



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

103

Aprovechamiento de Nejayote de Nixtamal por Métodos Microbiológicos

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

PATRICIA DURAN ARENAS



**DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Prof. Rosa María Ramírez Gama
VOCAL: Prof. Eduardo Bárzana García
SECRETARIO: Prof. Agustín López Munguía Canales
1er. SUPLENTE: Prof. Francisca Aida Iturbe Chiñas
2do. SUPLENTE: Prof. Juan Saldaña Diosdado

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS.

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE QUIMICA

U.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante:

PATRICIA DURAN ARENAS.

Patricia Duran A.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

M. en C. EDUARDO BARZANA GARCIA.

Eduardo Bárzana

A MIS PADRES
con amor y
agradecimiento

A MIS HERMANOS
con cariño

A MIS ABUELOS

Sr. Luis Arenas de la Rosa
Sra. Guadalupe R. de Arenas
con cariño, por su gran
ejemplo de trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a:

M. en C. Eduardo Bárzana García.

M. en C. Rosa María Ramírez Gama.

Dr. Miguel Ulloa.

Por su apoyo y orientación.

INDICE

I	INTRODUCCION	1
II	GENERALIDADES	
2.1	Proceso de Nixtamalización	4
2.2	Producción de Tortillas	7
2.3	Producción de Proteína Unicelular	9
2.4	Efecto de efluentes contaminantes	13
2.5	Antecedentes del Tema	16
III	MATERIALES Y METODOS	
3.0	Presentación	22
3.1	Estandarización del nejayote	22
3.2	Análisis Proximal de nejayote	23
3.3	Aislamiento de Microorganismos	24
3.4	Identificación de hongos miceliares aislados	25
3.5	Selección del microorganismos para efectuar la fermentación	28
3.6	Estudio de Variables Ambientales	
3.6.1	Temperatura	29
3.6.2	pH	30
3.6.3	Suplementación del medio	33
3.7	Estudio del tipo de inóculo	35
IV	RESULTADOS	37
V	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
VI	BIBLIOGRAFIA	58

INTRODUCCION

El maíz, consumido primordialmente en forma de tortillas, es la base principal de la alimentación en México y América Central. La preparación de la masa empleada en la elaboración de tortillas se lleva a cabo por medio de un proceso de cocimiento conocido como Nixtamalización, el cual involucra un tratamiento térmico-alkalino del maíz. Debido a dicho tratamiento, se desprenden sólidos solubles y cascarilla del grano que se solubilizan o quedan suspendidos en el agua empleada para el cocimiento constituyendo el líquido de desecho denominado Nejayote.

La palabra Nejayote, se origina de las siguientes raíces de la lengua Náhuatl:

- Nextle, cuyo significado es ceniza.
- Ayoh, que es una palabra masculina, que significa caldo o "cosa aguada".

De acuerdo al origen de la palabra, nejayote se define como agua con cal o ceniza en que está cocido el maíz empleado para la elaboración de la masa para hacer tortillas.

En términos nutricionales, los sólidos desprendidos del grano de maíz, hacen del nejayote un medio apropiado para el desarrollo de microorganismos. Hasta hoy, este líquido de cocimiento de maíz es únicamente considerado como agua de desperdicio durante el proceso de nixtamalización y por lo tanto es desechado, convirtiéndose en una fuente de contaminación.

En nuestro país se tiene una elevada producción tanto de masa de nixtamal como de harina nixtamalizada, por lo que el nejayote producido asciende a miles de millones de litros por año.

Buscando la forma de evitar el desperdicio de nejayote, lo que traería conjuntamente una disminución de la contaminación provocada por su eliminación como efluente, se pensó en aprovecharlo como medio nutriente para el desarrollo de microorganismos que presentaran una aplicación industrial. Este planteamiento constituye el objetivo del presente trabajo. De este modo los nutrientes presentes en el medio serían degradados biológicamente, lo que nos permitiría disminuir en forma considerable la cantidad de sólidos totales así como -- obtener biomasa microbiana, la cual, dependiendo de su composición y características toxicológicas, podría ser empleada como alimento para ganado.

Es de importancia mencionar que de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, este es el primer trabajo en el cual se trata de estudiar el aprovechamiento del nejayote. Asimismo, no se ha encontrado una explicación a la falta de preocupación para estudiar este efluente desperdiciado en tan altas proporciones.

GENERALIDADES

2.1. Proceso de Nixtamalización.

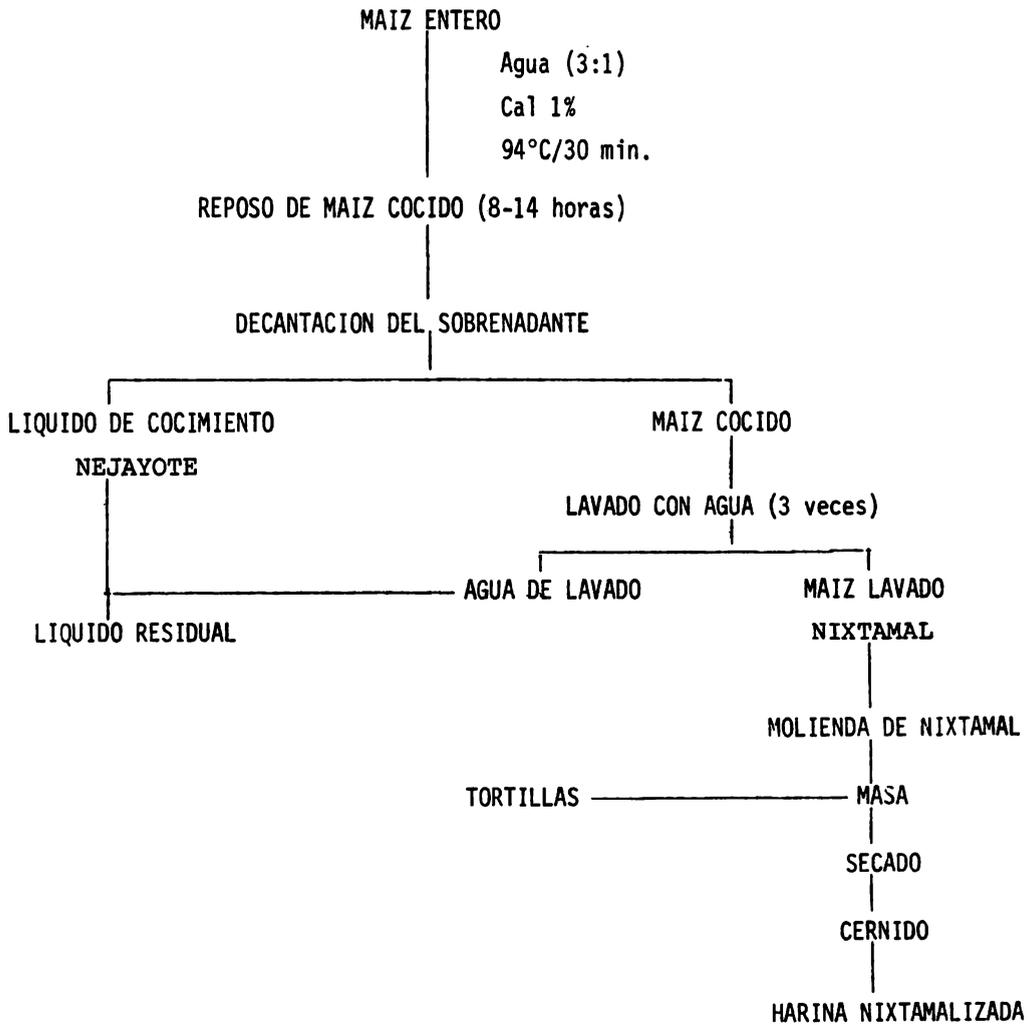
En el CUADRO I se presenta el proceso de nixtamalización empleado para la elaboración de masa de nixtamal o harina nixtamalizada para la elaboración de tortillas y muchos otros productos típicos en nuestro país.

