiótico *Amylostereum chailletii* que se desarrolla en las galerías larvarias (15).

#### 2.4.4. Mamíferos

Los rumiantes son mamíferos herbívoros que poseen un órgano especial, el rumen, en cuyo interior se lleva a cabo la digestión de la celulosa y de otros poliacáridos vegetales mediante la actividad de poblaciones microbianas especiales (21).

Las reacciones químicas que tienen lugar en el rumen son complejas y requieren la actividad combinada de una variedad de microorganismos, muchos de los cuales hidrolizan polímeros como la celulosa, convirtiéndolos en azúcares, que por fermentación producirán ácidos grasos, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* son los anaeróbicos celulolíticos más abundantes del rumen. Aunque ambos organismos producen celulasas, *Fibrobacter* una bacteria Gram negativa, utiliza celulasa periplásmica para romper la celulosa. *Ruminococcus*, por otra parte, produce una celulasa de gran tamaño que es secretada al rumen, donde degrada la celulosa fuera de la célula bacteriana. El resultado final es el mismo en ambos casos: glucosa libre disponible para los anaeróbicos fermentativos (21).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Recolección de la muestra biológica

Se realizó en 10 comunidades nativas del VRAE, en función de su mayor accesibilidad y del apoyo brindado por las municipalidades respectivas. Las muestras de masato se obtuvieron directamente de los recipientes de fermentación con la ayuda de un mate en frascos de vidrio debidamente etiquetados, los que fueron transportados en el menor tiempo posible y en condiciones adecuadas al laboratorio de Biotecnología Microbiana, donde se conservaron en refrigeración por un espacio de tres días. (Anexo N° 05).

#### 3.2. MÉTODOS

##### 3.2.1. Descripción de la tecnología tradicional de elaboración del masato

Con la finalidad de conocer *in situ* cada una de las etapas indicadas en la elaboración tradicional del masato, así como los detalles y características de las diferentes formas de acabado y hábitos de consumo, se realizaron visitas a las comunidades mencionadas y se aplicó una encuesta a fin de recabar la mayor y mejor información posible, la misma que fue organizada y sistematizada. (Anexo N° 02).

### 3.2.2. Obtención del extracto enzimático crudo

A partir de las muestras conservadas en refrigeración se obtuvo el extracto enzimático crudo, por centrifugación a 3 500 rpm por 5 minutos, posteriormente se mantuvieron en refrigeración.

### 3.2.3. Caracterización de la actividad celulolítica en masato

#### 3.2.3.1. Actividad de endoglucanasas

Fundamento:

Estas enzimas cortan al azar las uniones dentro de la celulosa amorfa, de tal manera que se incrementa la disponibilidad de extremos no reductores y se generan oligosacáridos más pequeños con cadenas terminales libres. La actividad de endoglucanasas se determinó utilizando como sustrato Carboximetilcelulosa (CMC), que es un derivado soluble de celulosa y su presencia se hace evidente de manera indirecta por la aparición del producto final principal que es la glucosa (6)(24)(30). La actividad endoglucanasa del extracto enzimático crudo se determinó siguiendo las pautas formuladas por Stutzenberger citado por Ramírez, P. (1993).

Procedimiento:

1. El set de tubos de ensayo se organizó de la siguiente manera:

<b>CÓDIGO</b>	<b>BUFFER 1M (ml)</b>	<b>SUSTRATO (ml deCMC)</b>	<b>MUESTRA (ml)</b>	<b>VOLUMEN FINAL(ml)</b>
T	0.1	3.5	0.4	4.0
M1	0.1	3.5	0.4	4.0
M2	0.1	3.5	0.4	4.0
M3	0.1	3.5	0.4	4.0
BR	4.0	-	-	4.0
BS	2.0	2.0	-	4.0
BE	3.6	-	0.4	4.0

Donde:

- T : Testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*).
- M1,M2,M3 : Muestra problema (por triplicado).
- BR : Blanco de reactivo.
- BS : Blanco de sustrato.
- BE : Blanco de enzima.
- Buffer 1M : Buffer acetato de sodio 1M, a pH 3.3, 4.3 y 5.3
- Sustrato CMC : Carboximetilcelulosa al 1%.
- Muestra : Extracto enzimático crudo.

2. Los tubos en mención fueron sometidos a diferentes combinaciones de tratamientos, considerando como factores de combinación a las temperaturas: 25, 37, 50 °C y pH: 3.3, 4.3 y 5.3, la incubación se realizó en baño María a las temperaturas ya mencionadas durante 30 minutos (29)(30).

3. Finalmente se realizó la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (23).

La actividad enzimática fue expresada en U/mi. Una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto, a partir del sustrato empleado y en las condiciones de ensayo. Se empleó como testigo celulasa de *Trichoderma reesei*, en este caso una unidad de actividad de celulasa corresponde a la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa a partir de Carboximetilcelulosa por minuto a pH 5.0 y 37°C (17).

### 3.2.3.2. Actividad de exoglucanasas

Fundamento:

Las  $\beta$ -1,4-exoglucanasas, separan uniones del disacárido celobiosa desde los extremos no reductores de las cadenas de oligosacáridos. Su actividad se determinó utilizando como sustrato papel filtro (Whatman Nº 1)

previamente triturado, igualmente su actividad se evidenció de manera indirecta por la aparición del producto final principal, glucosa (6)(24)(30).

La actividad exoglucanasa del extracto enzimático crudo se determinó siguiendo las pautas formuladas por Stutzenberger citado por Ramírez, P. (1993).

Procedimiento:

1. En un set de tubos de ensayo rotulados con los códigos correspondientes, se procedió como sigue:

CÓDIGO	BUFFER 0.6M (ml)	SUSTRATO (g de papel filtro)	MUESTRA (ml)	VOLUMEN FINAL(ml)
T	0.8	0.05	3.2	4.0
M1	0.8	0.05	3.2	4.0
M2	0.8	0.05	3.2	4.0
M3	0.8	0.05	3.2	4.0
BR	4.0	-	-	4.0
BS	2.0	0.05	-	4.0
BE	0.8	-	3.2	4.0

Donde:

T : Testigo (celulosa de *Trichoderma reesei*).

M1,M2,M3 : Muestra problema (por triplicado).

BR : Blanco de reactivo.

BS : Blanco de sustrato.

BE : Blanco de enzima.

Buffer 1M : Buffer acetato de sodio 0.6M, a pH 3.3, 4.3 y 5.3

Sustrato : Papel filtro Whatman Nº 1

Muestra : Extracto enzimático crudo.

2. Los tubos en mención fueron sometidos a diferentes combinaciones de tratamientos, considerando como factores de combinación a las temperaturas:

25, 37, 50 °C y pH: 3.3, 4.3 y 5.3, la incubación se realizó en baño María a las temperaturas ya mencionadas durante 30 minutos (29)(30).

3. Igualmente se realizó la determinación de azúcares reductores (23).

### 3.2.3.3. Actividad de $\beta$ -glucosidasas

Fundamento:

Las  $\beta$ -Glucosidasas hidrolizan preferentemente la celobiosa hasta glucosa, pero también son capaces de hidrolizar otras dextrinas hidrosolubles de 3 a 6 carbonos, como la salicina ( $C_3H_{18}O_7$ ), un trisacárido extraído de la corteza del sauce, es una sustancia blanca, amarga, poco soluble en el agua. La actividad de esta enzima se determinó empleando como sustrato salicina y se evidenció de manera indirecta por la aparición del producto final principal, glucosa (6)(24)(30).

Procedimiento:

1. Como en los casos anteriores, en un set de tubos rotulados se procedió como sigue:

<b>CÓDIGO</b>	<b>BUFFER 1M(ml)</b>	<b>SUSTRATO (Salicina)</b>	<b>MUESTRA (mi)</b>	<b>VOLUMEN FINAL(ml)</b>
M1	1.0	-	1.0	2.0
M2	1.0	-	1.0	2.0
M3	1.0	-	1.0	2.0
BR	-	2.0	-	2.0
BS	2.0	-	-	2.0
BE	-	1.0	1.0	2.0

Donde:

M1,M2,M3 : Muestra problema (por triplicado).

BR : Blanco de reactivo.

BS : Blanco de sustrato.

BE : Blanco de enzima.

Buffer 1M : Buffer acetato de sodio 1M, a pH 3.3, 4.3 y 5.3

Sustrato : Salicina.

Muestra : Extracto enzimático crudo.

2. Los tubos en mención fueron sometidos a diferentes combinaciones de tratamientos, considerando como factores de combinación a las temperaturas: 25, 37, 50 °C y pH: 3.3, 4.3 y 5.3, la incubación se realizó en baño María a las temperaturas ya mencionadas durante 30 minutos (29)(30).

3. Luego se realizó la determinación de azúcares reductores (23).

3.2.4. Determinación de azúcares reductores (Método del Ácido 3,5-dinitrosalicílico)

Fundamento:

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la determinación de azúcares reductores, incluye el empleo de ácido dinitrosalicílico, sal de Rochelle, fenol, bisulfito de sodio e hidróxido de sodio. Cada componente cumple un rol dentro de la reacción, la sal de Rochelle impide la disolución del oxígeno; el fenol, para aumentar la intensidad del color producido; bisulfito, para estabilizar el color obtenido en presencia del fenol. El álcali se requiere para la acción reductora de la glucosa en el ácido dinitrosalicílico (23).

Procedimiento:

1. Se elaboró una curva estándar con glucosa a valores de 2 y 20 mM.
2. Para dar inicio a la técnica se tomó 0.5 ml. del producto de la incubación, que para este caso es la muestra.
3. Seguidamente se añadió 3 ml. de la solución de DNS, se calentó en baño María hirviendo durante 5 minutos.
4. Inmediatamente se adicionó 1 ml. de sal de Rochelle, seguido de 15 ml. de agua destilada.
5. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 550 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D, Milton Roy.

### 3.2.5. Determinación de acidez total titulable

Fundamento:

Se trata de medir la cantidad del ácido existente y que se encuentra diseminado principalmente en la muestra problema, por medio de una solución de hidróxido de sodio valorada; la cantidad de ácido se expresa como porcentaje de ácido láctico (45).

Procedimiento:

1. Se tomó una alícuota de 10 ml del extracto enzimático crudo obtenido a partir del masato.
2. Seguidamente se adicionó 2 a 3 gotas del indicador de fenolftaleína.
3. Se tituló con la solución de NaOH 0.1 N contenida en la bureta y se anotó el volumen de gasto.

Para obtener los resultados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez láctica} = \frac{G \times N \times m.e. \times 100}{V_m}$$

Donde:

G = Mililitros gastados de NaOH 0.1 N.

N = Normalidad de la solución de NaOH.

m.e. = Miliequivalentes de ácido láctico (0.009008 g/ml)

V<sub>m</sub> = Volumen de muestra empleada (ml)

### 3.2.6. Determinación del pH

Fundamento:

El pH es el logaritmo común del número de litros de disolución que contiene un equivalente gramo de iones hidrógeno. El rango del pH va desde 0 a 14; un valor por debajo de 7 representa una disolución ácida, 7 una disolución neutra y por encima de 7 una disolución alcalina (27).

Procedimiento:

Se determinó haciendo uso de un potenciómetro.

### 3.2.7. Determinación de sólidos totales

Fundamento:

Consiste en la pérdida de agua debido a su eliminación por calentamiento bajo condiciones dadas. Los sólidos totales se expresan en porcentaje, que resulta de la diferencia entre el 100% y el porcentaje de agua presente en la muestra (27), esto es:

$$\text{Humedad (o agua) (\%)} = \frac{\text{Pérdida de peso (g)}}{\text{Peso de muestra tomado (g)}} \times 100$$

$$\text{Sólidos totales(\%)} = 100 - \text{agua(\%)}$$

Procedimiento:

1. Se desecó un frasco de vidrio y después de enfriado, se pesó.
2. Con la ayuda de una pipeta se tomó 5 ml del extracto enzimático crudo y se colocó al frasco previamente tarado y se pesó.
3. Se colocó el frasco conteniendo el extracto enzimático crudo sobre baño de agua hirviendo y se evaporó a sequedad.
4. Se llevó el frasco a una estufa a 105 °C durante tres horas.
5. Finalmente se pesó y por diferencia se calculó el porcentaje de sólidos totales.

### 3.2.8. Determinación de azúcares totales

Fundamento:

Se entiende por azúcares totales al conjunto de azúcares fácilmente solubilizables presentes en una muestra, principalmente glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, dextrosa, almidón, sin incluir entre ellos a los polisacáridos

que forman la llamada fibra o residuo celulósico(45). Esta determinación se basa en la coloración que se forma por la acción del fenol – ácido sulfúrico sobre los grupos reductores libres o potencialmente libres de los azúcares disueltos (46).

Procedimiento:

1. Se tomaron dos tubos de ensayo rotulados como "P" de problema y "B" de blanco.
2. Al tubo "P" se le adicionó 1 ml del extracto enzimático crudo y al tubo "B" 1 ml agua destilada.
3. A continuación se adicionó a ambos tubos 1 ml de fenol al 5%. Se mezcló bien y se le añadió 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (c). Se mezcló cuidadosamente.
4. Se dejó enfriar a temperatura ambiental por espacio de unos 15 a 30'.
5. Se leyó la absorvancia a 525 nm.
6. Se preparó una curva patrón con sacarosa, a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/ml.

#### 3.2.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar el grado de significancia existente entre los diferentes tratamientos, se consideró la prueba estadística de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05. (Anexos Nº 14 al 19).

## **IV. RESULTADOS**

**Tabla Nº 01:** Comunidades nativas del Valle del Río Apurímac y Ene consideradas para la recolección de las muestras de masato – 2004.

Departamento/Provincia	Distrito	Comunidad Nativa
CUZCO (La Convención)	PICHARI	Santushari
		Quimquibiri
		Gran Shinúngari
		Otari
		Shirutuari
		Uvayeri
		Memerine
Cubibari		
AYACUCHO (Huanta)	KIMBIRI	Sampantuari
	SIVIA	Anato

## Descripción del proceso tradicional de elaboración del masato

Las variedades de yuca empleadas para la elaboración del masato son la blanca o amarilla. La yuca cosechada en el campo, es llevada a la aldea utilizando una canasta especial denominada *shimianti*. Esta yuca se cocina a leña en una olla de barro o metal, a continuación se deja enfriar, luego con ayuda de la *pata* se amasa hasta obtener una pasta homogénea. Paralelamente, una o más mujeres comienzan a masticar cierta cantidad de camote morado crudo, previo ligero raspado de la cubierta mas externa con la ayuda de un cuchillo, evitando quitar la parte morada, que es necesaria para el color característico del producto final. El camote es masticado en un acto casi ceremonial por la mujer o mujeres encargadas, quienes van depositando poco a poco el bolo alimenticio formado, de color morado, en un posillo. Aproximadamente medio kilo de camote es suficiente para una olla de 10 a 12 litros (2 baldes).

Seguidamente, la yuca amasada se mezcla con el camote masticado, en una proporción aproximada de 20:1 (yuca: camote). Inmediatamente después, se agrega un poco de agua fría para hacer que la masa tenga cierta fluidez y a continuación se añade el *oboroké*, en una proporción aproximada de 5-10% respecto al volumen total de la masa (comúnmente una tasa para una olla del volumen ya indicado). El masato fermenta normalmente de un día para otro. Para servirse, se pasa por un colador especial llamado *shikame*. El masato es servido en un recipiente característico denominado *suta*. (Anexos N° 03 al 05).

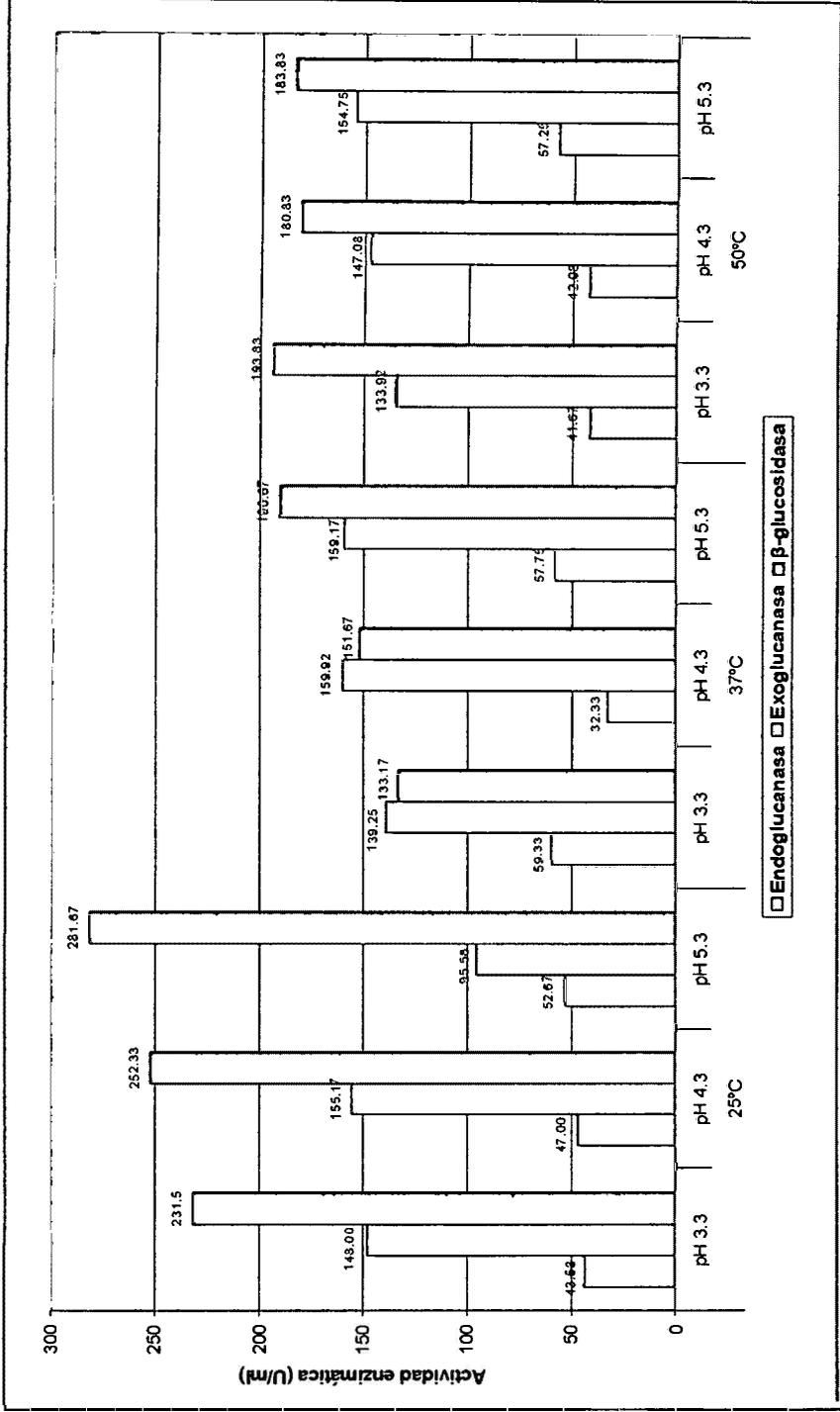
El masato lo consumen varones y mujeres. Es el alimento y bebida fundamental de los Asháninkas. Por la mañana, temprano, antes de partir a las actividades agrícolas o de caza, los varones lo consumen como desayuno previo calentamiento hasta ebullición; luego al medio día en el campo lo ingieren frío, y

finalmente al regresar por la tarde, en la aldea, a manera de cena, también frío. Cuando desean utilizarlo para embriagar, lo dejan fermentar por dos o tres días.