Las variaciones en este proceso son regidas por factores geográficos y socioeconómicos. Por ejemplo, la variedad de maíz, la proporción de agua a maíz, la concentración de cal, el tiempo de cocimiento y la temperatura, son regidos de acuerdo a los hábitos familiares o especificaciones de proceso. La variedad del maíz usado está determinada por la localización geográfica, su precio y disponibilidad. El tiempo de cocimiento se encuentra reportado en un rango de 30 a 75 minutos y el contenido de calcio varía de 90 a 170 mg/100 g.- Se considera que un maíz con mayor humedad, dureza y densidad produce mejores tortillas (1).

El punto final de la operación de tratamiento de maíz con cal tiene un efecto crítico en la calidad de las tortillas y es determinado subjetivamente de acuerdo a los siguientes criterios:

CUADRO I

PROCESO DE NIXTAMALIZACION



- Desintegración de la cáscara o cubierta del grano.
- Suavidad del grano.
- Apariencia del endospermo.

En un estudio realizado por Bressani-Paz (2), se encuentra reportado que la pérdida total de nutrientes del grano, desechados en el nejayote durante el tratamiento térmico-alcalino, no dependen tanto del método de preparación del -- nixtamal sino más bien del tipo de maíz empleado, encontrándose una pérdida mayor en maíz blanco que en maíz amarillo.

La nixtamalización es un proceso que ha existido en México desde la época de las culturas prehispánicas, siendo el maíz nixtamalizado la base de su alimentación.

Se ha comprobado por medio de estudios biológicos -- realizados con ratas, que este tratamiento incrementa el valor nutricional efectivo del maíz (3).

El maíz en general, es deficiente en los aminoácidos esenciales: lisina y triptofano, presentando también una mala relación leucina-isoleucina, lo que afecta el paso de -- triptofano a niacina. Presenta también deficiencia en niacina, miembro del complejo de vitamina B, cuya carencia produce la enfermedad llamada pelagra.

Durante el proceso de nixtamalización, se mejora la calidad proteica del maíz, ya que aumenta la relación de lisina 2.8 veces más, otros aminoácidos esenciales como treonina, histidina y metionina son aumentados al doble en concentra---ción, el triptofano aumenta ligeramente y la relación leucina-isoleucina 1.8 veces. Así mismo, se lleva a cabo la libera--ción de niacina, la cual se encuentra de alguna forma acomplejada, lo que evita su disponibilidad en el grano de maíz. Este hecho justifica la ausencia de pelagra en nuestro país.

El cambio en la calidad proteica del maíz se debe a que el calcio interacciona con los enlaces disulfuro de la --fracción glutelina del grano, con lo que se abre la protefina y deja disponible la lisina; por otro lado, la fracción zefna (deficiente en lisina y triptofano) se hace menos digerible en tanto la glutelina aumenta su digestibilidad.

Se ha observado que la nixtamalización favorece la formación de un aminoácido básico y tóxico, denominado lisi-no - alañina. Sin embargo, su formación ocurre en proporciones muy pequeñas. Este aminoácido se forma a partir de ciertas protefinas al ser expuestas a un álcali, debido a que se lleva a cabo una reacción de beta-eliminación en residuos de cistina o del enlace glicosídico de la serina, dando como resultado la dehidroalanina, la que da lugar a la lisino - a~~l~~añina a través de una condensación con grupos libres epsilon-amino de la lisina (4).

2.2 Producción de Tortillas.

El maíz, es el principal cultivo nacional y representa el 52.7% de la producción agrícola total, absorbiendo el 54.77% de la superficie total destinada a la agricultura. Los datos de producción agrícola en 1979 y 1980 se presentan en el CUADRO II. De la producción total de maíz, el 81% se destina a consumo humano, el 15% a forraje y 4% restante se transforma en almidones, glucosa, dextrinas, féculas y otros derivados. Como materia prima, representa el 46% del costo de producción de tortillas cuando la masa de nixtamal constituye el proceso de elaboración y el 39% cuando se transforma previamente en harina de maíz nixtamalizado. Asimismo constituye el ingrediente básico de la dieta alimenticia popular, ya que su consumo excede en un 128% al que en conjunto representan trigo, frijol y arroz. En términos económicos la eficiencia proteica que aporta el maíz a través de las tortillas es 69% más barata que la de trigo incorporado al pan.

Del consumo alimenticio de maíz, la tortilla representa la mayor participación, de modo que mientras en 1965 se destinaba a la elaboración de tortillas el 68% del consumo nacional alimenticio de maíz, para 1970 la proporción se había elevado al 72% y en 1976 al 73%, estimándose que en 1982 será de 74%. En cuanto al consumo nacional promedio diario per cápita de tortillas, ha variado de 350 g en 1960, 343 g en 1970 y 341 g en 1976, siendo la demanda de

CUADRO II

PRODUCCION AGRICOLA AÑOS 1979 Y 1980

Hectáreas y Toneladas

CULTIVO	1979		1980	
	SUPERFICIE	PRODUCCION	SUPERFICIE	PRODUCCION
Mafz	5.915,960	8.751,941	6.955,201	12.383,243
Frijol	988,286	554,595	1.763,347	971,359
Arroz	150,450	481,052	132,013	456,217
Trigo	599,953	2.272,630	783,523	2.785,209
Sorgo grano	1.215,897	3.708,372	1.578,629	4.812,427
Cebada grano	259,750	376,420	329,427	609,697
Algodón pluma	376,835	355,542(a)	372,268	328,555(b)
Soya	427,657	719,350	154,784	311,668
Ajonjolif	321,154	173,893	282,347	175,562
Cártamo	494,200	619,387	392,233	445,505
Total:	10.750.142	18.235,497	12.698,772	23.488,645

(a) 1,546 (miles de pacas)

(b) 1,429 (miles de pacas)

(superficies cosechadas)

La producción de 1980 es 5 millones 253 mil toneladas mayor que la de 1979.