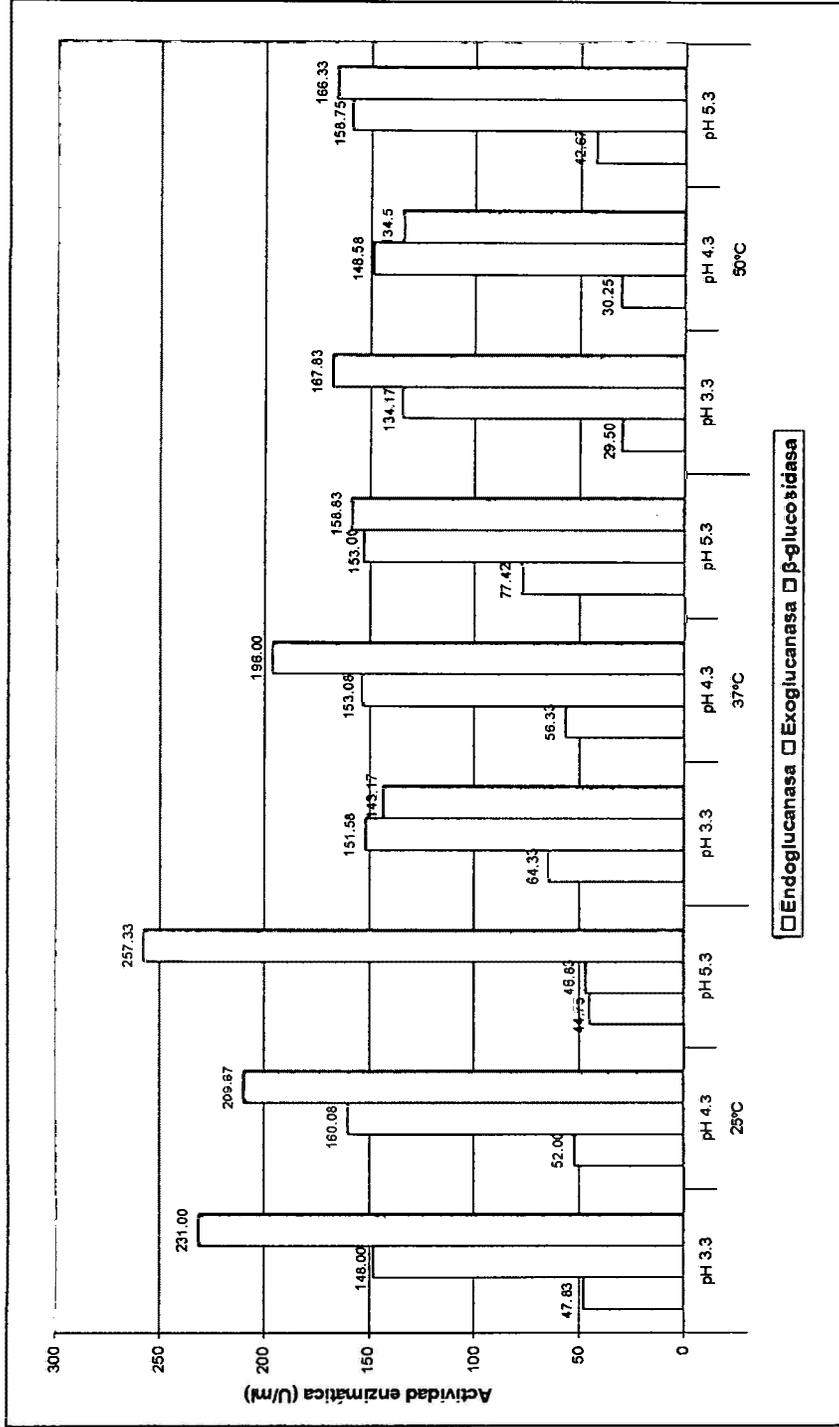
Cabe resaltar que la elaboración del masato en las comunidades nativas del VRAE, no incluye el proceso de masticación de la yuca, pues es sólo el camote al que se le da este tratamiento, dicho procedimiento es relativamente contrario al descrito por Mujica, F. (2003) en su estudio sobre bebidas fermentadas tradicionales, además su consumo no es opcional, sino todo lo contrario como se menciona líneas arriba, el masato forma parte de la dieta de los nativos Asháninka.

**Tabla N° 02:** Características bioquímicas del masato procedente de las comunidades nativas del VRAE - 2004.

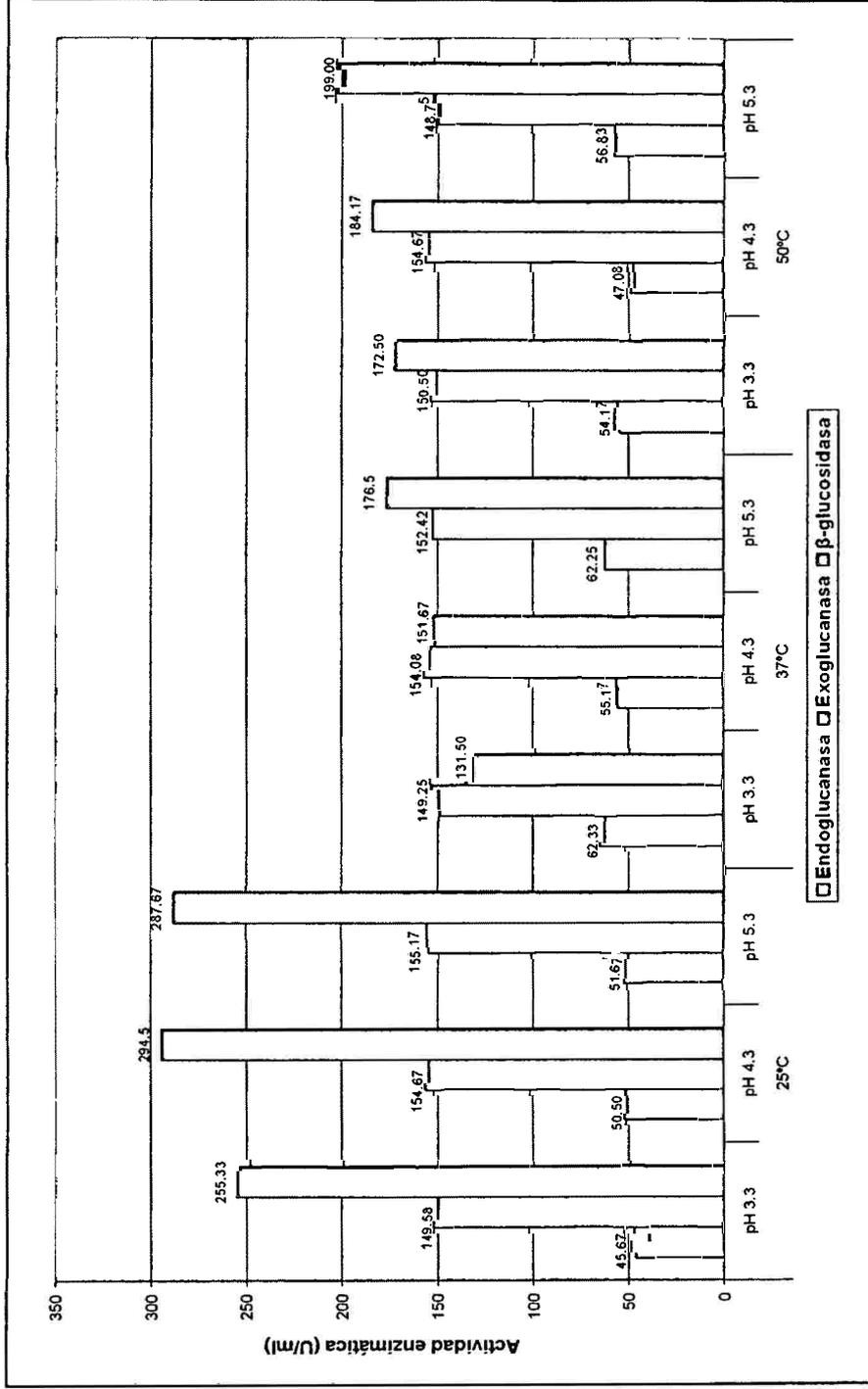
N°	Procedencia C.C.NN.	Distrito/ Departamento	pH	Acidez total (% ác. láctico)	Azúcares reductores (mg/ml)	Azúcares totales (mg/ml)	Sólidos totales (%)
01	Santushari	Pichari/Cusco	4.2	0.10	2.68	3.10	5.2
02	Quimqubiri	Pichari/Cusco	4.3	0.10	2.02	2.70	7.8
03	Gran Shinúngari	Pichari/Cusco	4.3	0.12	2.31	3.90	8.2
04	Otari	Pichari/Cusco	4.1	0.12	1.71	2.40	4.5
05	Anato	Sivia/Ayac.	4.4	0.11	2.31	2.80	5.8
06	Shirutari	Pichari/Cusco	4.5	0.12	2.53	3.70	7.2
07	Uvayeri	Pichari/Cusco	4.4	0.11	2.22	4.10	5.2
08	Memefine	Pichari/Cusco	4.2	0.13	2.65	2.90	5.6
09	Cubibari	Pichari/Cusco	4.4	0.14	2.59	2.80	8.3
10	Sampantuari	Kimbiri/Cusco	4.6	0.08	1.80	2.10	6.3



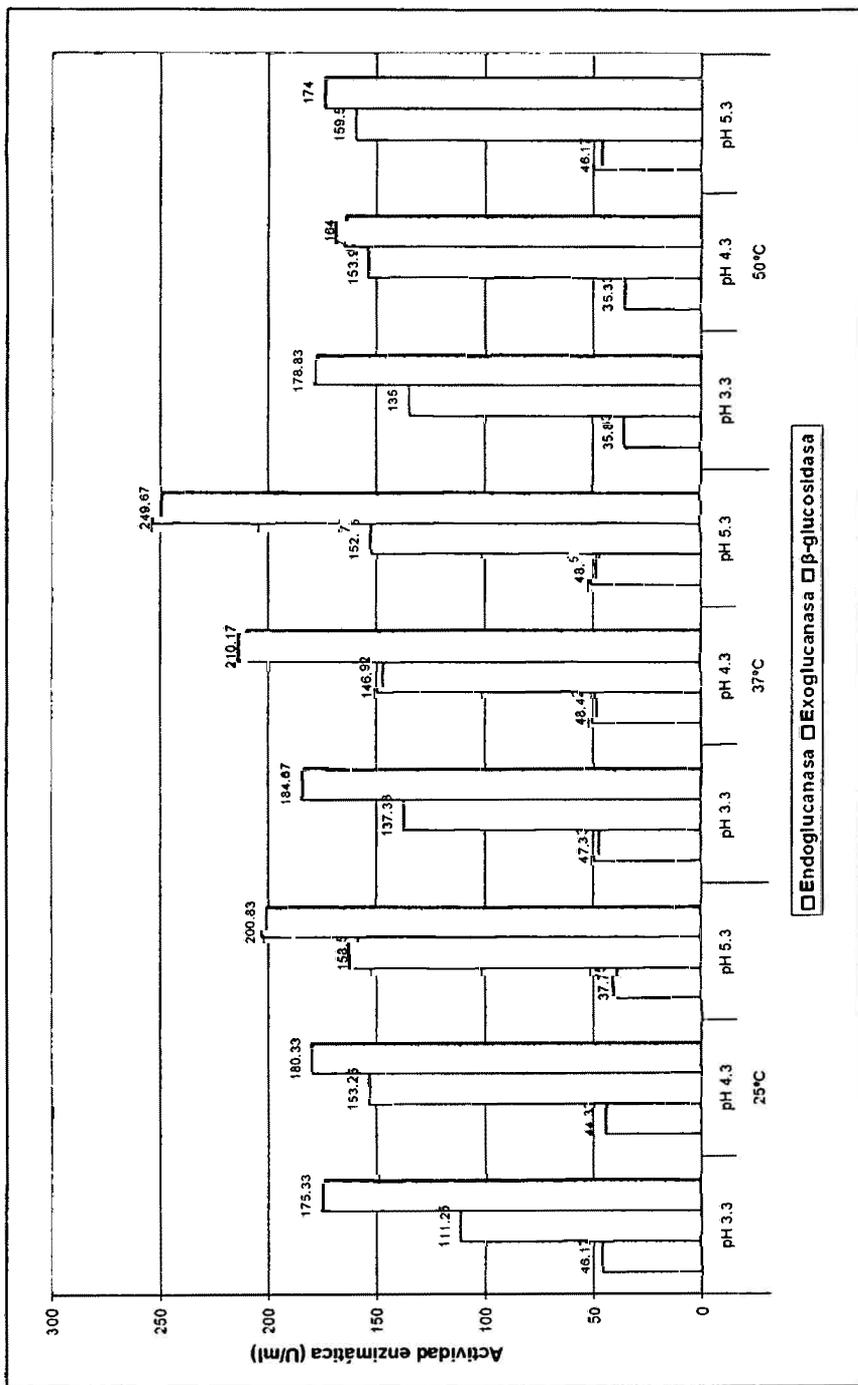
**Gráfico N°1.-** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Santushari – Pichari. Cuzco – 2004.



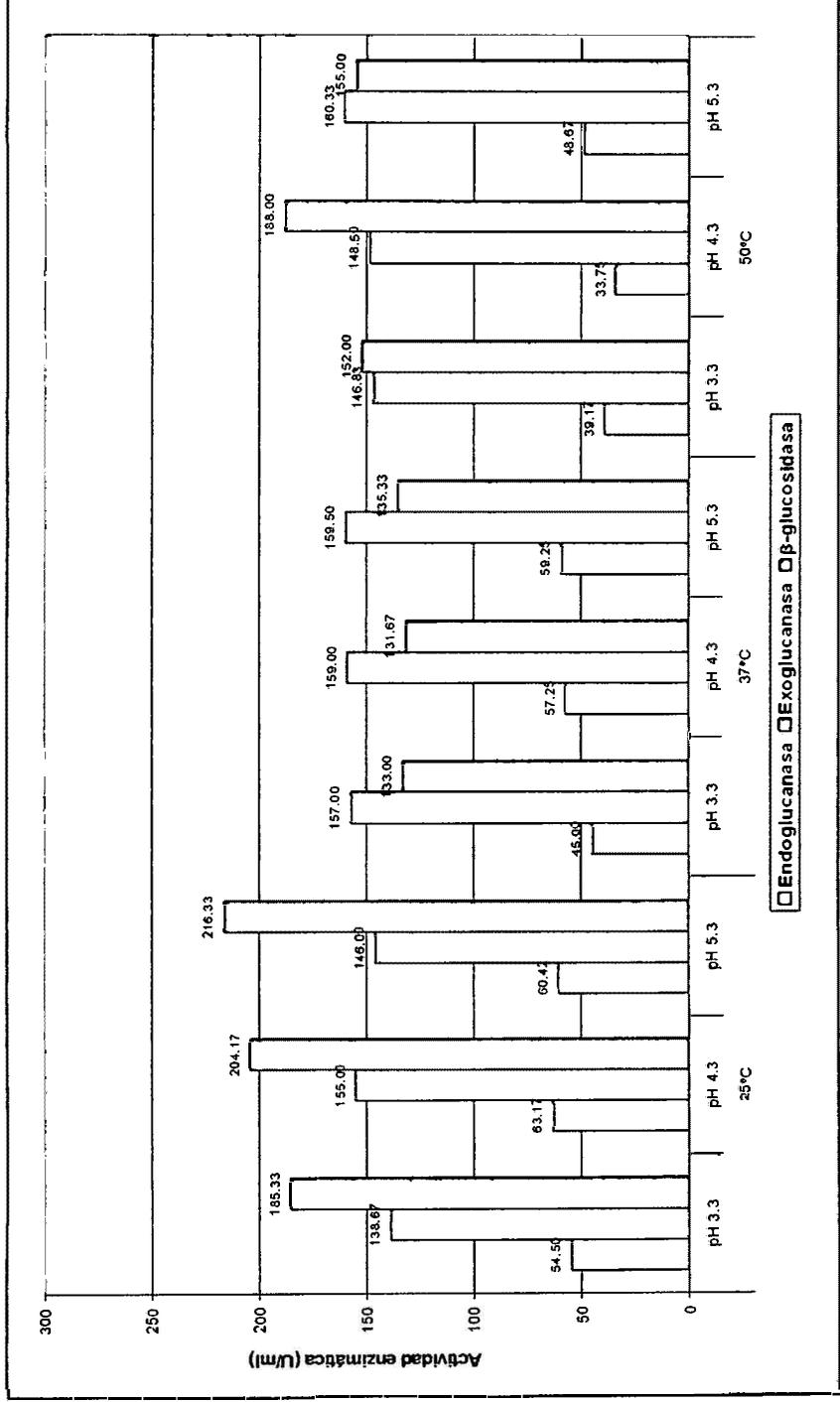
**Gráfico N°2.-** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Quimquibiri – Pichari. Cuzco – 2004.