Datos obtenidos del periódico EXCELSIOR con fecha viernes - 19 de Diciembre, 1980.

tortillas de 5.9 millones de toneladas en 1976.

La industria de la harina de maíz en México, tuvo su origen a principios de los años cincuenta y actualmente México es el principal país productor en el mundo.

De acuerdo a un folleto editado por la Comisión -- Nacional de la Industria del Maíz para consumo humano (CONAIM) en 1976 (5), la industria productora de tortillas está integrada por 14 fábricas de harina, 12,600 tortilleras, -- 11,950 molinos de nixtamal y 7,900 molinos-tortilleras. - Dicha industria supera en valor de su producción anual al de la industria farmacéutica en un 25% y equivale al 95% del relativo a la industria siderúrgica, al 55% de la industria automotriz y al 30% de la industria química.

En 1976, las empresas que producían harina de maíz nixtamalizada en nuestro país eran cuatro (6):

- 1.- Molinos Azteca, S.A. con la marca MASECA.
- 2.- Maíz Industrializado, S.A. con las marcas MINSA y ELSARINA.
- 3.- Empresas Longoria, S.A. con las marcas ELSAMASA y ELSARINA.
- 4.- Molinera del Bajío, S.A. con la marca NIXARINA.

Para darnos una idea de la magnitud de la industria de harina nixtamalizada y los volúmenes de nejayote desperdiciados en nuestro país, a continuación se presenta una --

tabla con la capacidad de producción instalada de las plantas procesadoras de las dos principales marcas de harina nixtamalizada, MASECA y MINSA (CUADRO III).

Desgraciadamente, debido a que el nejayote es un producto de desecho, no se cuenta con datos relacionados con su producción tanto a nivel industrial como a nivel molino de nixtamal, ni tampoco con datos actualizados de capacidad de producción instalada de las industrias procesadoras de las otras marcas comerciales existentes. Sin embargo, tomando en cuenta datos de 1976 (6), se calcula un desperdicio de nejayote aproximado de 7,000 millones de litros al año.

2.3 Producción de Protefna Unicelular (PUC).

Protefna Unicelular es un término genérico que se da a aquellas fuentes de protefna cuyo origen son organismos unicelulares o multicelulares i. e., bacterias, levaduras, hongos y algas (7).

La producción de potefna unicelular se lleva a cabo mediante la obtención de biomasa microbiana con un alto contenido proteico en condiciones óptimas para su desarrollo.

CUADRO III

CAPACIDAD DE PRODUCCION INSTALADA

(toneladas)

MASECA		MINSA	
PLANTA	TOTAL	PLANTA	TOTAL
Acaponeta, Nay	87,600	Tlalnepantla, Mex	87,120
Guadalajara, Jal	43,800	Jaltipan, Ver	29,040
Zamora, Mich	87,600	Arriaga, Chis	29,040
Chihuahua, Chih	131,400	Guadalajara, Jal	58,080
Monterrey, N.L.	131,400	Los Mochis, Sin	58,080
Rfo Bravo, Tamps	87,600		
Chinameca, Ver	87,600		
Cd. Obregón, Son	87,600		
Culiacán, Sin	73,000		
total:	905,200		261,360

Estos datos corresponden a Enero-Diciembre de 1980.

Proporcionados por CONAIM.

Los microorganismos pueden clasificarse en cuatro grupos de acuerdo a sus necesidades de oxígeno:

- 1.- Aerobios, que crecen en presencia de oxígeno libre.
- 2.- Anaerobios, que crecen en ausencia de oxígeno libre.
- 3.- Anaerobios facultativos, que crecen en presencia o ausencia de oxígeno libre.
- 4.- Microaerófilos, que crecen en presencia de cantidades mínimas de oxígeno libre.

En el caso de microorganismos aerobios estrictos, - su crecimiento se estimula con una provisión abundante de oxígeno, obteniéndose consecuentemente un incremento en la rapidez de producción de proteína.

El término fermentación se da erróneamente en general a la transformación microbiana de un sustrato, independientemente de que este proceso se lleve a cabo en presencia o ausencia de oxígeno libre.

Las condiciones óptimas de fermentación como temperatura, pH, suplementación con nutrientes, agitación y aereación depende del microorganismo seleccionado para el proceso de PUC.

Varios microorganismos pueden ser considerados -- para la producción de PUC como bacterias, hongos, levaduras y algas. Las levaduras son las más estudiadas y han

tenido la mejor aceptación como alimento y material de forraje. Los hongos miceliares son atractivos debido a su facilidad de filtración y habilidad para proveer forma y textura, pero pueden requerir de condiciones asépticas de producción. La eficacia de las bacterias como alimento es poco conocida debido a que muchas de ellas son patógenas.- En el caso de algas, actualmente se produce a nivel industrial Spirulina, alga con buen contenido proteico.

Un gran número de procesos de producción de proteína unicelular han alcanzado posibilidades técnicas. Sin embargo, la factibilidad económica está afectada por la demanda de proteína, los requerimientos de energía y problemas de contaminación. De los diferentes costos de operación, los costos por sustrato son de importancia fundamental, seguidos por los costos de transferencia de calor y oxígeno. La escala óptima se escoge de acuerdo a factores tales como demanda de proteína local, disponibilidad de sustrato, agua de enfriamiento, energía y capital.

En el primer estatuto sobre producción de proteína unicelular, editado en 1970 (8), se concluyó que había evidencia adecuada para indicar que ciertas especies de levaduras, algas y bacterias podían ser fuentes de proteína, vitaminas y minerales para alimentación humana y animal. Se enfatizó sin embargo, que la seguridad y aceptabilidad humana dependían de la naturaleza y calidad del sustrato, de las

condiciones de crecimiento y de los detalles específicos de procesos y manejo de material. Para determinar la seguridad de la proteína unicelular en alimentación humana, se recomendó efectuar pruebas biológicas, que aseguren la ausencia de problemas de toxicidad, así como pruebas clínicas y preclínicas de los nuevos alimentos proteicos. Debido a que los microorganismos presentan una cantidad considerable de ácidos nucleicos, fue necesario determinar los niveles que podían ser añadidos a la dieta humana, sin tener riesgo de que causara la enfermedad conocida como "gota", producida por el depósito de ácido úrico en las articulaciones o por formación de piedras de ácido úrico en el tracto urinario. Se estableció un límite de 2 g. de ácido nucleico por día adicionados a la dieta normal, siendo menor en el caso de niños.

Existen métodos para modificar el contenido de ácidos nucleicos en proteína unicelular; a continuación se citan algunos:

- Control de crecimiento y/o fisiología celular
- Hidrólisis básica de RNA (ac. ribo nucleico)
- Extracción química de RNA con cloruro de sodio al 10%
- Lisis celular con procesos físicos o químicos e hidrólisis química o enzimática de RNA.

En el caso de usarse para alimentación de rumiantes, no se tiene el problema de acumulación de ácido úrico pues pueden degradarlo por medio de la enzima uricasa. Se han hecho experimentos con aves probándose que protefna unicelular de levadura puede formar 20% en peso de su dieta total. Se han hecho también experimentos con puercos, corderos y becerros pudiéndose incluir la PUC en la formulación de sus dietas.

Con el fin de darnos cuenta de la calidad nutricional de la PUC, se presenta una tabla en donde se comparan los aminoácidos esenciales de la protefna de diferentes microorganismos con el patrón de la FAO (CUADRO IV).

En base a los precios de pescado y de gramíneas durante los últimos años, así como el aumento en el costo de aves, huevos y productos lácticos y tomando en cuenta el incremento de la relación de crecimiento en la población, se puede ser optimista en cuanto a la futura factibilidad económica de la producción de protefna unicelular.

2.4 Efecto de efluentes contaminantes.

La naturaleza de los efluentes industriales, puede ser de dos tipos:

- 1.- Aquéllos que contaminan materiales tóxicos como fenoles, cianuros, resinas sintéticas, etc.

CUADRO IV

COMPOSICION DE AMINOACIDOS ESENCIALES

(g/100 g de protefna)

AMINOACIDO	LEVADURA (n parafina)	<u>Spirulina</u> <u>maxima</u>	BACTERIAS RUMINALES	MICRO HONGOS	FAO/WHO PATRON
LISINA	7.8	4.6	9.0	7.58	5.5
TREONINA	5.4	4.6	6.9	5.31	4.0
TOTAL DE AZUFRADOS	2.5	1.8	2.2	2.8	3.5
TRIPTOFANO	1.3	1.4	—	—	1.0
ISOLEUCINA	5.3	6.0	6.3	4.2	4.0
LEUCINA	7.8	8.0	8.7	7.6	6.0
TOTAL DE AROMATICOS	8.8	9.0	8.8	7.6	6.0
VALINA	5.8	6.5	4.7	5.2	5.0

2.- Los que contienen compuestos que ejercen una alta demanda de oxígeno durante su degradación, como carbohidratos o alcoholes. Como ejemplo tenemos los desechos de destilerías, cervecías, procesadoras de productos lácteos, fábricas de producción de papel, etc.

El nejayote pertenece a ambos grupos ya que es un tóxico debido al alto pH que presenta y los sólidos presentes están constituidos en su mayor parte por carbohidratos.

El efecto de los efluentes contaminantes repercute directamente sobre la flora y fauna de los lugares a los que llegan, impidiendo su desarrollo adecuado. En el caso específico del segundo grupo, debido a que los efluentes contienen los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos, éstos disminuyen la disponibilidad de oxígeno necesario para el crecimiento de la flora y fauna allí presentes.

Existen varias pruebas para determinar el grado de contaminación que puede presentar un efluente industrial o municipal al ser desechado. Entre las más usadas se encuentran la determinación de la demanda biológica de oxígeno (BOD) y la demanda química de oxígeno (COD) (9).

Por otro lado se considera que el rango de pH para que exista actividad vital efectiva en las aguas, es de 6.5 a 8.5. Por tanto, se recomienda que los desechos fuera de estos límites, se sujeten a neutralización antes de ser descargados, lo que debe estar de acuerdo obviamente con -- las características de la corriente receptora y los reglamentos en vigor. De acuerdo a lo anterior, el nejayote debe ser neutralizado antes de ser descargado, ya que su pH oscila entre 11 y 12. (10 y 11).

Existen varios métodos de neutralización de residuos muy ácidos o muy alcalinos:

- a) Mezclado de aguas residuales ácidas y alcalinas.
- b) Paso de aguas residuales por piedra caliza.
- c) Adición de lechada de cal a desechos ácidos.
- d) Adición de NaOH o Na_2CO_3 a desechos ácidos.
- e) Adición de CO_2 a aguas residuales alcalinas, para lo cual existen tres métodos:
 - Difusión de gases provenientes de chimeneas o calderas
 - Inyección de CO_2 comprimido
 - Combustión sumergida
- f) Adición de H_2SO_4 a residuos alcalinos.

El usar uno de estos métodos, significa una inversión y únicamente se tiene la ventaja de neutralizar el --- efluente.

En el caso de fermentar nejayote, se tienen las siguientes ventajas:

- i) Se produce una degradación de nutrientes disminuyéndose en consecuencia la demanda biológica de oxígeno, evitándose contaminación.
- ii) Se lleva a cabo la neutralización del efluente.
- iii) Se obtiene biomasa.

2.5 Antecedentes del Tema.

A continuación se da un panorama general sobre la utilización de fuentes proteicas no convencionales en México (12). Reciben esta denominación debido a que no se utilizan ampliamente para consumo humano. El estudio de estas fuentes se debe a que en la actualidad, cerca de la mitad de la población de los países en desarrollo sufre de deficiencias nutricionales.

En nuestro país, la búsqueda de nuevas fuentes de proteína se ha enfocado principalmente hacia el estudio de - 1) Semillas leguminosas, 2) Semillas oleaginosas, 3) Proteínas de hojas, 4) Insectos, 5) Suero de leche, 6) Sangre de bovino y 7) Proteínas de Microorganismos.

En el CUADRO V, se presenta un resumen de los estudios desarrollados sobre leguminosas. De las semillas es-

CUADRO V

ESTUDIOS DE FUENTES PROTEICAS NO CONVENCIONALES EN MEXICO

SEMILLAS DE LEGUMINOSAS

GRUPO	INSTITUCION	TIPO DE ESTUDIO
Calderón, R et al. (1978)	IMIT	- Desarrollo de una fórmula infantil a base de un concentrado proteico de garbanzo.
Sotelo, A. et al. (1978)	IMSS	- Determinación de la composición y de los factores antinutritivos de 33 especies y variedades de leguminosas consumidas en México.
Pérez-Gil, F. et al. (1979)	INN	- Estudio sobre la composición, valor nutritivo, factores antinutritivos e incorporación en diferentes productos de: <ul style="list-style-type: none"> - Guaje (<i>Leucaena leucocephala</i>) - Mezquite (<i>Prosopis laevigata</i>) - Guamuchil (<i>Phitecollobium dulce</i>) - Alegría (<i>amaranthus leucocarpus</i>) - Parota (<i>Enterolobium cyclocarpum</i>)

tudiadas, la que presenta mejores posibilidades de cultivo, comercialización y consumo en México, es el Amaranthus leucocarpus (alegría), pues tiene un balance de aminoácidos y un contenido de proteína mejor que cualquier cereal convencional conocido. Cabe mencionar que este pseudocereal, denominado así debido a que por su contenido de proteína y grasa (14 y 7% respectivamente) no se ha logrado clasificar -- desde un punto de vista químico dentro de los cereales o leguminosas, era el segundo cultivo más importante de los Aztecas después del maíz. (13 y 14).