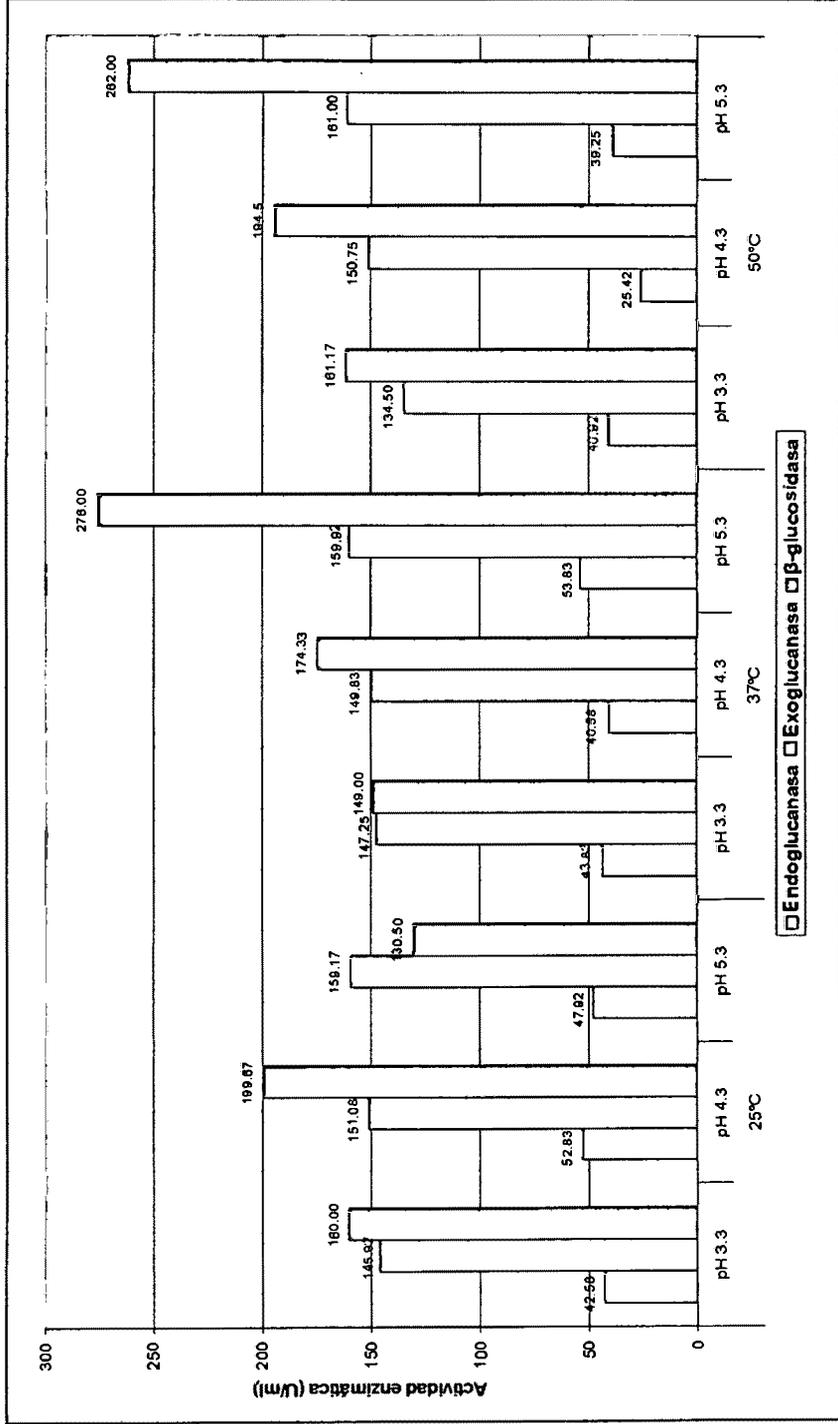
**Gráfico N°3.** - Actividad celolifítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Gran Shinúngari – Pichari, Cuzco – 2004.



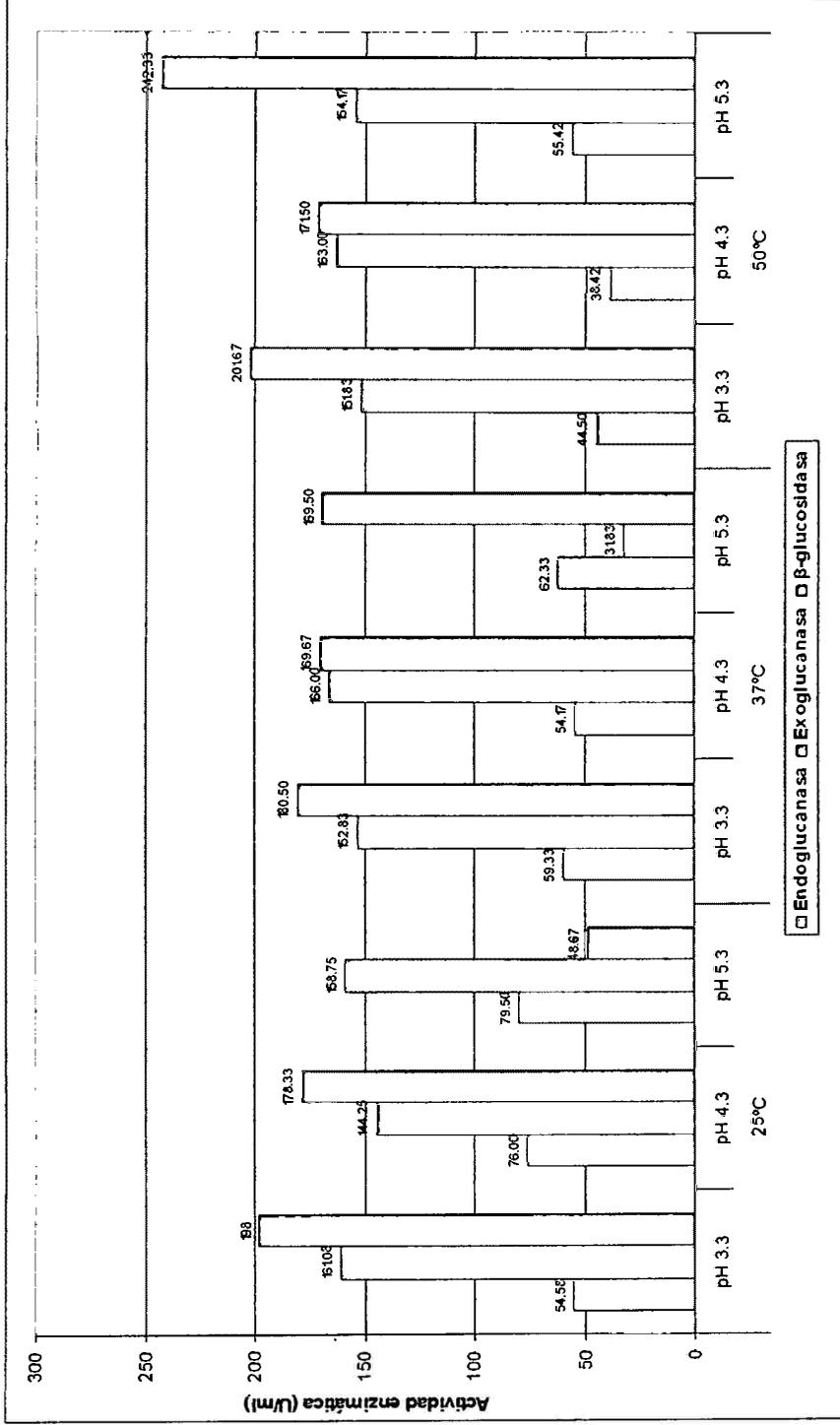
**Gráfico N°4.-** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Otari – Pichari. Cuzco – 2004.



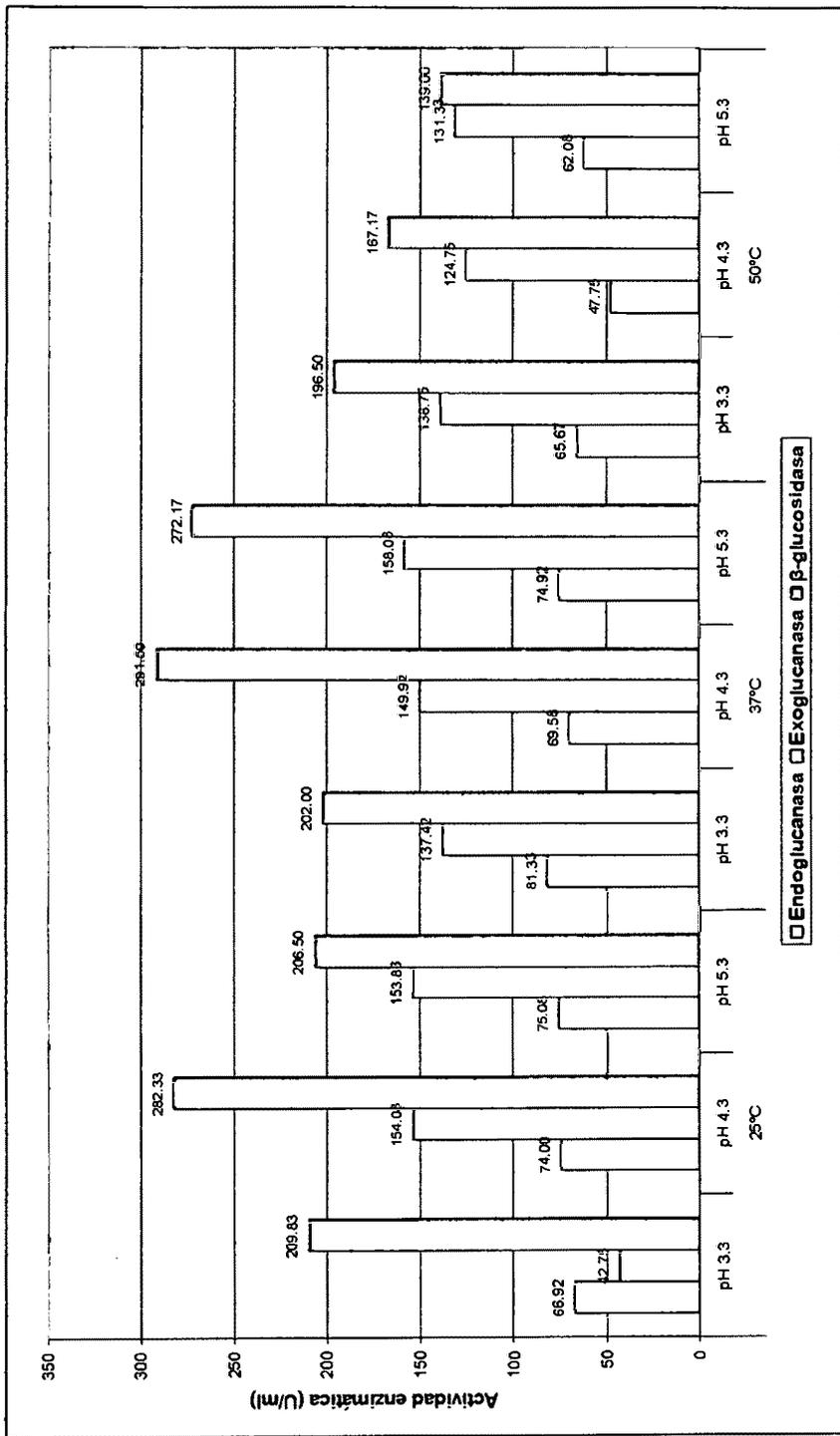
**Gráfico N°5.** - Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Anato – Sivia. Ayacucho – 2004.



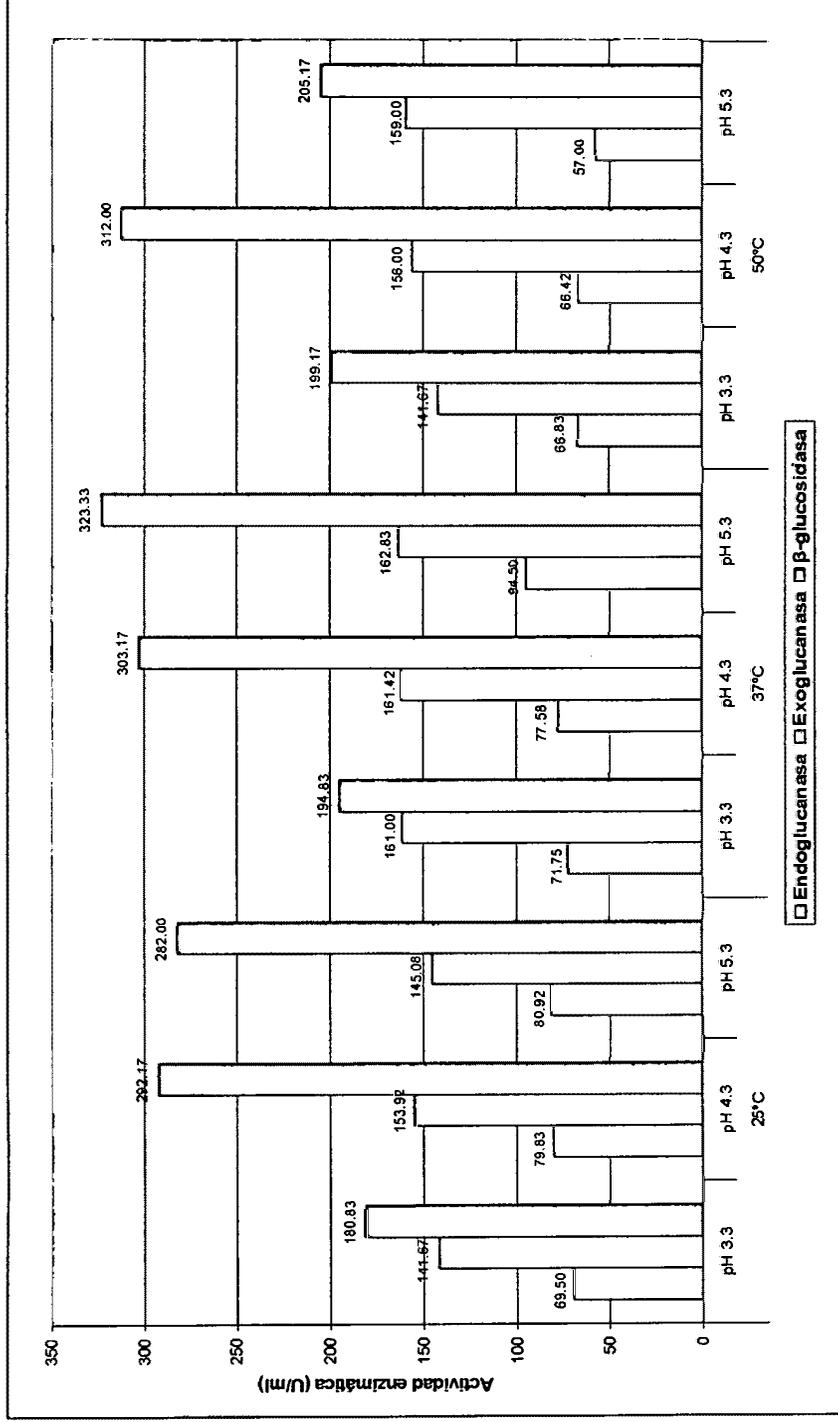
**Gráfico N°6.** - Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Shirutari – Pichari. Cuzco – 2004.



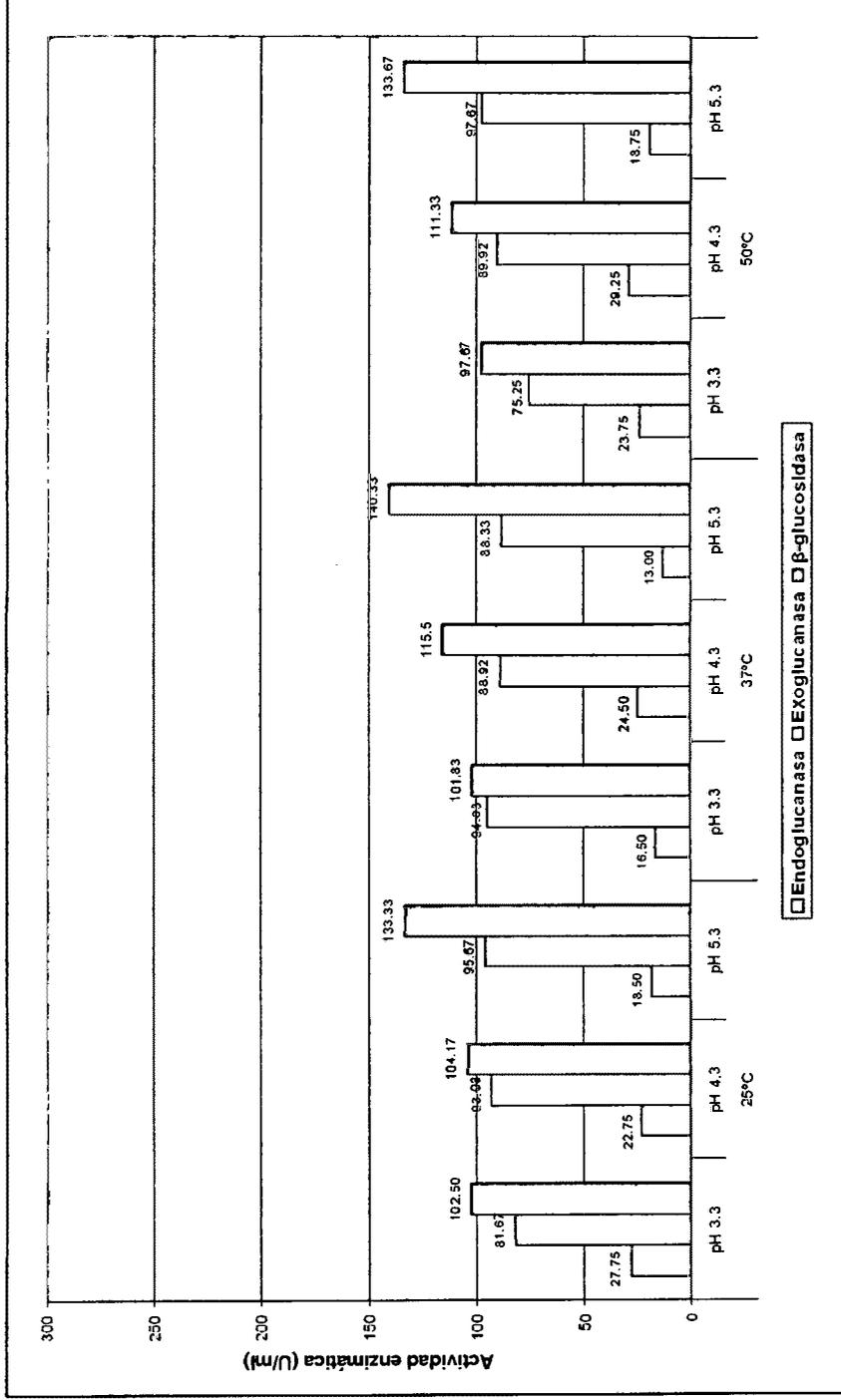
**Gráfico N°7.-** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Uvayeri – Pichari, Cuzco – 2004.