Con respecto a las semillas oleaginosas, en el CUADRO VI se presentan los estudios más sobresalientes realizados en nuestro país. Dentro de este grupo y el de los cereales, el frijol de soya resulta ser la mejor fuente de proteínas (40% en promedio) además de que su contenido en grasa (20% en promedio) y lecitina (2% aproximadamente), la convierten en una fuente de aceites y emulsificantes de uso en la industria alimentaria. Su proteína presenta una calidad inferior a las de origen animal pero superior a las de origen vegetal. La soya ha sido utilizada principalmente para el "enriquecimiento" y "complementación" de cereales. La semilla no puede ser ingerida cruda debido a la presencia de inhibidores de tripsina y hemaglutininas, los cuales provocan trastornos fisiológicos. Para su uso en México, se han adaptado las técnicas orientales de germinación y --

CUADRO VI

ESTUDIOS DE FUENTES PROTEICAS NO CONVENCIONALES EN MEXICO

SEMILLAS DE OLEAGINOSAS

GRUPO	INSTITUCION	TIPO DE ESTUDIO
<u>Frijol soya</u>		
Camacho, J.L. et al (1978)	INN	- Adaptación de técnicas asiáticas tradicionales, germinación y fermentación de leche de soya. Extrusión y texturización de mezclas.
Morales, C.J. et al (1978)	INN	- Uso directo mediante tratamientos de remojo y cocción.
Tovar, R. et al (1974)	UNAM	- Adaptación de técnicas asiáticas tradicionales, germinación y fermentación.
De. Valle, F. et al Pérez-Villaseñor, J. et al Bourges, H. et al	ITEMS UAMI INN	- Nixtamalización de mezclas de maíz con soya para preparar tortillas. (1977)
<u>Ajonjolí</u>		
Calderón, R. et al (1978)	IMIT	- Procedimiento de descascarillado
Báez, M. et al (1975)	INN	- Obtención de harina para consumo humano.
Morales, C.J. et al (1978)	INN	- Desarrollo de productos con mezclas de cereales, soya y ajonjolí
<u>Girasol</u>		
Hernández, R. et al (1978)	INN	- Determinación de su composición; extracción del ac. clorogénico. Obtención de harina y de un concentrado. Incorporación a productos de panificación.
Trejo, A. et al (1977)	IPN	- Desarrollo de bebidas de frutas.
<u>Cacahuates</u>		
Tuffño, S. et al	INN	- Determinación de su composición, valor nutritivo y aflatoxinas. Desarrollo de productos.

fermentación, así como el remojo y la cocción del frijol - (15,16,17,18).

Dentro de las semillas oleaginosas, se ha investigado la incorporación de ajonjolí, girasol y cacahuete a otros productos como bebidas, panes, galletas y atoles (19, 20,21).

En el CUADRO VII se resumen diversos estudios desarrollados con proteínas de hojas, insectos, suero lácteo y sangre de bovino. Con respecto a las proteínas de hojas se han estudiado diversas plantas abundantes en México, aplicando diferentes métodos para la extracción de la proteína y su incorporación a diversos productos (22,23,24,25, 26).

En cuanto a insectos se han investigado diferentes especies que se consumen a nivel regional. Se pueden mencionar los jumiles, gusanos de maguey, escamoles y chapulines. Los insectos se pueden considerar una fuente de proteínas ya que es el grupo animal numericamente dominante y que además tiene un gran potencial reproductivo. Por lo tanto, los insectos constituyen un enorme recurso natural, que de ser aprovechado sistemáticamente, podría proporcionar un alimento de alto valor (27).

CUADRO VII

ESTUDIOS DE FUENTES PROTEICAS NO CONVENCIONALES EN MEXICO

<u>GRUPO</u>	<u>INSTITUCION</u>	<u>TIPO DE ESTUDIO</u>
<u>Proteínas de hojas</u>		
Cravioto, R. et al (1951)	IN	- Composición de algunas plantas comunes en México.
Parada, e. et al (1970, 1975, 1976)	IPN	- Composición, valor nutritivo y obtención de concentrados de proteínas de hojas a partir de: alfalfa (<i>Medicago sativa</i>); berro (<i>Nasturtium aquaticum</i>). Incorporación del concentrado proteico de alfalfa a tortillas y la adaptación de un procedimiento de extracción a nivel rural.
Torres, M. et al (1980)	IPN	- Elaboración de un concentrado proteico de hojas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)
<u>Insectos</u>		
Conconi, J. et al (1977)	UNAM	- Composición y valor nutritivo de las principales especies consumidas en México: hormiga roja (<i>Atta mexicana</i>); chinches de agua (<i>Atizies taxcoensis</i>); gusano de maguey (<i>Hypota agavis</i>) y escamoles (<i>Lasius eskamole</i>).
Del Valle, F. et al (1977)	ITESM	- Determinación de la composición, valor nutritivo y condiciones de obtención de harina de grillo.
<u>Suero Lácteo</u>		
Bourges, H. et al (1976)	INN	- Composición, valor nutritivo e incorporación a diferentes productos.
Racota, V. et al (1979)	IPN	- Obtención de concentrados de proteína de suero.
<u>Sangre de bovino</u>		
Lara, F. et al (1977)	UNAM	- Composición, valor nutritivo y obtención del concentrado.

Por otra parte, la utilización de suero lácteo en alimentación humana se lleva a cabo desde 1974, año en que se introdujeron en el mercado dos productos para programas aplicados de nutrición, CONLAC (leche modificada para lactantes) y LACTODIF (pastilla destinada a escolares a base de leche descremada, suero y harina de soya) (28 y 29).

Se han hecho varios estudios sobre la utilización de sangre de bovino como fuente potencial de proteína pura para consumo humano (30).

Finalmente, en cuanto a la utilización de microorganismos como una fuente de proteína, en el CUADRO VIII se presentan los estudios realizados en nuestro país a este respecto.

Hace algunos años, se estudió el valor nutritivo del "Xastle", el cual es una mezcla heterógama de microorganismos, que la mayoría de las veces se desperdicia o bien se usa en alimentación animal. El "Xastle" es el residuo de la fermentación de el jugo del ágave en la obtención del pulque, que es una de las principales bebidas fermentadas que se consumen en México (31).

Se han llevado también a cabo estudios sobre la composición, valor nutritivo y aprovechamiento de algas del género Spirulina, las cuales crecen en forma abundante en los lagos alcalinos frecuentemente encontrados en nuestro país (32 y 33).

CUADRO VIII

ESTUDIOS DE FUENTES PROTEICAS NO CONVENCIONALES EN MEXICO.

PROTEINA UNICELULAR

GRUPO	INSTITUCION	TIPO DE ESTUDIO
Casas campillo, et al (1976)	IPN	-Composición, valor nutritivo y tecnología de producción de diversas especies de: levaduras, bacterias, hongos y algas; estudio de diferentes sustratos (hidrocarburos, melazas, alcoholes).
Viniegra, G. et al (1977)	UNAM	-Procedimientos de fermentación y Utilización de proteína unicelular para alimentación animal.
Monroy, R. et al (1977)	INN	-Composición, valor nutritivo y uso del "Xastle".
Bourges, H. et al	INN	-Determinación de la composición y valor nutritivo de la <u>Spirulina</u> . Estudios a cerca de su incorporación a mezclas.
Bourges, H. et al (1971)	INN	-Composición y valor nutritivo de <u>Saccharomyces cereviceae</u> .

Cabe mencionar que a pesar de que el volumen de desperdicio de nejayote es enorme, dada la importancia de la industria de nixtamalización en México, no existe ningún estudio sobre su aprovechamiento en alguna forma. Debido a lo anterior y optando por llevar a cabo una fermentación para el aprovechamiento del nejayote, se buscó en la bibliografía que microorganismos podrían desarrollarse en un medio cercano al pH de 12.

Con respecto a levaduras, no se encontró reportada alguna variedad que soportara este pH, ocurriendo algo similar para hongos.

En cuanto a bacterias, existen datos que plantean el efecto de el pH en su crecimiento (34). De las que soportan pH alto, la gran mayoría son patógenas. Souza y Deal (35), estudiaron el crecimiento y reproducción de una bacteria a pH superior de 11 y la identificaron tentativamente como Flavobacterium. Sin embargo, hay reportes donde se habla de su toxicidad. Existe un trabajo realizado por Sistmuk e Ismail (36), en el cual fermentan con bacterias los desperdicios del mondado de papa, con un pH de 11 a 12.

En cuanto a algas, se encontraron reportes del crecimiento de Spirulina maxima a pH entre 8.5 y 10. Kosaric y Nguyen (37), estudiaron su crecimiento en efluentes de des

perdicio industrial para obtención de biomasa, resultando -- una fuente de protefna de buena calidad. Sin embargo, debi- do a que se trata de un microorganismo autótrofo, se usa dió xido de carbono como fuente de carbono, removiéndose el fós- foro y nitrógeno presentes en el efluente.

Como puede observarse en lo mencionado anterior-- mente, no se contaba con bibliograffa en cuanto al tipo de - microorganismo que podfa ser empleado en la fermentación -- aerobia del nejayote.

III

MATERIALES Y METODOS

3.0 Presentación

Con el objeto de apreciar el alcance global del estudio, en el CUADRO IX se presenta un diagrama de flujo de la secuencia experimental realizada..

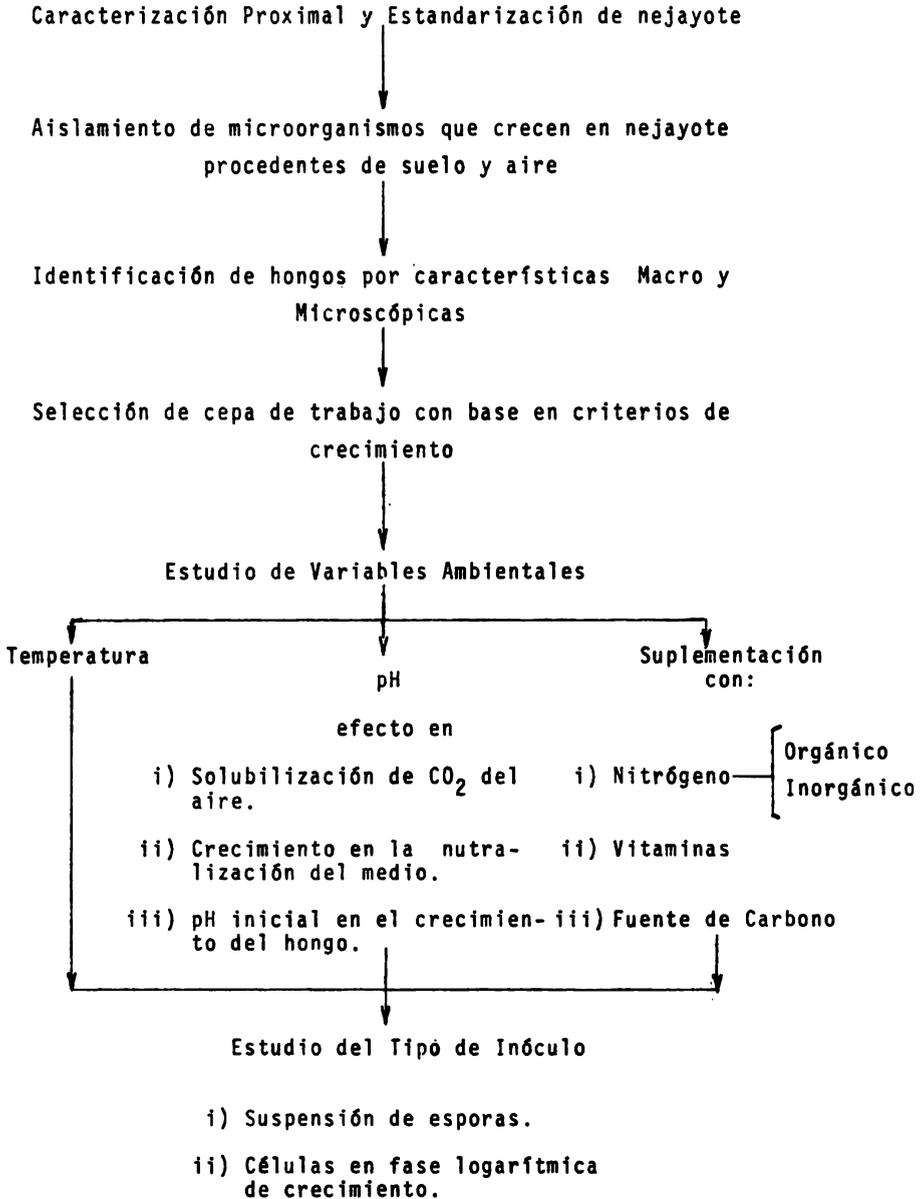
Posteriormente se establecen los comentarios asignables a cada etapa.