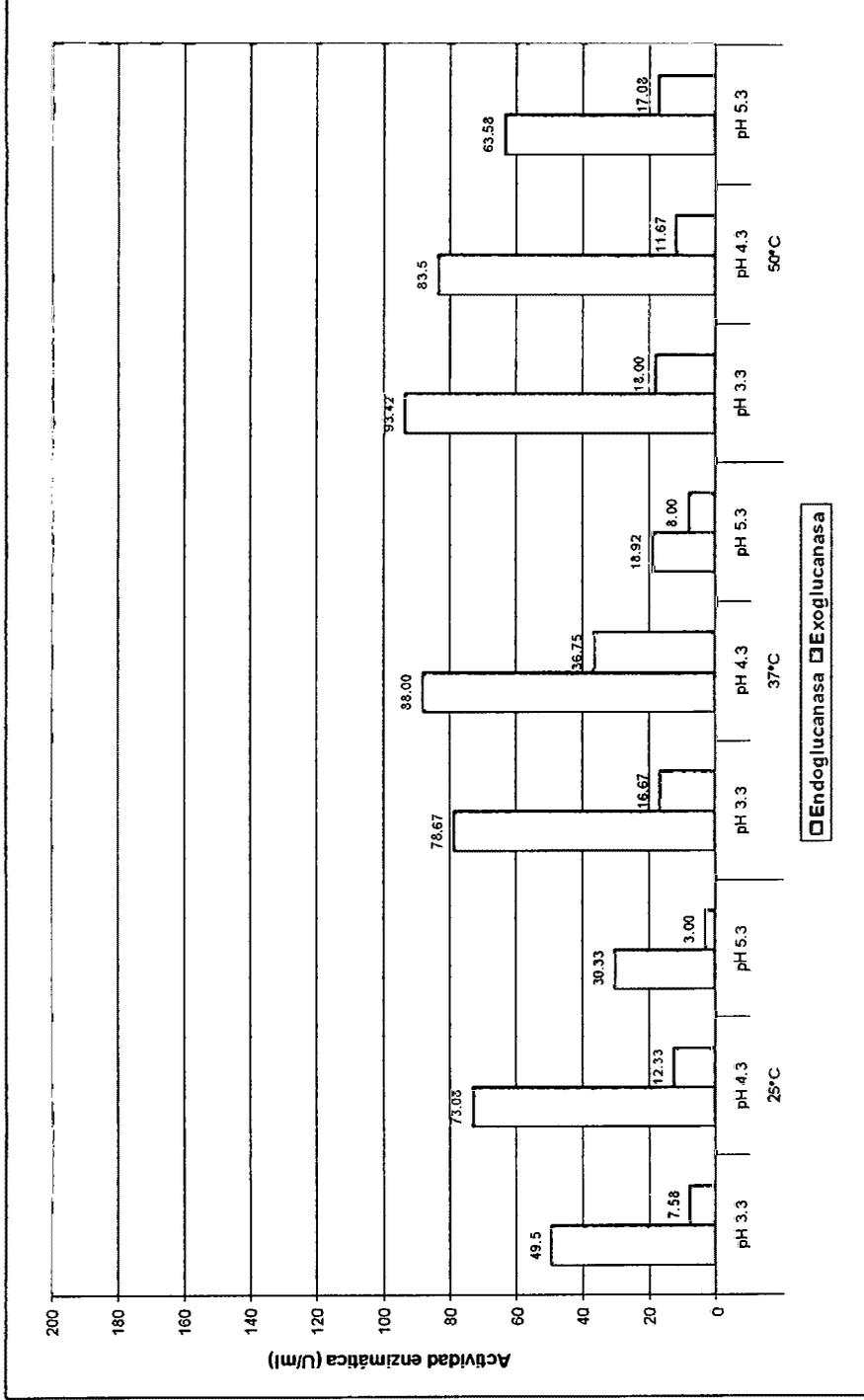
**Gráfico N°8.- Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Memerine – Pichari. Cuzco – 2004.**



**Gráfico N°9.** - Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Cubibari – Pichari, Cuzco – 2004.

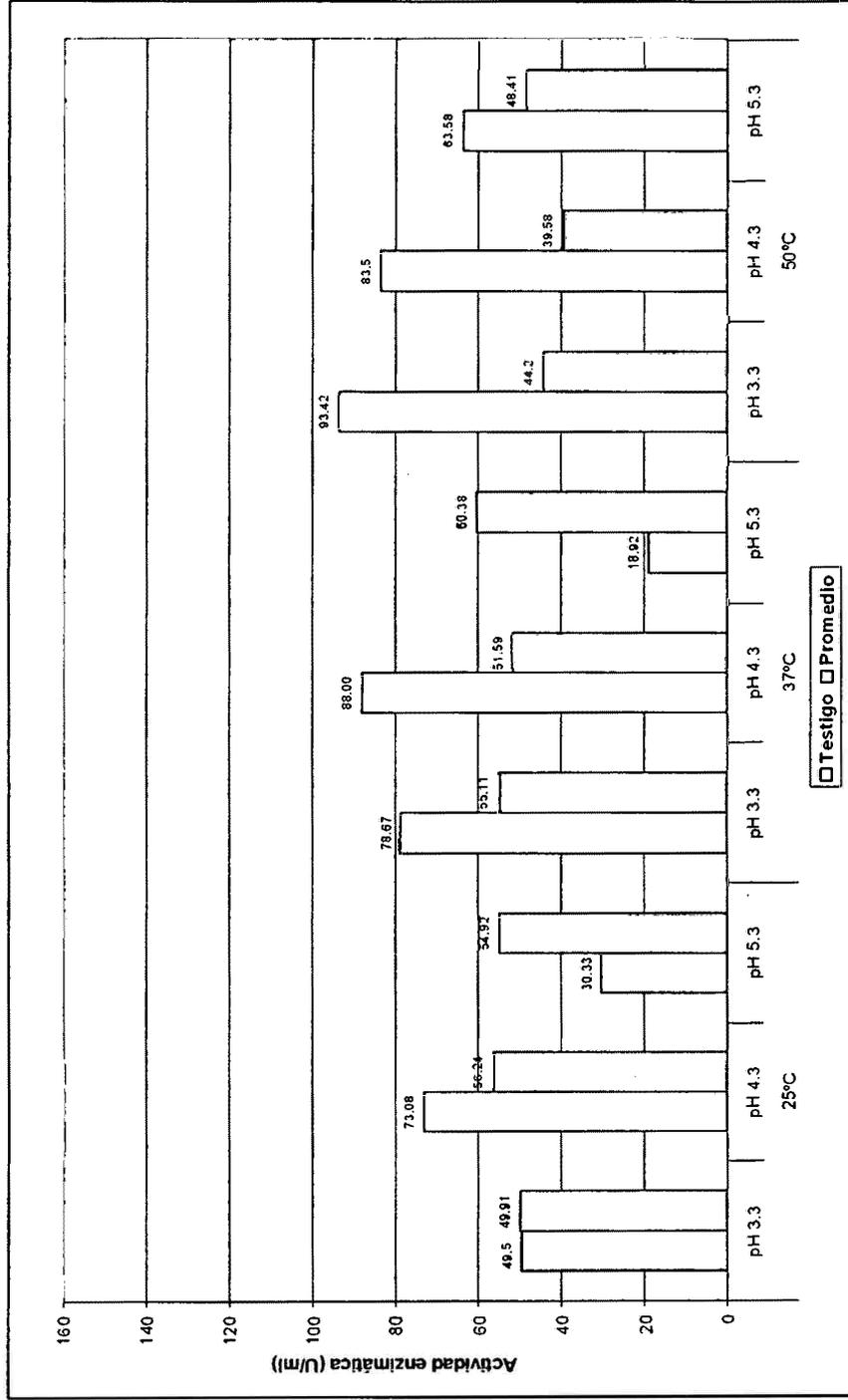


**Gráfico N°10.-** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Sampanturari - Kimbiri. Cuzco - 2004.

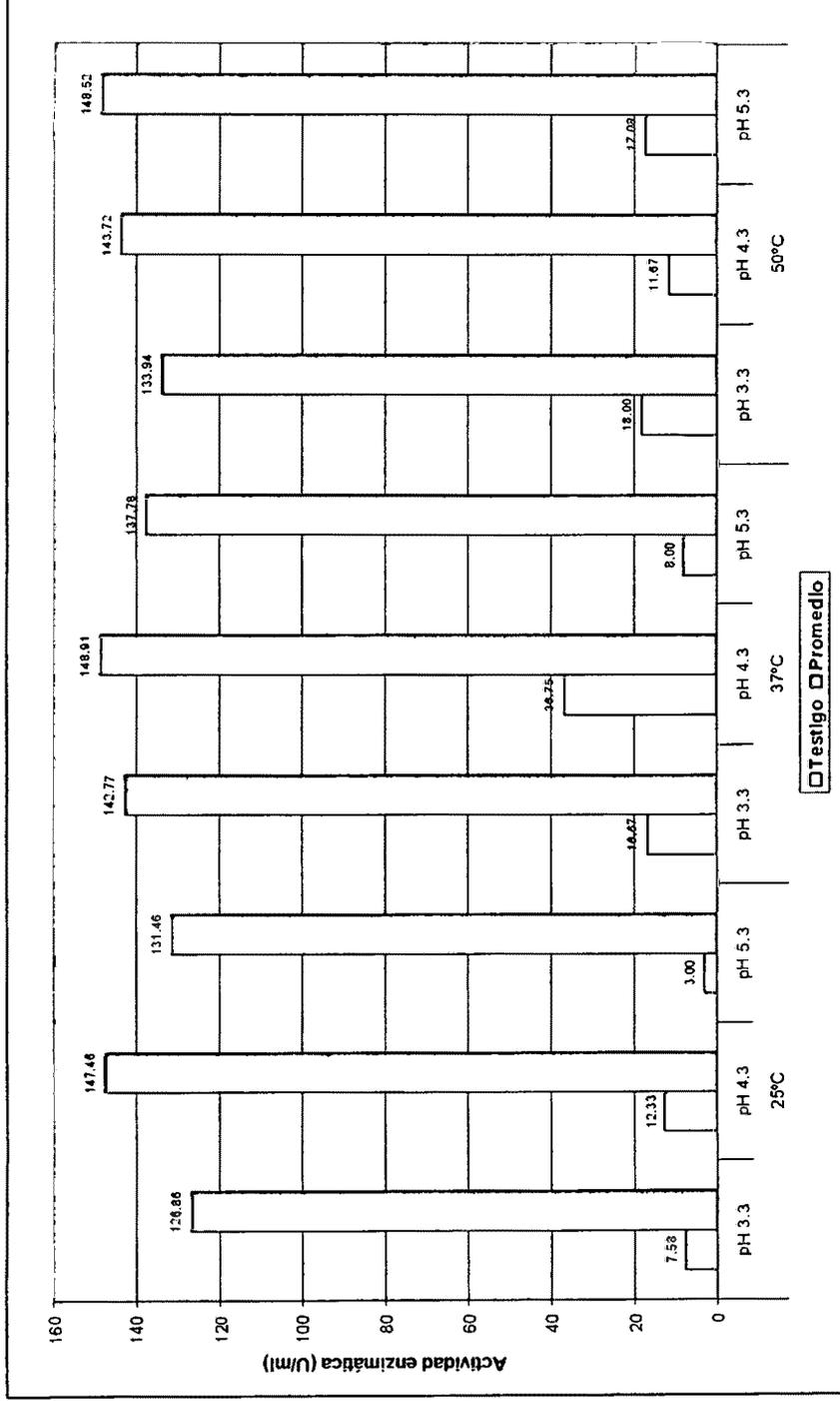


**Gráfico Nº11.-** Actividad endoglucanasa y exoglucanasa del testigo (Celulosa de *Trichoderma reesei*). Laboratorio de

Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.



**Gráfico Nº 12.-** Actividad de endoglucanasas en extracto enzimático crudo de masato de las comunidades nativas del VRAE a 25, 37, 50°C. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.



**Gráfico N°13.-** Actividad de exoglucanasas en extracto enzimático crudo de masato de las comunidades nativas del del VRAE a 25, 37, 50°C. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## **V. DISCUSIÓN**

### **Ubicación geográfica de las comunidades nativas consideradas en el estudio:**

Las 10 Comunidades Nativas a las cuales se tuvo acceso se encuentran ubicadas en los distritos de Pichari y Kimbiri pertenecientes a la provincia de La Convención, departamento de Cuzco; y al distrito de Sivia, perteneciente a la provincia de Huanta del departamento de Ayacucho (Ver Tabla N° 01)

### **Caracterización bioquímica del masato**

En la Tabla N° 02, se presentan los valores de pH, acidéz total, azúcares reductores, azúcares totales y sólidos totales, determinadas en cada una de las muestras de masato. Respecto al pH, el masato presenta un pH ácido en un rango de 4.1 a 4.6; estos valores se encuentran dentro del rango óptimo para las levaduras de la fermentación alcohólica y bacterias de la fermentación láctica que son precisamente los principales grupos de microorganismos responsables de la formación de éstos productos, es decir, el etanol y el ácido láctico que predominan en el masato. Al respecto, en las evaluaciones fisico-químicas realizadas en bebidas fermentadas tradicionales como la chicha de jora, se han

reportado valores de pH de 3.45 (28), para la chicha de molle un pH de 3.9, chicha de siete semillas un pH de 3.9 y chicha de jora un pH de 3.6 (25).

De otro lado, con relación a la acidéz total, expresada en porcentaje de ácido láctico, ésta se encuentra en un rango de 0.078% para la muestra proveniente de la comunidad nativa de Sampantuari, hasta un valor de 0.142 para la comunidad nativa de Cubibari. Estos valores resultan inferiores en comparación a los reportados para la chicha de jora (1.08%), chicha de siete semillas (0.50%) y chicha de molle (0.55%) (25).

Respecto al contenido de azúcares totales, este parámetro se encuentra comprendido entre 2.10 y 4.10 mg/ml; y en cuanto a azúcares reductores los valores varían entre 1.71 y 2.68 mg/ml. Estos resultados son bastante similares a los encontrados para el caso de chicha de jora y chicha de siete semillas (25).

Finalmente, respecto a los sólidos totales, las diferentes muestras de masato presentan valores que oscilan entre 4.5 a 8.3%; porcentaje que resulta ser bastante similar al caso de la chicha de jora (6.71%) pero inferior al reportado para la chicha de siete semillas (12.4%), pero en cambio es un valor que resulta superior al caso de la chicha de molle (4.45%) (25).

Definitivamente, estas características bioquímicas no son homogéneas siempre, por cuanto muchas veces depende de las condiciones en las que se prepara el masato, tales como, proporción de la materia prima, tipo de colado, cantidad de agua, etc. Pero aún así, prácticamente todas las muestras de masato degustadas *in situ* tenían características bastante parecidas, motivo por el cual por lo menos en las comunidades nativas a las que se tuvo acceso, no es posible clasificar el masato en variedades, ya que se utiliza casi un mismo patrón para el proceso de elaboración, con excepción de la comunidad nativa de Sampantuari.

### **Actividad celulolítica del masato**

Con la finalidad de identificar preliminarmente y caracterizar la actividad tanto de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, se determinaron estas actividades enzimáticas a diferentes condiciones de temperatura (25, 37, 50 °C) y pH (3.3, 4.3, 5.3).

En términos generales se ha encontrado actividad de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en las diez muestras de masato (conforme se puede apreciar en los gráficos 1 a 10), sin embargo se observa que la actividad de  $\beta$ -glucosidasas, es mucho más alta, seguida de la actividad de exoglucanasas y por último de endoglucanasas. Al comparar este perfil con el testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*) se observa que, en el caso de los ensayos tanto de actividad de endoglucanasas como de exoglucanasas, los valores son inferiores siendo la actividad de endoglucanasas mucho más alta que la de exoglucanasas (Gráfico Nº 11). Adicionalmente, cabe comentar que si bien de acuerdo a las especificaciones del fabricante (FLUKA), la actividad de la celulasa de *Trichoderma reesei* utilizada como testigo viene especificada a pH 5.0 y 37°C; bajo las condiciones de los ensayos realizados en el presente trabajo, esta enzima demostró tener comportamiento tipo endoglucanasa, teniendo como pH óptimo de 3.3 a 4.3 y temperatura óptima en el rango de 37 a 50°C.

El análisis de varianza señala que la diferencia de la actividad de endoglucanasas entre las muestras de masato procedente de las 10 comunidades nativas estudiadas es altamente significativa; en tanto que para la variable temperatura se ha encontrado diferencia significativa entre las diez comunidades mas no para la variable pH donde no se encontró significancia.

De otro lado, la diferencia de actividad de exoglucanasas entre las muestras de masato procedente de las 10 comunidades nativas es altamente

significativa; sin embargo para la variable temperatura no se encontró significancia, lo mismo que para la variable pH.

En cuanto a la actividad de  $\beta$ -glucosidasas, la diferencia entre las muestras de masato procedentes de las diez comunidades nativas en estudio fue altamente significativa, sin embargo no hubo significancia para la variable temperatura, pero si hubo diferencia significativa para la variable pH.

La existencia de diferencias altamente significativas tanto de actividad de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en el masato de las diez comunidades nativas nos revelan que, si bien el masato del VRAE tiene un patrón común de elaboración, en cada Comunidad Nativa existen particularidades y detalles que tienen que ver con el tipo de materia prima utilizada, el punto óptimo de cocción, proporción de yuca:camote, tiempo de fermentación, proporción de agua, tipo de inóculo, etc.

Respecto a la actividad de endoglucanasas se observa que, al haber diferencia significativa entre las tres temperaturas ensayadas: 25, 37 y 50° C, se puede deducir que la temperatura óptima es de 37° C no pudiendo afirmarse lo mismo para el pH, pues al no haber significancia entre los valores ensayados de 3.3, 4.3 y 5.3 lo que se puede afirmar es que por las características propias de la fermentación del masato las endoglucanasas presentes actúan bajo condiciones ácidas.

Los resultados, en cuanto a la actividad de exoglucanasas, muestran que, existe diferencia significativa entre las temperaturas a las que fueron sometidos los tratamientos (25, 37 y 50 °C) considerándose como temperatura óptima a 37 °C, sin embargo no se puede afirmar lo mismo para el caso del pH (3.3, 4.3 y 5.3) pues no existe significancia entre los valores de pH tratados, debido a ello es posible aseverar que se trata de exoglucanasas con actividad bajo condiciones ácidas.

Con referencia a las  $\beta$ -glucosidasas, el análisis de varianza para las muestras de masato procedentes de las 10 comunidades nativas, indica que su actividad no muestra diferencia significativa en cuanto a temperatura se refiere, respecto al pH existe diferencia significativa considerándose entonces como pH óptimo a 5.3 para la actividad de esta enzima.

Al promediar los valores de las actividades de endoglucanasas, exoglucanasas a las diferentes condiciones de temperatura y pH ya señaladas en cada uno de los extractos enzimáticos de las diez muestras de masato y al enfrentarlos con la actividad del testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*) se observa que existe una marcada diferencia en cuanto a endoglucanasas se refiere (Gráfico N° 12) puesto que los valores son más altos con referencia al extracto enzimático crudo, registrando la mayor actividad, para el testigo, a una temperatura de 50°C y pH 3.3, para la muestra problema a 37 °C y pH 5.3. En lo referente a exoglucanasas (Gráfico N° 13) la actividad presente en el extracto enzimático crudo es visiblemente superior en comparación con la celulasa del testigo, experimentando una mayor actividad a las temperaturas de 25, 37, 50 °C y a pH 4.3 para las dos primeras temperaturas y 5.3 para 50 °C, se deduce entonces que la actividad enzimática es mayor sobre celulosa cristalina presente en la materia prima utilizada para la elaboración de masato.

Aunque no se conoce qué especies o géneros de microorganismos celulolíticos, ya sea de bacterias o de hongos filamentosos están presentes en el masato, existe información relacionada con la caracterización de celulasas de origen microbiano. Levin L. y Forchiassin, F.(1997) caracterizaron los efectos que tienen las condiciones de cultivo sobre la producción de las enzimas del complejo celulasa en *Trametes trogii* encontrando que la temperatura óptima para la actividad de endoglucanasas, exoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas fue de 45, 50 y

60 °C respectivamente; mientras que el pH óptimo fue de 3.1, 4.1 y 5.3, respectivamente. Wei, D. y Col. (1992) determinaron la actividad celulolítica de 12 especies de *Xylaria* y cinco especies de *Hypoxylon*, además de *Trichoderma reesei* encontrando que el rango de temperatura óptima fue de 37 a 50°C y el pH óptimo de 5.0. Pardo, A. y Forchiassin, F. (1999) examinaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno, temperatura y pH en la producción de celulasas por *Nectria catalinensis* empleando como fuente de carbono celulosa microcristalina; encontraron como temperatura óptima 23°C , un óptimo para la estabilidad entre 23 y 37°C y un pH óptimo entre 4.8 y 5.8 (42). Estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente estudio.

## VI. CONCLUSIONES

1. La elaboración del masato en las comunidades nativas del Valle del Río Apurímac y Ene obedece a un patrón común, en cada una de ellas existen detalles que los hacen característicos, en cuanto a preparación se refiere, es decir se manejan proporciones diferentes respecto a la materia prima, cantidad de agua, tiempo de cocción de la yuca, tiempo de fermentación, pero los pasos que se siguen para obtener el producto final son los mismos. Con referencia al consumo, el masato es considerado como bebida y alimento, además forma parte de la vida cotidiana de los nativos Asháninka.
2. El extracto enzimático crudo de cada una de las muestras de masato procedentes de las diez comunidades nativas del VRAE, mostró tener actividad enzimática tanto de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, siendo la actividad de  $\beta$ -glucosidasas mucho mayor, seguida de la actividad de exoglucanasas, y finalmente, las endoglucanasas; asimismo, la actividad celulolítica del testigo *Trichoderma*

*reesei* fue inferior en cuanto a exoglucanasas, con referencia a las endoglucanasas la actividad se encuentra por encima de la presente en el extracto enzimático crudo. Con base a lo determinado experimentalmente se puede afirmar que las enzimas presentes en el extracto enzimático crudo, degradan preferentemente las regiones cristalinas de la fibra presente en la yuca, insumo empleado para la elaboración del masato. Además se deduce que estas enzimas muestran actividad frente a pH ácido.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Determinar la actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de muestras de bebida únicas, para garantizar los resultados con diferencias claramente apreciables, debido al problema que genera la manipulación de numerosas muestras por las variaciones existentes en cuanto a manejo de insumos durante su preparación.
2. Someter al masato a análisis bromatológico y microbiológico de control de calidad, para diseñar normativas sobre su elaboración y su posible comercialización.
3. Realizar estudios en esta bebida con el fin de generar conocimiento científico y proyectar su posible industrialización.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Albornoz, C.** 2000. Alfa-Amilasa bacterial y levadura de panificación en la elaboración del masato. Rev. Desafíos. 1:47-55.
2. **AMUVRAE.** 2004. Memoria anual. Asociación de municipalidades del Valle del Río Apurímac y Ene. San Francisco-Ayacucho.
3. **Ayvar, E., Humaní, M.** 1991. Hidrólisis y fermentación simultánea de almidón de yuca para la producción de etanol. Tesis-UNSLG. Fac. Ing. Qca. Ica - Perú.
4. **Bayer, E.; Chanzy, H.; Lamed, R. y Shoham, Y.** 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. Curr Opin Struct Biol. 8:548-557.
5. **Beguin, P.** 1990. Molecular biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol. France. Vol:44. pag. 219-248
6. **Beguin, P. y Aubert J.**1994. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev. 13:25-58.
7. **Beuchat, L.** 1983. Biotechnology. Vol.5. Indigenous fermented foods. Edit. Verlag Chemic. Weinheim. Alemania.
8. **Britton, E.** 1970. The insect of Australia. Melbourne University Press.
9. **Bruchman, E.** 1980. Bioquímica técnica: Química alimentaria de las fermentaciones y agrícola. Editorial Acribia. Zaragoza-España.
10. **CAAAP.** 1976. Amazonía peruana. Centro amazónico de antropología y aplicación práctica. Vol.Nº 1, Núm.1. Lima - Perú.
11. **CAAAP.** 1980. Amazonía peruana. Centro amazónico de antropología y aplicación práctica. Vol. Nº 3: Núm. 5. Lima - Perú.

12. **Carrard G.; Koivula, A.; Söderlund, H. y Beguin, P.** 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. PNAS. 97:10342-10347.
13. **Cavero, R.** 1986. Maíz, chicha y religiosidad andina. UNSCH. Ayacucho-Perú.
14. CIP. 1999. Alcanzando el mundo desde el Perú. Centro Internacional de la Papa. Edit. El Comercio. Lima - Perú.
15. **Dajos, R.** 2001. Entomología forestal: Los insectos y el bosque. Edit. Mundi-Prensa. México.
16. **Doit, R.; Goldstein, M.; Hashida, S.; Park, J. y Takaji, M.** 1994. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome. Crit Rev Microbiol. 20:87-93.
17. **FLUKA CHEMIE GmgH.** 2002. Laboratory chemicals and analytical reagents. Sigma Aldrich. Switzerland.
18. **Goncalves De Lima, O.** 1990. El "cauim" y la "chicha": Las cervezas insalivadas de América. En: "pulque, balché y pajuaru en la etnobiología de las bebidas y los alimentos fermentados". Fondo de cultura económica, México, D.F.
19. **Herrera, J.** 2002. Pobreza y desigualdad en el área andina – elementos para un nuevo paradigma. Bulletin De l'Institut Francais d'Études Andines. Paris - Francia.
20. **Lehninger, A.** 1991. Principios de bioquímica. Ediciones Omega S.A. Barcelona-España.
21. **Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J.** 1998. Brock. Biología de los microorganismos. Octava edición. Prentice Hall. Madrid - España.
22. **Mejía, T.; Mujica, F.; Gonzáles, A. y Ortega, J.** 2002. Proteínas con afinidad a celulosa: Una herramienta en Biotecnología. Avance y perspectiva. CINESTAV-IPN. Vol: 21. pp. 267-271. México.
23. **Miller, G.** 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. Vol: 31. Pag. 426-428. Natick - Massachusetts
24. **Moat, A. y Foster, J.** 1995. Microbial physiology. 3th.ed. Wiley-Liss New York-USA.
25. **Mujica, F.** 2003. Caracterización bioquímica y tecnológica de bebidas fermentadas tradicionales. UNSCH. Ayacucho-Perú.

26. **Mujica, F.** 2001. Clonación y expresión de un dominio de unión de celulosa (CBD) de *Cellulomonas flavigena*. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias, Especialidad de Biotecnología. CINVESTAV-IPN. México.
27. **Pearson, D.** 1981. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España.
28. **Quillama, E.** 1999. Estudio de la microflora de la chicha de jora y su implicancia en la alimentación humana. En: Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, Oaxaca-México.
29. **Ramírez, L.** 2004. Determinación de la actividad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti". Tesis-UNSCH. Fac. Cs. Bs. Ayacucho - Perú.
30. **Ramírez, P.** 1993. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Tesis-UNMSM. Fac. Cs. Bs. Lima - Perú.
31. **Singh, A. y Hayashi, K.** 1995. Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis. Adv Appl Microbiol. 40:1-35.
32. **Srisodsuk, M.; Reinikainen, T.; Penttilä, M. y Teeri, T.** 1993. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. J Biol Chem. 268:20756-61.
33. **Stryer, L.** 1995. Bioquímica. Cuarta Edición. Edit. Reverté. S.A. Tomo II. Barcelona - España.
34. **Taype, G.** 1987. Estudio comparativo del rendimiento en alcohol etílico a partir de la yuca, la pituca, y el maíz. Tesis-UNSCH. Fac. Ing. Qca. Ayacucho - Perú.
35. **Vilches, L.** 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis-UNMSM. Fac. Cs. Bs. Lima - Perú.
36. **Ward, O.** 1989. Biotecnología de la Fermentación. Principios, Procesos y Productos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España.
37. **Watanabe, H. y Tozuda, G.** 2001. Animal cellulases. CMLS, Cell. Mol. Life. Sci. Vol: 58. pag.1167-1178.
38. Camote: Un tesoro para los pobres. En URL:<http://www.cipotato.org/Español/camote/camote.htm>
39. Cauim among the tupinambá. En URL:<http://www.sciencedaily.com/encyclopedia/cauim>.

40. Celulasas: Celulasas clostridiales, estado actual e importancia biotecnológica. En URL:[http://www.unipamplona.edu.co/upw\\_pdf/clon\\_1\\_art5.pdf](http://www.unipamplona.edu.co/upw_pdf/clon_1_art5.pdf).
41. Cultivos: Camote. En URL:<http://www.insitu.org.pe/webinsitu/camote.htm>.
42. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. En URL:<http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/Basic.htm>.
43. Embriaguez premonitoria de cauim. En URL:<http://www.escolavesper.com.br/embriaguezpremonitoria.htm>.
44. Glúcidos: Estructura de la celulosa. En URL:<http://www.um.es/molécula/celulosa.htm>.
45. Glúcidos o Carbohidratos en los alimentos. En: URL: [http://mazinger.sisb.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/schmidt.html](http://mazinger.sisb.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidt.html).
46. Las algas. En URL: <http://www.geocities.com/lebr7/algas.html>.
47. Raíces y tubérculos biofortificados. En URL:<http://www.ciat.cgiar.org/agroempresas/sistemayuca/yuca.htm>.
48. Vasilhas guarani de preparar cauim. En URL:<http://www.dhi.uem.br/publicacoesdhi/janus/01.htm>.
49. Yuca (*Manihot esculenta*). En URL: <http://www.lamolina.edu.pe/investigación/programa/yuca>.

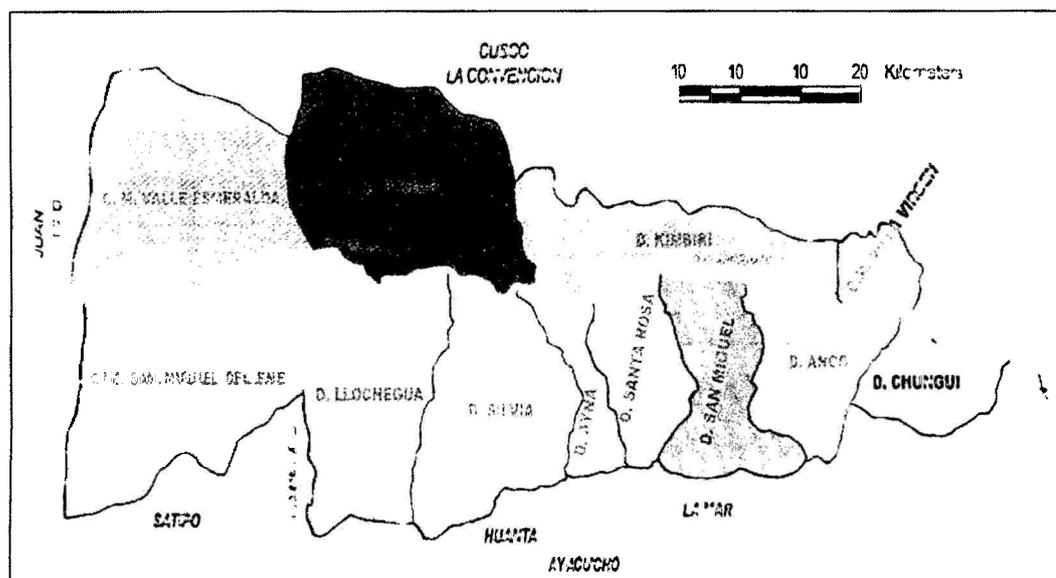
## **ANEXO**

## ANEXO Nº 01

**Cuadro Nº 02:** Distribución poblacional del VRAE – 2004.

Nº	DISTRITOS	CENTROS POBLADOS	ANEXOS/ COMUNIDADES	HABITANTES
01	Sivia	7	59	20,535
02	Llochegua	11	35	11,415
03	Ayna-San Francisco	3	47	14,535
04	Santa Rosa	2	35	17,765
05	Anco	4	37	12,445
06	Kimbiri	4	59	22,795
07	Pichari	3	52	20,205
08	Palmapampa	2	14	5,575
09	Villa Virgen	1	12	4,360
10	San Miguel del Ene	1	23	4,200
11	Valle Esmeralda	2	24	4,875
<b>TOTAL</b>		<b>39</b>	<b>394</b>	<b>138,705</b>

Fuente: (2)



**Figura Nº 02.-** Distritos y centros poblados del VRAE – 2004.

Fuente: (2)

**ANEXO N° 02**

**FICHA DE ENCUESTA**

**Estudio etnofermentológico sobre la elaboración de masato en el VRAE**

Nombre del informante:.....

Nombre de la comunidad:.....

Materia prima:.....

Personas que intervienen en el insalivamiento:.....

Sexo:..... Edad:..... Condición:.....

Etapas de la tecnología tradicional (selección, cocción, mezclado, proporción de agua, etc.)

1).....

.....

2).....

.....

3).....

.....

4).....

.....

Costumbres previas a la etapa de masticación:.....

.....

Tipo de agua empleada:.....

.....

Tiempo de fermentación:.....

.....

Tipo de recipientes:.....

.....

Momento óptimo de consumo:.....

.....

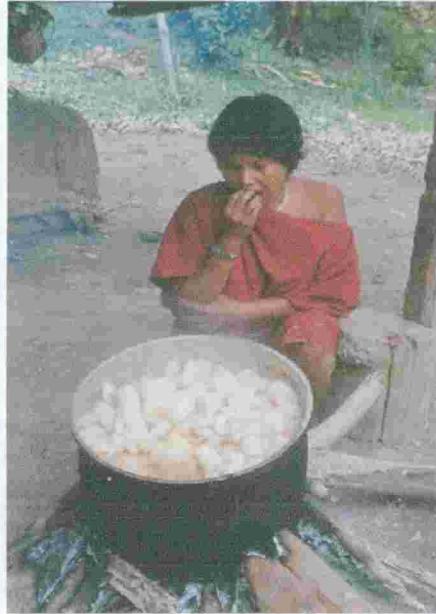
Costumbres ligadas al consumo del masato:.....

.....

Fecha:.....

### **ANEXO Nº 03**

#### **ELABORACIÓN DE MASATO EN LAS COMUNIDADES NATIVAS DEL VRAE**



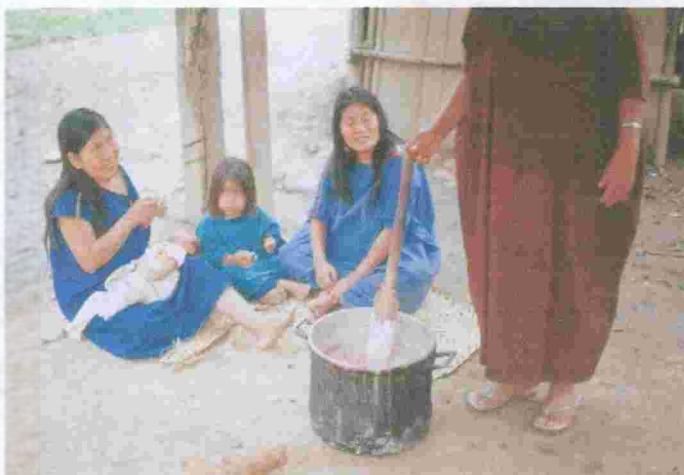
Fotografía Nº 01.- Proceso de cocción de la yuca cortada en rebanadas. Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE) – 2004.



Fotografía Nº 02.- Pelado del camote y masticación por una mujer. Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE) – 2004.

## **ANEXO Nº 04**

### **ELABORACIÓN DE MASATO EN LAS COMUNIDADES NATIVAS DEL VRAE**



Fotografía Nº 03.- Amasado de la yuca y el camote masticado.  
Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE) – 2004.



Fotografía Nº 04.- Proceso de colado del masato  
en el shikame, antes de su consumo. Valle del  
Río Apurímac y Ene (VRAE) – 2004.

## ANEXO N° 05

### MUESTRAS DE MASATO ELABORADAS EN EL VRAE – 2004



Fotografía N° 05.- Masato listo para su consumo en una suta. Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE) – 2004.