3.1 Estandarización del nejayote

Con el fin de trabajar siempre con el mismo medio, el nejayote se obtuvo en el laboratorio a partir de maíz cristallino híbrido H-28 cosecha 1978, obtenido de la Escuela Nacional de Agronomía en Chapingo Edo. de México. Fue nixtamalizado con 1% de cal y una relación maíz-agua de 1:3. La temperatura y el tiempo de cocimiento fueron 94°C y 30 minutos.- El tiempo de reposo fue de 12 horas después del cual se decantó el sobrenadante (nejayote), separándolo del maíz cocido.- El maíz fue lavado con la cantidad de agua necesaria para completar el volumen obtenido al volumen inicial de agua empleada para la nixtamalización. Esta agua de lavado se añadió al nejayote, que alcanzó un pH de 11-11.5.

CUADRO IX

SECUENCIA EXPERIMENTAL



3.2 Análisis Proximal.

Este análisis se llevó a cabo en nejayote liofilizado, de acuerdo a los métodos oficiales especificados en el -- A.O.A.C. (38).

- a) Humedad (27.3)
- b) Proteínas. Método de kjeldahl (2.25)
- c) Extracto etéreo. Método de Soxhlet (27.25)
- d) Fibra Cruda (27.28)
- e) Cenizas (27.29)
- f) Carbohidratos. Determinados por diferencia.

El % de sólidos totales se determinó concentrando -- la solución original por evaporación al vacío y liofilizando -- la solución concentrada. Para esta determinación se concen-- traron 100 ml de nejayote.

El % de calcio se calculó titulando nejayote con -- Etilendiamino tetra acético (EDTA), usando calcón como indica-- dor (39).

EQUIPO

Liofilizadora FREEZE DRY - 3 LABCONCO

Rotavapor BUCHI No. 113048

3.3 Aislamiento de Microorganismos.

En vista de que no se contaba con bibliografía relacionada con el tema, se optó por aislar microorganismos procedentes de suelo y aire que fuesen capaces de desarrollarse en el nejayote con pH inicial de 11. Para ésto, se inoculó un matraz conteniendo 500 ml de nejayote con un poco de tierra. Un segundo, preparado en las mismas condiciones, se dejó abierto a la atmósfera para aceptar microorganismos presentes en el aire. Ambos se dejaron a temperatura ambiente, sin agitación, en condiciones no asépticas y durante 15 días.

Posteriormente se efectuó el aislamiento de los microorganismos presentes en cada matraz, para lo cual se emplearon dos métodos:

- a) Separación de esporas de colonias aisladas y transferencia de las mismas en condiciones asépticas a medios sólidos favorables para el desarrollo de hongos, bacterias o levaduras según corresponda.
- b) Dilución en agar. Aquí se tienen una serie de tubos, cada uno de los cuales contiene 10 ml de cultivo a una temperatura tal que el agar no solidifique. Se añade a uno de los tubos y en condiciones asépticas, una pequeña cantidad de material que contiene el microorganismo, se agita, se toma un mililitro y se añade a un segundo tubo en las mismas condiciones. El resto del medio se vierte en una caja petri. Del segundo tubo se transfiere un mili-

litro a un tercero y así sucesivamente, con objeto de obtener en las cajas el desarrollo de colonias separadas a partir de las cuales se aísla y se obtienen cultivos puros.

El aislamiento se realizó usando como medio de cultivo Sabouraud-agar. Las cajas petri inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente el tiempo necesario para el desarrollo de los microorganismos.

3.4 Identificación de los hongos miceliares aislados.

El hecho de haber seleccionado hongos para efectuar este estudio, fue debido a que presentan ciertas ventajas con respecto a las bacterias. Una de ellas es la facilidad de cosechado, pues pueden filtrarse en forma sencilla y rápida y proveen una textura natural debido a la naturaleza del micelio. Sin embargo, tienen el problema de contaminación, ya que su rapidez de crecimiento es relativamente baja, siendo necesario trabajar en condiciones asépticas. Las bacterias presentan las desventajas de ser susceptibles a fagos, tener un contenido muy alto de ácidos nucleicos y dificultad de cosechado debido al tamaño celular tan pequeño; en contraparte, son de crecimiento rápido, alto contenido protéico y alto contenido de aminoácidos azufrados.

Es conveniente señalar que los hongos han recibido un menor estudio en cuanto a lo que se refiere a producción de PUC.

La identificación se realizó de acuerdo a características tanto macroscópicas como microscópicas de los hongos.

Los medios de cultivo fueron Sabouraud-agar y V-8-agar (40).

La caracterización macroscópica se hizo en colonias gigantes, para lo cual se sembró el hongo por picadura en el centro de una caja petri con medio de cultivo. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 10 días.

Las características observadas fueron las siguientes:

- forma de la colonia
- tipo y largo de micelio
- cantidad de crecimiento
- humedad de la colonia
- color de la colonia por encima y debajo de la caja
- cambios de coloración en el medio

La caracterización morfológica microscópica, se efectuó mediante la preparación de microcultivos, usando como medio de propagación del hongo, bloques de 1 cm. de largo por 0.5 cm. de alto.

La técnica empleada para el microcultivo fue la siguiente:

En una caja petri con 0.5 cm. de medio de cultivo solidificado, se colocan 4 ó 5 bloques del mismo medio de cultivo, los cuales son inoculados con el hongo por todas sus caras. Posteriormente se coloca un cubre-objetos estéril sobre cada cubo. Permi-tiéndose el desarrollo del hongo, queda pegado en el cubre-objetos. Este último se separa del bloque y se coloca sobre un porta-objetos con una gota de lactofenol. Por último para que la preparación sea conservada, se sellan las orillas del -cubre-objetos con barniz de uñas transparente.

El periodo de incubación total fue de 12 días, te--niéndose en el caso de cada hongo 3 cajas petri con 4 bloques cada una, de las que se hicieron preparaciones cada 2 días con el fin de observar microscópicamente el desarrollo de las es-structuras del hongo. No es aconsejable teñir el hongo para -observarlo en el microscopio ya que se afectan las estructuras, por lo que únicamente se usó lactofenol de Amman (40) como me-dio de contraste en la observación.

Para la identificación del género de los diferentes hongos, se siguió la clave de Gilman (41), observando las es-structuras de reproducción, caracterfsticas microscópicas el -micelio y caracterfsticas macroscópicas del hongo.

El hongo seleccionado para efectuar la fermentación corresponde al género Alternaria al que se le determinó la especie, procediéndose a efectuar mediciones de las estructuras reproductoras, observación y caracterización del color, forma, tipo y número de septos y forma de reproducción, así como la prueba de cromogénesis en arroz, especial para identificar especie del género Alternaria (42), para lo cual se esterilizó 1 g de arroz en 10 ml. de agua destilada a 120°C/15 min en tubos de ensaye. El hongo fue inoculado por picadura y los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 2 meses, observándose la coloración que se producía sobre el arroz al desarrollarse el hongo.