Fotografía N° 06.- Muestras de masato para su análisis en el laboratorio de Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Biológicas – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## ANEXO N° 06

### VOCABULARIO ASHÁNINKA UTILIZADO EN LAS COMUNIDADES NATIVAS DEL VRAE

Abiró	: Hola
Aitápae	: Suficiente
Hatáhana	: Adiós
Kitáitiri	: Buenos días
Nocoimpi	: Te quiero
Oboroke	: Sedimento empleado para acelerar el proceso de fermentación del masato, proveniente de preparados anteriores y cuyo tiempo de duración es de un mes.
Pamuco	: Nombre común del árbol cuyos frutos se utilizan como mates para beber el masato.
Pata	: Objeto de madera, a manera de paleta, empleado para amasar la yuca en la elaboración del masato.
Piré	: Brindis
Pearenche	: Término empleado para hacer referencia al masato.
Shabitae	: Buenas tardes
Shikame	: Colador tejido con hoja de palmera, el cual sirve para filtrar el masato antes de consumo.
Shimuyrori	: Buenas noches
Shimianti	: Canasta con la que se transporta la yuca desde el campo de cultivo hasta la aldea
Shinane	: Mujer
Shirámpare	: Varón
Shurina	: En conjunto, hojas de palmera que se utilizan para elaborar el denominado shikame.
Suta	: Recipiente especial a manera de mate donde se sirve y consume el masato.

## ANEXO N° 07

**Tabla N° 03:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de santushari – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	43.58	148.00	231.50
	4.3	47.00	155.17	252.33
	5.3	52.67	95.58	281.67
37°C	3.3	59.33	139.25	133.17
	4.3	32.33	159.92	151.67
	5.3	57.75	159.17	190.67
50°C	3.3	41.67	133.92	193.83
	4.3	42.08	147.08	180.83
	5.3	57.25	154.75	183.83

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**Tabla N° 04:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Quimquibiri – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	47.83	148.00	231.00
	4.3	52.00	160.08	209.67
	5.3	44.75	46.83	257.33
37°C	3.3	64.33	151.58	143.17
	4.3	56.33	153.08	196.00
	5.3	77.42	153.00	158.83
50°C	3.3	29.50	134.17	167.83
	4.3	30.25	148.58	134.50
	5.3	42.67	158.75	166.33

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

## ANEXO N° 08

**Tabla N° 05:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Gran Shinúngari – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	45.67	149.58	255.33
	4.3	50.50	154.67	294.5
	5.3	51.67	155.17	287.67
37°C	3.3	62.33	149.25	131.50
	4.3	55.17	154.08	151.67
	5.3	62.25	152.42	176.5
50°C	3.3	54.17	150.5	172.5
	4.3	47.08	154.67	184.17
	5.3	56.83	148.75	199.00

Leyenda

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**Tabla N° 06:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Otari – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	46.17	111.25	175.33
	4.3	44.33	153.25	180.33
	5.3	37.75	158.5	200.83
37°C	3.3	47.33	137.33	184.67
	4.3	48.42	146.92	210.17
	5.3	48.50	152.75	249.67
50°C	3.3	35.83	135.00	178.83
	4.3	35.33	153.92	164.00
	5.3	46.17	159.50	174.00

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

## ANEXO Nº 09

**Tabla Nº 07:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Anato – Sivia. Ayacucho – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	54.50	138.67	185.33
	4.3	63.17	155.00	204.17
	5.3	60.42	146.00	216.33
37°C	3.3	45.00	157.00	133.00
	4.3	57.25	159.00	131.67
	5.3	59.25	159.50	135.33
50°C	3.3	39.17	146.83	152.00
	4.3	33.75	148.50	188.00
	5.3	48.67	160.33	155.00

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**Tabla Nº 08:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Shirutiari – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	42.58	145.92	160.00
	4.3	52.83	151.08	199.67
	5.3	47.92	159.17	130.50
37°C	3.3	43.83	147.25	149.00
	4.3	40.58	149.83	174.33
	5.3	53.83	159.92	276.00
50°C	3.3	40.92	134.50	161.17
	4.3	25.42	150.75	194.50
	5.3	39.25	161.00	262.00

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

## ANEXO N° 10

**Tabla N° 09:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Uvayeri – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	54.58	161.08	198.00
	4.3	76.00	144.25	178.33
	5.3	79.50	158.75	48.67
37°C	3.3	59.33	152.83	180.50
	4.3	54.17	166.00	169.67
	5.3	62.33	31.83	169.50
50°C	3.3	44.50	151.83	201.67
	4.3	38.42	163.00	171.50
	5.3	55.42	154.17	242.33

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**Tabla N° 10:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Memerini – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
25°C	3.3	66.92	42.75	209.83
	4.3	74.00	154.08	282.33
	5.3	75.08	153.83	206.50
37°C	3.3	81.33	137.42	202.00
	4.3	69.58	149.92	291.50
	5.3	74.92	158.08	272.17
50°C	3.3	65.67	138.75	196.50
	4.3	47.75	124.75	167.17
	5.3	62.08	131.33	139.00

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

## ANEXO Nº 11

**Tabla Nº 11:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Cubibari – Pichari. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
<b>25°C</b>	3.3	69.50	141.67	180.83
	4.3	79.83	153.92	292.17
	5.3	80.92	145.08	282.00
<b>37°C</b>	3.3	71.75	161.00	194.83
	4.3	77.58	161.42	303.17
	5.3	94.50	162.83	323.33
<b>50°C</b>	3.3	66.83	141.67	199.17
	4.3	66.42	156.00	312.00
	5.3	57.00	159.00	205.17

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**Tabla Nº 12:** Actividad celulolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de la comunidad nativa de Sampantuari – Kimbiri. Cusco – 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml) <sup>(p)</sup>		
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	β-Glucosidasa
<b>25°C</b>	3.3	27.75	81.67	102.50
	4.3	22.75	93.08	104.17
	5.3	18.50	95.67	133.33
<b>37°C</b>	3.3	16.50	94.83	101.83
	4.3	24.50	88.92	115.50
	5.3	13.00	88.33	140.33
<b>50°C</b>	3.3	23.75	75.25	97.67
	4.3	29.25	89.92	111.33
	5.3	18.75	97.67	133.67

Leyenda:

p: Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

## ANEXO N° 12

**Tabla N° 13:** Actividad endoglucanasa y exoglucanasa del testigo (Celulasa de *Trichoderma reesei*). Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho– 2004.

TEMPERATURA	pH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml)	
		Endoglucanasa	Exoglucanasa
25°C	3.3	49.50	7.58
	4.3	73.08	12.33
	5.3	30.33	3.00
37°C	3.3	78.67	16.67
	4.3	88.00	36.75
	5.3	18.92	8.00
50°C	3.3	93.42	18.00
	4.3	83.50	11.67
	5.3	63.58	17.08

### ANEXO N° 13

**Tabla N° 14:** Actividad de endoglucanasas en extracto enzimático crudo de masato de las comunidades nativas del VRAE a 25, 37, 50 °C. 2004.

Muestra	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml)								
	25°C			37°C			50°C		
	pH 3.3	pH4.3	pH 5.3	pH 3.3	pH4.3	pH 5.3	pH3.3	pH4.3	pH5.3
<b>Testigo</b>	49.50	73.08	30.33	78.67	88.00	18.92	93.42	83.50	63.58
<b>M-1</b>	43.58	47.00	52.67	59.33	32.33	57.75	41.67	42.08	57.25
<b>M-2</b>	47.83	52.00	44.75	64.33	56.33	77.42	29.5	30.25	42.67
<b>M-3</b>	45.67	50.50	51.67	62.33	55.17	62.25	54.17	47.08	56.83
<b>M-4</b>	46.17	44.33	37.75	47.33	48.42	48.50	35.83	35.33	46.17
<b>M-5</b>	54.50	63.17	60.42	45.00	57.25	59.25	39.17	33.75	48.67
<b>M-6</b>	42.58	52.83	47.92	43.83	40.58	53.83	40.92	25.42	39.25
<b>M-7</b>	54.58	76.00	79.50	59.33	54.17	62.33	44.50	38.42	55.42
<b>M-8</b>	66.92	74.00	75.08	81.33	69.58	74.92	65.67	47.75	62.08
<b>M-9</b>	69.50	79.83	80.92	71.75	77.58	94.50	66.83	66.42	57.00
<b>M-10</b>	27.75	22.75	18.50	16.50	24.50	13.00	23.75	29.25	18.75
<b>Promedio</b>	49.91	56.24	54.92	55.11	51.59	60.38	44.20	39.58	48.41

**Tabla N° 15:** Actividad de exoglucanasas en extracto enzimático crudo de masato de las comunidades nativas del VRAE a 25, 37, 50 °C. 2004.

Muestra	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml)								
	25°C			37°C			50°C		
	pH 3.3	pH4.3	pH5.3	pH 3.3	pH4.3	pH 5.3	pH 3.3	pH4.3	pH 5.3
<b>Testigo</b>	7.58	12.33	3.00	16.67	36.75	8.00	18.00	11.67	17.08
<b>M-1</b>	148.00	155.17	95.58	139.25	159.92	159.17	133.92	147.08	154.75
<b>M-2</b>	148.00	160.08	46.83	151.58	153.08	153.00	134.17	148.58	158.75
<b>M-3</b>	149.58	154.67	155.17	149.25	154.08	152.42	150.50	154.67	148.75
<b>M-4</b>	111.25	153.25	158.50	137.33	146.92	152.75	135.00	153.92	159.50
<b>M-5</b>	138.67	155.00	146.00	157.00	159.00	159.5	143.83	148.50	160.33
<b>M-6</b>	145.92	151.08	159.17	147.25	149.83	159.92	134.50	150.75	161.00
<b>M-7</b>	161.00	144.25	158.75	152.83	166.00	31.83	151.83	163.00	154.17
<b>M-8</b>	42.75	154.08	153.83	137.42	149.92	158.08	138.75	124.75	131.33
<b>M-9</b>	141.67	153.92	145.08	161.00	161.42	162.83	141.67	156.00	159.00
<b>M-10</b>	81.67	93.08	95.67	94.83	88.92	88.33	75.25	89.92	97.67
<b>Promedio</b>	126.86	147.46	131.46	142.77	148.91	137.78	133.94	143.72	148.52

## ANEXO N° 14

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

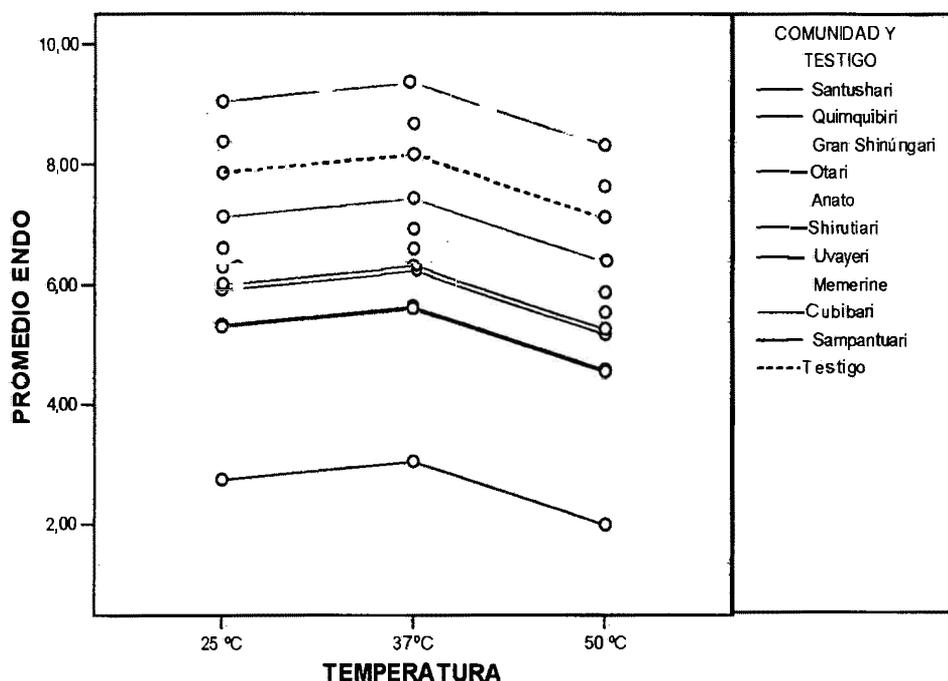
**Cuadro N° 03:** Análisis de varianza para determinar el efecto de la temperatura en la actividad endoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: endo

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	287.320 <sup>a</sup>	12	23.943	12.084	.000
Intercept	3905.030	1	3905.030	1970.798	.000
temperat	19.302	2	9.651	4.871	.010
comunidad	268.017	10	26.802	13.526	.000
Error	170.404	86	1.981		
Total	4362.754	99			
Corrected Total	457.724	98			

a. R Squared = .628 (Adjusted R Squared = .576)



**Gráfico N° 14.-** Representación del análisis de varianza para determinar el efecto de la temperatura en la actividad endoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## ANEXO N° 15

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

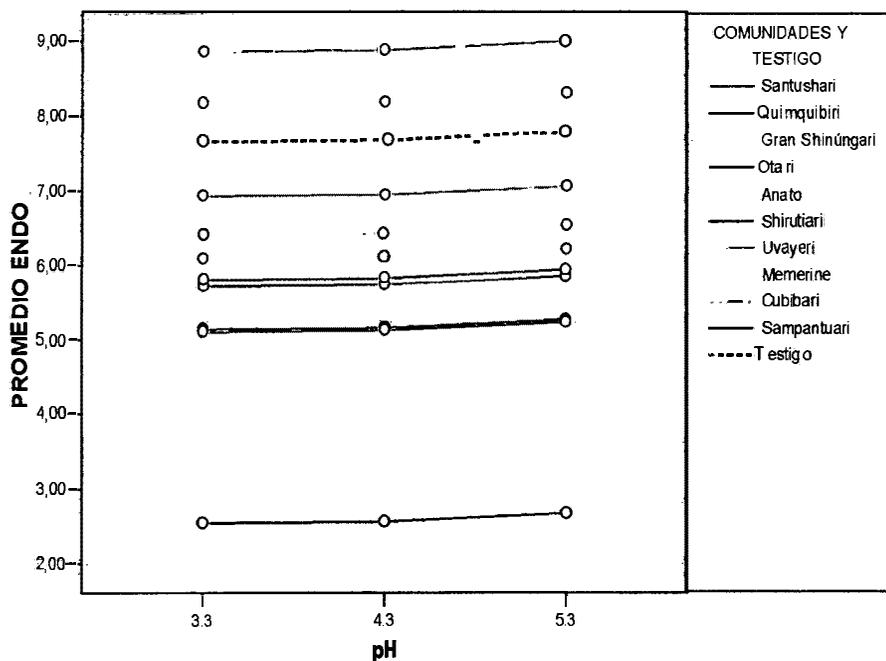
**Cuadro N° 04:** Análisis de varianza para determinar el efecto del pH en la actividad endoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: endo

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	268.362 <sup>a</sup>	12	22.363	10.156	.000
Intercept	3905.030	1	3905.030	1773.492	.000
comunidad	268.017	10	26.802	12.172	.000
pH	.344	2	.172	.078	.925
Error	189.362	86	2.202		
Total	4362.754	99			
Corrected Total	457.724	98			

a. R Squared = .586 (Adjusted R Squared = .529)



**Gráfico N° 15.-** Representación del análisis de varianza para determinar el efecto del pH en la actividad endoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## ANEXO N<sup>o</sup> 16

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

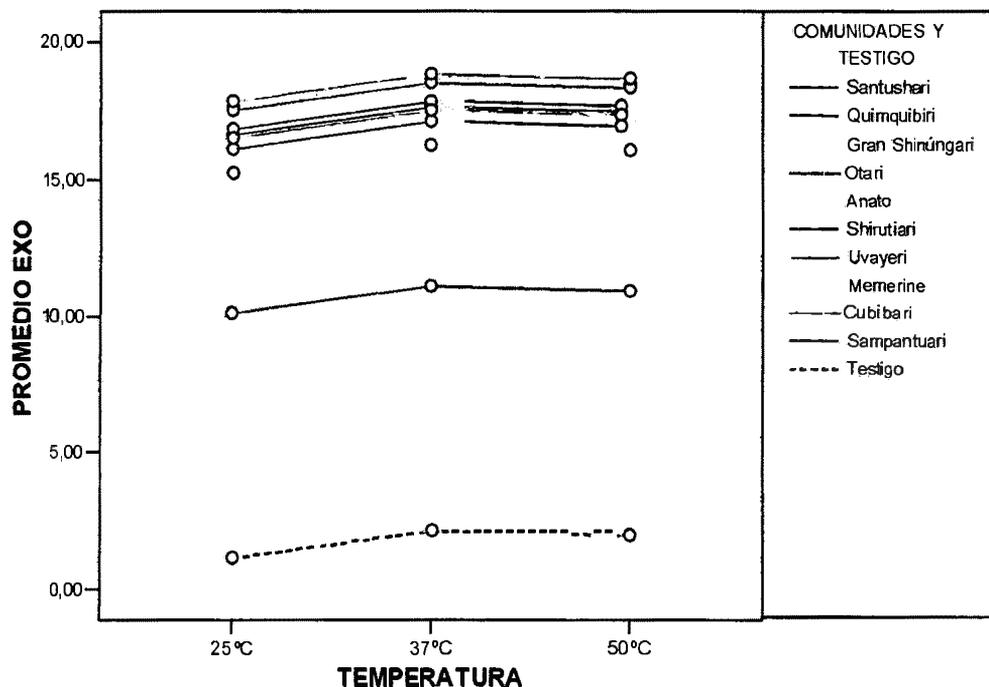
**Cuadro N<sup>o</sup> 05:** Análisis de varianza para determinar el efecto de la temperatura en la actividad exoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: exo

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2298.576 <sup>a</sup>	12	191.548	27.928	.000
Intercept	23627.531	1	23627.531	3444.933	.000
comunidad	2279.632	10	227.963	33.237	.000
temperat	18.944	2	9.472	1.381	.257
Error	589.842	86	6.859		
Total	26515.949	99			
Corrected Total	2888.418	98			

a. R Squared = .796 (Adjusted R Squared = .767)



**Gráfico N<sup>o</sup> 16.-** Representación del análisis de varianza para determinar el efecto de la temperatura en la actividad exoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## ANEXO N° 17

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

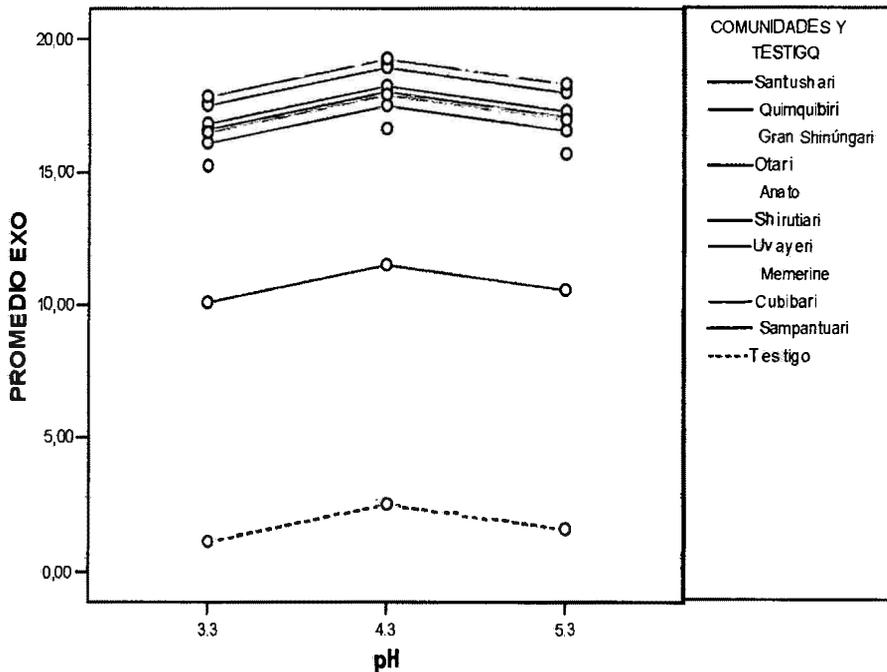
**Cuadro N° 06:** Análisis de varianza para determinar el efecto del pH en la actividad exoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho–2004.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: exo

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2313.120 <sup>a</sup>	12	192.760	28.815	.000
Intercept	23627.531	1	23627.531	3532.025	.000
comunidad	2279.632	10	227.963	34.078	.000
pH	33.488	2	16.744	2.503	.088
Error	575.298	86	6.690		
Total	26515.949	99			
Corrected Total	2888.418	98			

a. R Squared = .801 (Adjusted R Squared = .773)



**Gráfico N° 17.-** Representación del análisis de varianza para determinar el efecto del pH en la actividad exoglucanasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## ANEXO N° 18

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

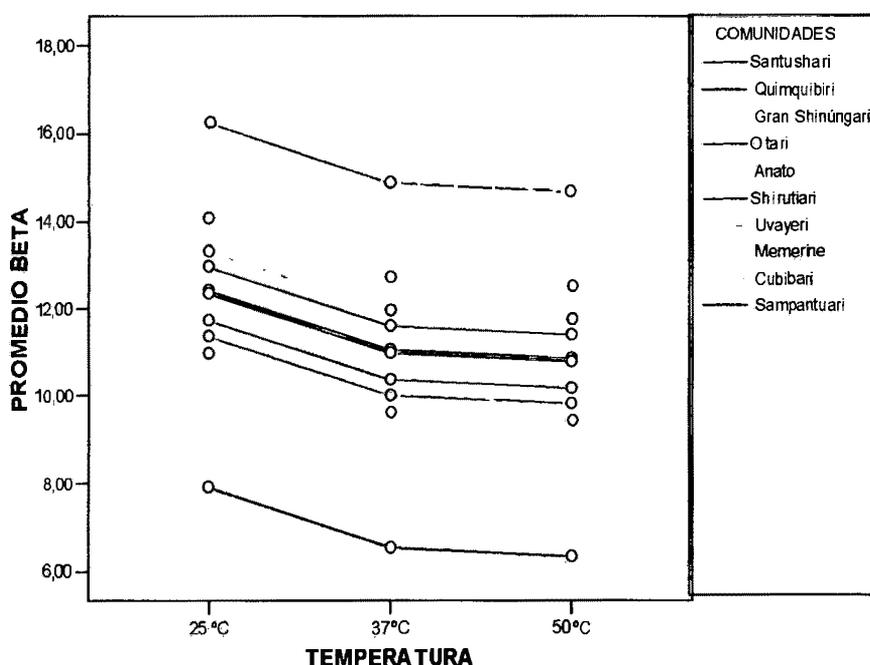
**Cuadro N° 07:** Análisis de varianza para determinar el efecto de la temperatura en la actividad  $\beta$ -glucosidasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: beta

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	426.485 <sup>a</sup>	11	38.771	5.221	.000
Intercept	11632.192	1	11632.192	1566.413	.000
comunidad	383.022	9	42.558	5.731	.000
temperat	43.463	2	21.731	2.926	.059
Error	579.228	78	7.426		
Total	12637.906	90			
Corrected Total	1005.714	89			

a. R Squared = .424 (Adjusted R Squared = .343)



**Gráfico N° 18.-** Representación del análisis de varianza para determinar el efecto de la temperatura en la actividad  $\beta$ -glucosidasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## ANEXO N° 19

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

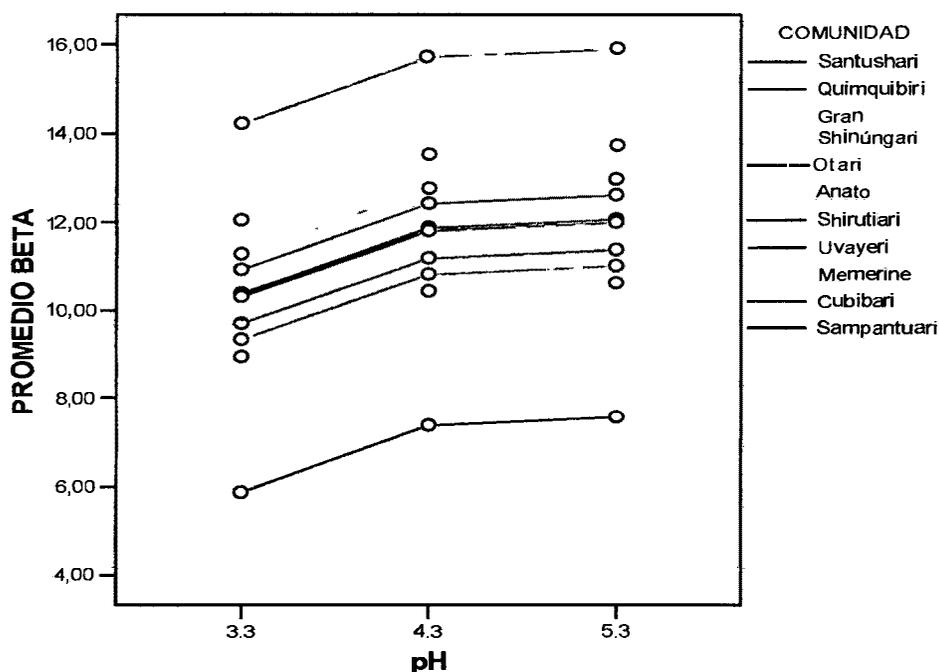
**Cuadro N° 08:** Análisis de varianza para determinar el efecto del pH en la actividad  $\beta$ -glucosidasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho–2004.

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: beta

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	434,145(a)	11	39,468	5,386	,000
Intercept	11632,192	1	11632,192	1587,405	,000
Comunidad	383,022	9	42,558	5,808	,000
pH	51,123	2	25,561	3,488	,035
Error	571,569	78	7,328		
Total	12637,906	90			
Corrected Total	1005,714	89			

a R Squared = ,432 (Adjusted R Squared = ,352)



**Gráfico N° 19.-** Representación del análisis de varianza para determinar el efecto del pH en la actividad  $\beta$ -glucosidasa presente en el extracto enzimático crudo de masato. Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

## MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>Estudio etnofarmacológico y caracterización de la actividad celololífica en masato procedente del Valle del Río Apurímac y Ene-2004</p>	<p>¿Cuáles serán las formas de elaboración del Masato en el VRAE y cuál será la naturaleza de la actividad celololífica en esta bebida fermentada?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Describir y caracterizar las variedades de masato que se elabora en el Valle del Río Apurímac y Ene, así como su consumo.</li> <li>• Evaluar la actividad celololífica en muestras de masato que se elabora en el Valle del Río Apurímac y Ene.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Comunidades nativas de la amazonia peruana y del VRAE</li> <li>-Diversidad de sistema alimentación</li> <li>-Forma de vida</li> <li>-Salud y educación</li> <li>♦ Bebidas fermentadas tradicionales</li> <li>-Diversidad</li> <li>-El masato</li> <li>♦ Celulosa</li> <li>-Características e importancia</li> <li>-Degradación biológica de la celulosa</li> <li>♦ Organismos celololíficos</li> <li>-Bacterias</li> <li>-Hongos</li> <li>-Insectos</li> <li>-Mamíferos</li> </ul>	<p>Existe actividad celololífica en masato, y ésta es variable dependiendo del origen de la muestra.</p>	<p>INDEPENDIENTES : Tipo de tecnología tradicional de elaboración del Masato; sexo, edad, y condición del grupo de masticadores; tiempo de fermentación, tipo de recipientes.</p> <p>DEPENDIENTES: Masato, Actividad celololífica.</p>	<p>POBLACIÓN: Comunidades Nativas del Valle del Río Apurímac y Ene.</p> <p>MUESTRA: Masato de 10 Comunidades Nativas del VRAE por duplicado.</p> <p>DESCRIPCIÓN DE LA TECNOLOGÍA TRADICIONAL DE ELABORACIÓN DEL MASATO Se realizarán visitas a las comunidades nativas del VRAE y se aplicará una encuesta a fin de recabar la mayor y mejor información posible, la misma que será organizada y sistematizada.</p> <p>EXTRACTO ENZIMÁTICO CRUDO Cada una de las muestras obtenidas serán centrifugadas a 3 500 rpm por 5 minutos</p> <p>CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN MASATO El extracto enzimático crudo será sometido a diferentes condiciones de pH y temperatura, para determinar la presencia de endoglucanasas, <math>\beta</math>-glucosidasas</p>

Estudio etnofermentológico y caracterización de la actividad celolítica en masato procedente del Valle del Río Apurímac y Ene – 2004.

KusiYaranga<sup>1</sup>, Fidel Mujica<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Escuela de Formación Profesional de Biología - Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho - Perú

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Microbiana - Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho - Perú

#### RESUMEN

Los objetivos fueron evaluar la actividad celolítica y describir las variedades de "masato", bebida alcohólica de origen indígena.

Se realizaron visitas a comunidades nativas ubicadas a lo largo del Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE), y mediante observación directa se aplicaron encuestas para recabar información acerca de la elaboración y consumo del "masato".

Diez muestras de "masato" fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, de ellas se obtuvo el extracto enzimático crudo, con el cual se determinó la actividad enzimática a diferentes temperaturas (25, 37, 50 °C) y pH (3.3, 4.3, 5.3). Como resultado se obtuvo que existía actividad de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en el extracto enzimático crudo de las diez muestras de "masato"; sin embargo se observó que la actividad de  $\beta$ -glucosidasas fue marcadamente mayor seguida por la actividad de exoglucanasas y por último de endoglucanasas, al comparar este perfil con el testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*) se pudo evidenciar que los valores de endoglucanasas y exoglucanasas fueron inferiores con respecto a la muestra problema, siendo la actividad de endoglucanasas más alta que la actividad de exoglucanasas. Asimismo por las características propias de la fermentación del "masato" se pudo determinar que éstas son enzimas que actúan bajo condiciones ácidas.

También se realizó la caracterización bioquímica del "masato" obteniéndose valores de pH entre 4.1 y 4.6; la acidez total se encuentra en un rango de 0.078 a 0.142%; los azúcares reductores, entre 1.71 y 2.68 mg/ml; azúcares totales, entre 2.10 y 4.10 mg/ml; y, sólidos totales, entre 4.5 y 8.3%.

Palabras clave: "masato", actividad celolítica, endoglucanasas, exoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas.

#### ABSTRACT

The aim of this study was to test cellulolytic activity of crude enzymatic extract from "masato", an alcoholic beverage of indian origin, which was obtained from *Manihot sculenta*; also to describe varieties of this drink.

We went to visit to native communities located alongside valleys "Río Apurímac" and "Ene", there through direct observation, was applied surveys in order to pick up information on elaboration and consumption of "masato". Later, ten samples were carried to Microbian Biotechnology Laboratory, wherein crude enzymatic extract was obtained by centrifugation, further, on the extract was determined the enzymatic activity, at varying temperatures (25, 37, 50 °C) and varying pH too (3.3, 4.3, 5.3). Once finished the assays, it was found that there were three cellulolytic enzymes involved into extract to conversion cellulose into glucose, they were: endoglucanases, exoglucanases, and  $\beta$ -glucosidases; however, it could observe that activity of  $\beta$ -glucosidases was markedly higher, followed by exoglucanases, and endoglucanases activity; when was compared this profile with witness (the cellulase complex of *Trichoderma reesei*) it could demonstrate that the values both endoglucanases and exoglucanases were less respect for problem sample, being the activity of first named enzymes highest than second ones. As well as by own features of "masato" fermentation it was possible to determine that these enzymes worked under acid conditions.

On the other hand, it was made the biochemical characterization of "masato" where got following values: pH ranged 4.1 to 4.6; total acidity, 0.078 to 0.142%; reducing-sugars, 1.71 to 2.68 mg/ml; total sugars; 2.10 to 4.10 mg/ml; and total solids, 4.5 to 8.3%.

Key words: "masato", cellulolytic activity, endoglucanases, cellobiohydrolases,  $\beta$ -glucosidases.

#### INTRODUCCIÓN

La elaboración de bebidas fermentadas ha sido una práctica común desde las culturas más antiguas. Una de las bebidas fermentadas tradicionales de gran importancia en las comunidades nativas de la amazonía, es el

masato, llamado también *cauim*, que se obtiene por fermentación espontánea utilizando como sustrato yuca y camote, esta bebida ensalivada cumple con diferentes funciones en estas comunidades, toda vez que es utilizada no solamente como bebida sino también como alimento. Actualmente

#### Correspondencia:

Kusi YARANGA P (kusiyp18@hotmail.com)  
Fac. Cs. Biológicas. UNSCH. Ciudad Universitaria. Av. Independencia s/n  
Telf. (066) 31-2510 Anexo 145  
biounsch\_decano@latinmail.com

la información con que se cuenta acerca de los aspectos etnofermentológicos, bioquímicos y microbiológicos es muy escasa, motivo por el cual se justifica la necesidad de realizar diferentes estudios a fin de generar conocimiento científico sobre este producto fermentado, prestando especial interés en la actividad celulolítica.

Dicha actividad es realizada por las celulasas, éstas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en la celulosa, que representa uno de los materiales más utilizados por el hombre, se encuentra comercialmente disponible en una gran variedad de presentaciones, siendo el papel una de las más conocidas.

Los complejos multienzimáticos producidos por microorganismos celulolíticos son de gran importancia y presentan un alto potencial biotecnológico en diferentes industrias: pulpa y papel, vitivinícola, cervecera, jugos, panadería, detergentes, textil, entre otras (3).

La presente investigación se centra en el estudio de aspectos básicos referidos a la elaboración y consumo del masato, así como la actividad celulolítica a diferentes condiciones de pH y temperatura a las cuales alcanza la máxima actividad y estabilidad. Los objetivos que se plantearon son:

- Describir y caracterizar las variedades de masato.
- Evaluar la actividad celulolítica en muestras de masato.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Recolección de la Muestra

Se realizó en 10 Comunidades Nativas del VRAE, en función de su mayor accesibilidad y del apoyo brindado por las municipalidades respectivas. Para el transporte de las muestras se hizo uso de frascos de vidrio debidamente preparados y etiquetados, habiéndose realizado un total de tres expediciones al VRAE.

### Descripción de la Tecnología Tradicional de Elaboración del Masato

Con la finalidad de conocer *in situ* cada una de las etapas indicadas en la elaboración tradicional del Masato, así como los detalles y características de las diferentes formas de acabado y hábitos de consumo, se realizaron visitas a las comunidades mencionadas y se aplicó una encuesta a fin de recabar la mayor y mejor información posible, la misma que fue organizada y sistematizada.

### Obtención del Extracto Enzimático Crudo

Cada una de las muestras obtenidas fueron transportadas en el menor tiempo posible y en condiciones adecuadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana donde inicialmente se conservaron en refrigeración. A partir de ellas se obtuvo el extracto enzimático crudo, por centrifugación a 3 500 rpm por 5 minutos, para la determinación de la actividad celulolítica se utilizó sólo el sobrenadante.

## Caracterización de la Actividad Celulolítica en Masato

### Actividad de Endoglucanasas

1. En un set de tubos de ensayo previamente rotulados con los códigos correspondientes, se procedió como sigue:

Código	Buffer 1M (ml)	Sustrato (ml de CMC)	Muestra (ml)	Volumen Final(ml)
T	0.1	3.5	0.4	4.0
M1	0.1	3.5	0.4	4.0
M2	0.1	3.5	0.4	4.0
M3	0.1	3.5	0.4	4.0
BR	4.0	-	-	4.0
BS	2.0	2.0	-	4.0
BE	3.6	-	0.4	4.0

Donde:

- T : Testigo (celulosa de *Trichoderma reesei*).  
 M1,M2,M3 : Muestra problema (por triplicado).  
 BR : Blanco de reactivo.  
 BS : Blanco de sustrato.  
 BE : Blanco de enzima.  
 Buffer 1M : Buffer Acetato de Sodio 1M, a pH 3.3, 4.3 y 5.3

Sustrato CMC: Carboximetilcelulosa al 1%.

Muestra : Extracto enzimático crudo.

2. Luego los tubos en mención fueron incubados en baño María a diferentes temperaturas (25°, 37° y 50°C) y pH (3.3, 4.3 y 5.3) durante 30 minutos (5).

3. Finalmente se realizó la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (1).

### Actividad de Exoglucanasas

1. En un set de tubos de ensayo rotulados con los códigos correspondientes, se procedió como sigue:

Código	Buffer 0.6M (ml)	Sustrato (g de papel filtro)	Muestra (ml)	Volumen Final(ml)
T	0.8	0.05	3.2	4.0
M1	0.8	0.05	3.2	4.0
M2	0.8	0.05	3.2	4.0
M3	0.8	0.05	0.4	4.0
BR	4.0	-	-	4.0
BS	2.0	0.05	-	4.0
BE	0.8	-	3.2	4.0

Donde:

- T : Testigo (celulosa de *Trichoderma reesei*).  
 M1,M2,M3 : Muestra problema (por triplicado).  
 BR : Blanco de reactivo.  
 BS : Blanco de sustrato.  
 BE : Blanco de enzima.  
 Buffer 1M : Buffer Acetato de Sodio 0.6M, a pH 3.3, 4.3 y 5.3  
 Sustrato : Papel filtro Whatman Nº 1  
 Muestra : Extracto enzimático crudo.

- Los tubos fueron incubados en baño María a diferentes temperaturas (25, 37 y 50 °C) y diferentes pH (3.3, 4.3 y 5.3) durante 30 minutos (5).
- Igualmente se realizó la determinación de azúcares reductores (1).

**Actividad de β-Glucosidasas**

- Como en los casos anteriores, en un set de tubos rotulados se procedió como sigue:

Código	Buffer 1M (ml)	Sustrato (salicina)	Muestra (ml)	Volumen Final(ml)
M1	1.0	-	1.0	2.0
M2	1.0	-	1.0	2.0
M3	1.0	-	1.0	2.0
BR	-	2.0	-	2.0
BS	2.0	-	-	2.0
BE	-	1.0	1.0	2.0

Donde:

- M1,M2,M3 : Muestra problema (por triplicado).
- BR : Blanco de reactivo.
- BS : Blanco de sustrato.
- BE : Blanco de enzima.
- Buffer 1M : Buffer Acetato de Sodio 1M, a pH 3.3, 4.3 y 5.3
- Sustrato : Salicina.
- Muestra : Extracto enzimático crudo.

- Luego los tubos en mención fueron incubados en baño María a diferentes temperaturas (25°, 37° y 50°C) y pH (3.3, 4.3 y 5.3) durante 30 minutos (5).
- Luego se realizó la determinación de azúcares reductores(1).

**Determinación de azúcares reductores (Método del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico)**

- Se elaboró una curva estándar con glucosa a valores de 2 y 20 mM.
- Para dar inicio a la técnica se tomó 0.5 ml. del producto de la incubación, que para éste caso es la muestra.
- Seguidamente se añadió 3 ml. de la solución de DNS, se calentó en baño maria hirviendo durante 5 minutos.
- Inmediatamente se adicionó 1 ml. de Sal de Rochelle, seguido de 15 ml. de agua destilada.
- Las lecturas de absorvancia se realizaron a 550 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D, Milton Roy.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza empleando la prueba estadística de Tukey, para determinar el grado de significancia existente entre los diferentes tratamientos, con un nivel de significancia de 0.05.

**RESULTADOS**

**Descripción del Proceso Tradicional de Elaboración del Masato**

Las variedades de yuca empleadas para la elaboración del masato son la blanca o amarilla. La yuca cosechada en el campo, es llevada a la

aldea utilizando una canasta especial denominada *shimiantí*. Esta yuca se cocina a leña en una olla de barro o metal, a continuación se deja enfriar, luego con ayuda de la *pata* se amasa hasta obtener una pasta homogénea. Paralelamente, una o más mujeres comienzan a masticar cierta cantidad de camote morado crudo, previo ligero raspado de la cubierta mas externa con la ayuda de un cuchillo, evitando quitar la parte morada, que es necesaria para el color característico del producto final. El camote es masticado en un acto casi ceremonial por la mujer o mujeres encargadas, quienes van depositando poco a poco el bolo alimenticio formado, de color morado, en un envase. Aproximadamente medio kilo de camote es suficiente para una olla con capacidad de 10 a 12 litros.

Seguidamente, la yuca amasada se mezcla con el camote masticado, en una proporción aproximada de 20:1 (yuca: camote). Inmediatamente después, se agrega un poco de agua fría para hacer que la masa tenga cierta fluidez y a continuación se añade el *aboroqe*, en una proporción aproximada de 5-10% respecto al volumen total de la masa (comúnmente una tasa para una olla del volumen ya indicado). El masato fermenta normalmente de un día para otro. Para servirse, se pasa por un colador especial llamado *shikame*. El masato se sirve en un recipiente característico denominado *suta*.

El masato es el alimento y bebida fundamental de los Asháninkas, lo consumen varones y mujeres, los varones lo ingieren como desayuno previo calentamiento hasta ebullición antes de partir a las actividades agrícolas o de caza; luego al medio día en el campo lo ingieren frío, y finalmente por la tarde al regresar a la aldea, a manera de cena, también frío. Cuando desean utilizarlo para embriagar, lo dejan fermentar por dos o tres días.

Tabla Nº 01.- Comunidades nativas del Valle del Río Apurímac y Ene (VRAE) consideradas para la recolección de las muestras de masato - 2004.

Dept0/Prov.	Distrito	CC.NN.
CUZCO (Concepción)	PICHARI	Santushari(01)
		Quimquibiri(02)
		Gran Shinúngari(03)
		Otari(04)
		Shirutari(05)
		Uvayeri(06)
		Memerine(07)
		Cubibari(08)
	KIMBIRI	Sampantuari(09)
AYACUCHO (Huanta)	SIVIA	Anato(10)

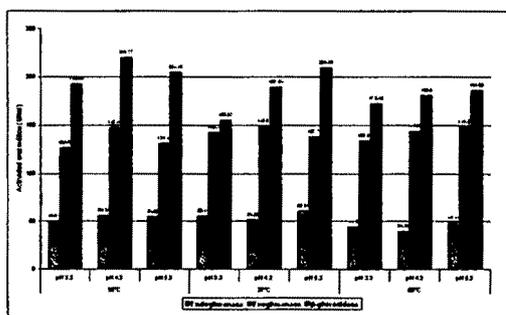
**Tabla Nº 02.-** Características bioquímicas del masato procedente de las comunidades nativas del VRAE – 2004.

CC.NN &	pH	Acid. total (%)	Azúc. Reduct (mg/ml)	Azúc. totales (mg/ml)	Sólid. Totales (%)
01	4.2	0.10	2.68	3.10	5.2
02	4.3	0.10	2.02	2.70	7.8
03	4.3	0.12	2.31	3.90	8.2
04	4.1	0.12	1.71	2.40	4.5
05	4.4	0.11	2.31	2.80	5.8
06	4.5	0.12	2.53	3.70	7.2
07	4.4	0.11	2.22	4.10	5.2
08	4.2	0.13	2.65	2.90	5.6
09	4.4	0.14	2.59	2.80	8.3
10	4.6	0.08	1.80	2.10	6.3

&.Ver tabla 1

**Tabla Nº 03.-** Actividad celolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de comunidades nativas del VRAE – 2004.

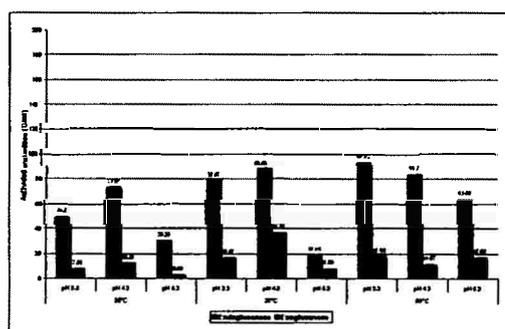
Tº	Enzima	Actividad enzimática(U/ml)		
		pH 3.3	pH 4.3	pH 5.3
25°C	Endoglucanasa	49.91	56.24	54.92
	Exoglucanasa	126.86	147.46	131.46
	β-Glucosidasa	192.96	219.77	204.48
37°C	Endoglucanasa	55.11	51.59	60.38
	Exoglucanasa	142.77	148.91	137.78
	β-Glucosidasa	155.37	189.54	209.33
50°C	Endoglucanasa	44.20	39.58	48.41
	Exoglucanasa	133.94	143.72	148.52
	β-Glucosidasa	172.12	180.8	186.03



**Gráfico Nº 01.-** Actividad celolítica en extracto enzimático crudo de masato procedente de las Comunidades Nativas del VRAE – 2004.

**Tabla Nº 04.-** Actividad celolítica del testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*). Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

Tº C	pH	Actividad enzimática(U/ml)	
		Endoglucanasa	Exoglucanasa
25°C	pH 3.3	49.50	7.58
	pH 4.3	73.08	12.33
	pH 5.3	30.33	3.00
37°C	pH 3.3	78.67	16.67
	pH 4.3	88.00	36.75
	pH 5.3	18.92	8.00
50°C	pH 3.3	93.42	18.00
	pH 4.3	83.50	11.67
	pH 5.3	63.58	17.08



**Gráfico Nº 02.-** Actividad endoglucanasa y exoglucanasa del testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*). Laboratorio de Biotecnología microbiana – UNSCH. Ayacucho – 2004.

**DISCUSIÓN**

En la Tabla Nº 01, se muestran los nombres de las 10 comunidades nativas a las cuales se tuvo acceso, éstas se encuentran ubicadas en los distritos de Pichari y Kimbiri pertenecientes a la Provincia de la Convención, Departamento de Cuzco; y al Distrito de Sivia, perteneciente a la Provincia de Huanta del Departamento de Ayacucho.

En la Tabla Nº 02, se observan las características bioquímicas del masato, respecto al pH, la muestra presenta un pH ácido en un rango de 4.1 a 4.6; estos valores se encuentran dentro del rango óptimo para las levaduras de la fermentación alcohólica y bacterias de la fermentación láctica que son los principales grupos de microorganismos responsables de la formación de etanol y ácido láctico que predominan en el masato. Al respecto, en las evaluaciones físico-químicas realizadas en bebidas fermentadas tradicionales como la chicha de jora, se han reportado valores de pH de 3.45 (4), para la chicha de molle un pH de 3.9, chicha de siete semillas un pH de 3.9 y chicha de jora un pH de 3.6 (2).

De otro lado, con relación a la acidéz total, expresada en porcentaje de ácido láctico, ésta se encuentra en un rango de 0.078% hasta un valor de 0.142. Estos valores resultan inferiores en comparación a los reportados para la chicha de jora (1.08%), chicha de siete semillas (0.50%) y chicha de molle (0.55%) (2).

Respecto al contenido de azúcares totales, este parámetro se encuentra comprendido entre 2.10 y 4.10 mg/ml; y en cuanto a azúcares reductores los valores varían entre 1.71 y 2.68 mg/ml. Estos resultados son bastante similares a los encontrados para el caso de chicha de jora y chicha de siete semillas (2).

Finalmente, respecto a los sólidos totales, las diferentes muestras de masato presentan valores que oscilan entre 5.2 y 8.3%; porcentajes que resultan ser bastante similares al caso de la chicha de jora (6.71%) pero inferiores a los reportados para la chicha de siete semillas (12.4%), en cambio son valores que resultan superiores al caso de la chicha de molle (4.45%) (2).

Definitivamente, estas características bioquímicas no siempre son homogéneas, por cuanto muchas veces depende de las condiciones en las que se prepara el masato, tales como la proporción de la materia prima, tipo de colador, cantidad de agua, tiempo de fermentación, etc.

En la Tabla N° 03, se observan los valores promedio de las actividades de las endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en las diez muestras de masato, la actividad de las  $\beta$ -glucosidasas, es mucho más alta, seguida de la actividad de exoglucanasas y por último de endoglucanasas. Al comparar este perfil con el testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*) se observa que en los ensayos tanto de actividad de las endoglucanasas como de las exoglucanasas, los valores son inferiores siendo la actividad de las endoglucanasas mucho más alta que de las exoglucanasas (Tabla N° 04). Adicionalmente cabe comentar que si bien de acuerdo a las especificaciones del fabricante (FLUKA), la actividad de la celulasa de *Trichoderma reesei*, utilizada como testigo, viene especificada a pH 5.0 y 37°C; bajo las condiciones de los ensayos realizados en el presente trabajo, esta enzima demostró tener comportamiento tipo endoglucanasa, teniendo como pH óptimo de 3.3 a 4.3 y temperatura óptima en el rango de 37 a 50 °C.

El análisis de varianza señala que la diferencia respecto a la actividad de endoglucanasas es significativa entre las tres temperaturas ensayadas: 25, 37 y 50 °C, se puede deducir que la temperatura óptima es de 37° C no pudiendo afirmarse lo mismo para el pH, pues no hay diferencia significativa entre los valores ensayados de 3.3, 4.3 y 5.3 lo que se puede afirmar, que por las características propias de la fermentación del masato las endoglucanasas presentes actúan bajo condiciones ácidas.

Los resultados, respecto a la actividad de las exoglucanasas, muestran que, existe diferencia significativa entre las temperaturas a las que fueron sometidos los tratamientos (25, 37 y 50 °C) considerándose como temperatura óptima a 37 °C, sin embargo no se puede afirmar lo mismo para el caso del pH (3.3, 4.3 y 5.3) pues no existe significancia entre los valores de pH tratados, debido a ello es posible aseverar que se trata de Exoglucanasas con actividad bajo condiciones ácidas.

Con referencia a las  $\beta$ -glucosidasas, el análisis de varianza indica que su actividad no muestra

diferencia significativa en cuanto a temperatura se refiere, respecto al pH existe diferencia significativa considerándose entonces como pH óptimo a 5.3 para la actividad de esta enzima.

Los resultados obtenidos, tanto de actividad de endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en el masato de las diez comunidades nativas nos revelan que, si bien el masato del VRAE tiene un patrón común de elaboración, en cada comunidad nativa existen particularidades y detalles que tienen que ver con el tipo de materia prima utilizada, el punto óptimo de cocción, proporción de yuca:camote, tiempo de fermentación, proporción de agua, tipo de inóculo, etc.

Aunque no se conoce qué especies o géneros de microorganismos celulolíticos, están presentes en el masato, existe información relacionada con la caracterización de celulasas de origen microbiano. Levin y Forchiassin (1997) caracterizaron los efectos que tienen las condiciones de cultivo sobre la producción de las enzimas del complejo celulasa en *Trametes trogii* encontrando que la temperatura óptima para la actividad de las endoglucanasas, exoglucanasas, y  $\beta$ -glucosidasas fue de 45, 50 y 60 °C respectivamente; mientras que el pH óptimo fue de 3.1, 4.1 y 5.3, respectivamente. Wei et al (1992) determinaron la actividad celulolítica de 12 especies de *Xylaria* y cinco especies de *Hypoxylon*, además de *Trichoderma reesei* encontrando que el rango de temperatura óptima fue de 37 a 50 °C y el pH óptimo de 5.0. Pardo y Forchiassin (1999) examinaron el efecto de diferentes fuentes de Nitrógeno, temperatura y pH en la producción de celulasas por *Nectria catalinensis* empleando como fuente de Carbono celulosa microcristalina; encontraron como temperatura óptima 23 °C, un óptimo para la estabilidad entre 23 y 37 °C y un pH óptimo entre 4.8 y 5.8 (6). Estos resultados son comparables con los obtenidos en el presente estudio.

## REFERENCIAS

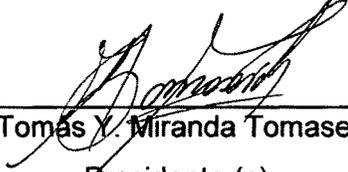
1. Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. Vol: 31. Pag. 426-428.
2. Mujica, F. (2003). Caracterización Bioquímica y Tecnológica de Bebidas Fermentadas Tradicionales. UNSCH. Ayacucho-Perú.
3. Mujica, F. (2001). Clonación y Expresión de un Dominio de Unión de Celulosa (CBD) de *Cellulomonas flavigena*. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias, Especialidad de Biotecnología. CINVESTAV-IPN. México.
4. Quillama, Elena. (1999). Estudio de la Microflora de la Chicha de Jora y su implicancia en la alimentación humana. En: Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, Oaxaca-México.
5. Ramírez, P. (1993). Degradación Enzimática de Celulosa por Actinomicetos Termófilos: Aislamiento, Caracterización y Determinación de la Actividad Celulolítica. Tesis-UNMSM. Fac. Cs. Bs. Lima.
6. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. En [URL:http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Basic.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/Tesis/Basic.htm).

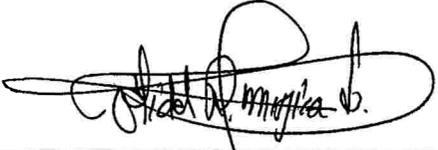
**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**  
**R.D.N.-029-06-FCB – D**  
**Bachiller: KUSI YARANGA PALOMINO**

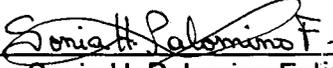
En la ciudad de Ayacucho a los diecisiete días del mes de febrero del año dos mil seis, siendo las tres y treinta de la tarde se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas presididos por el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich en mérito al memorando N.-070-06-UNSCH-FCB de fecha seis de febrero del dos mil seis, mediante el cual se le encarga la Presidencia del Acto de Sustentación de Tesis y actuando como Secretario Docente el Bigo. Victor Luis Cárdenas López y como Miembros del Jurado Calificador el Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, Biga. Sonia Haydeé Palomino Felices y la Mg. Paula García Godos Alcázar quienes recepcionaron en Acto Público la Sustentación de la Tesis Titulada: Estudio etnofermentológico y caracterización de la actividad celulolítica en masato procedente del Valle del Río Apurímac y Ene – 2004. presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas Kusi Yaranga Palomino quien pretende optar el Título Profesional de Bióloga con mención en la especialidad de Microbiología. Acto seguido el Presidente pidió al Secretario Docente dar lectura a la documentación correspondiente que obra en secretaría. Luego el Presidente invitó a la sustentante a exponer el trabajo de investigación en el tiempo de 45 minutos como máximo tal como lo estipula el Reglamento General de la Universidad. Concluida la sustentación el Presidente invitó a los Miembros del Jurado Calificador a realizar las preguntas y aclaraciones pertinentes. Finalizado el Acto de Sustentación el Presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar el auditorio por algunos minutos con la finalidad de que los Miembros del Jurado Calificador realicen las deliberaciones y calificaciones en privado y cuyos resultados son los siguientes:

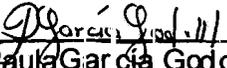
MIEMBRO JURADO	EXPOSICIÓN	RPTA. A PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua	16	16	16
Blga. Sonia Haydeé Palomino Felices	18	15	17
Mg. Paula García Godos Alcázar	16	13	15
		PROMEDIO	16

Como resultado la sustentante ha obtenido la nota promedio de dieciséis (16), de la cual dan fe los Miembros del Jurado Calificador, estampando sus firmas al pie del presente acta, finalizando el acto de sustentación a las cinco de la tarde.

  
Blgo. Tomás Y. Miranda Tomasevich  
Presidente (e)

  
Mg. Fidel R. Mujica Lengua  
Miembro (Asesor)

  
Blga. Sonia H. Palomino Felices  
Miembro

  
Mg. Paula García Godos Alcázar  
Miembro

  
Blgo. Víctor Luis Cárdenas López  
Secretario Docente