3.5 Selección del microorganismo para efectuar la fermentación

La selección se realizó con base en criterios de crecimiento para lo cual cada hongo se inoculó en 100 ml. de nejayote esterilizado a 120°C/15 min. El inóculo fue de 2 ml de suspensión de esporas. Por otro lado, cada hongo se inoculó en nejayote-agar por picadura, formándose una colonia gigante después de incubar. El pH inicial en ambos casos fue de 11. Para determinar el hongo que presentaba mejor crecimiento en nejayote en el caso de medio líquido, después de un período de incubación de 4 días a 25°C y 250 rpm, se filtró el hongo, se liofilizó y se determinó peso seco en una balanza de humedad. En el caso de medio sólido los hongos se incubaron a 25°C durante 10 días y se midió el diámetro de la colonia gigante.

La suspensión de esporas se preparó de la siguiente forma:

En un tubo con nejayote-agar y el hongo desarrollado se agregaron 8 ml de agua estéril, removiéndose las esporas con un asa y posteriormente se pasó el líquido a un tubo de centrifuga. Se centrifugó a 800 rpm por un minuto, se separó el sobrenadante (el que corresponde a la suspensión de esporas) y se inoculó con esta suspensión. De tal manera que los inóculos fueran lo más homogéneos y similares posible en todos los experimentos.

EQUIPO

Agitador con incubador ambiental G24. New Brunswick Scientific Co, Inc.

Liofilizadora FREEZE DRY-3 LABCONCO

Termobalanza AHOUS Modelo No. 6010

Centrifuga Clínica Modelo A3076X-10. International Equipment Co.

3.6 Estudio de Variables Ambientales.

3.6.1 Temperatura.

Una vez seleccionada la cepa de trabajo, la temperatura se fijó de acuerdo a la óptima reportada en la bibliografía para el género seleccionado, correspondiendo a un rango entre 25 y 26°C.

3.6.2 pH

Esta variable es sumamente importante, ya que cada microorganismo presenta un crecimiento óptimo a un determinado pH. En vista de que el nejayote tiene un pH inicial cercano a 12 y tomando en cuenta que no existe reportado ningún -- hongo que se desarrolle en estas condiciones, se buscó la forma de llevar a cabo la neutralización del medio, para lo cual se estudiaron los siguientes aspectos:

i) Efecto de solubilización de CO₂ en la disminución de pH.

Para este estudio, se esterilizó nejayote con pH inicial de 11 y se sometió a una agitación de 200 rpm y aereación de 0.5 slpm durante 40 horas, correspondientes a las condiciones de trabajo normales del equipo de fermentación empleado. Las variaciones de pH con respecto al tiempo se registraron con ayuda de un potenciómetro adaptado al equipo. Con el fin de contar con un blanco de referencia, se sometió a las mismas condiciones de aereación agua con 1% de cal, registrándose también las variaciones de pH. Por otro lado, se sometió nejayote a una agitación mayor (600 rpm) para -- observar si aumentaba la rapidez de solubilización de CO₂ y por lo tanto la disminución del pH.

ii) Efecto del crecimiento en la neutralización del medio.

Se inocularon 350 ml de nejayote estéril con un volumen de suspensión de esporas correspondientes al 5% del

volumen total y se determinó la disminución de pH con respecto al tiempo de igual manera que en el caso anterior.

iii) Efecto del pH inicial en el crecimiento del hongo.

Para efectuar esta prueba, se inocularon 100 ml de nejayote estéril con 2 ml de suspensión de esporas, ajustando con HCL diluido el pH inicial del medio a diferentes valores i.e. 11, 10, 9, 8 y 7. Los matraces fueron incubados a 25°C y 250 rpm durante 30 horas. Los criterios seguidos para ver la influencia del pH en el crecimiento fueron las determinaciones de proteína y azúcares totales.

EQUIPO

Potenciómetro BIOFLO Modelo 030. Capacidad 500 ml, con analizador de Oxígeno Disuelto (O.D.) y potenciómetro integrados. New Brunswick Sci. Co. Inc.

Agitador con incubador ambiental G24. New Brunswick Sci. Co. Inc.,

Para la determinación de carbohidratos se probaron dos métodos:

- Fenol-Ac. sulfúrico (43)
- Antrona Modificado (44).

El método seleccionando fue el segundo, pues presenta menor dificultad y mayor sensibilidad. Este método determina azúcares totales y no es necesaria la hidrólisis del polisacárido para la prueba, a pesar de desconocerse el mecanismo

mo de reacción (45). El carbohidrato en presencia de H_2SO_4 - reacciona con el reactivo de antrona (9,10 dihidro oxoantra--ceno), formando un compuesto colorido (verde) que puede ser - leido espectrofotometricamente a 620 nm, tomando como referen- cia una curva patrón de glucosa.

Para la determinación de protefna, fueron probados 3 métodos:

- Determinación del contenido total de protefna en microorga- nismos con el reactivo de Folin-Ciolcalteu (46).
- Lowry modificado para protefna insoluble (47).
- Método de Biuret (48).

El primero presentó el problema de turbiedad al -- reaccionar con la muestra; el de Biuret, debido a que es un - método para protefna soluble, se trató de modificar resultan- do un método muy poco sensible. Al usar albúmina sero-boyina como patrón se obtuvieron resultados bastante diferentes a los del método de Biuret sin modificar. Estas variaciones no se- presentaron con el método de Lowry.

El método de Lowry para protefna insoluble fue el que presentó mejor resolución, ya que la protefna determinada en el hongo no era soluble. En este método se precipita pri- mero la protefna con ácido tricloro acético (TCA), separándo- la del sobrenadante por centrifugación (3100 rpm/30 min), pa-

so que tiene además la ventaja de eliminar impurezas. Posteriormente se redisuelve la proteína con dodecíl sulfato de sodio (SDS) en medio alcalino, formándose después un complejo colorido de Cu cuproso con el enlace peptídico de la proteína en presencia de tartrato de sodio y potasio (éste evita la precipitación del cobre en medio alcalino) e intensificando la coloración producida por la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con Tirosina y Triptofano. Esta coloración se mide espectrofotométricamente a 750 nm y se usa -- como referencia una curva patrón de albúmina sero-bovina.

EQUIPO

Centrifuga Clínica Modelo A3076X-10 International Equipment.

Espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30 UV.

3.6.3 Suplementación del Medio

Se estudió el efecto de suplementación de Nejayote con tres diferentes nutrientes en el crecimiento del hongo:

i) Suplementación con Nitrógeno.

De acuerdo con la bibliografía (49 y 50), la mayoría de las fermentaciones fúngicas se suplementan con 1% de sulfato de amonio (0.106% N) por lo que se tomó este dato como base y las diferentes fuentes de nitrógeno se suplementaron en una cantidad equivalente a 0.106% de nitrógeno. Se eligió esta base, debido a que no se encuentran reporta-

dos requerimientos nutricionales de Alternaria alternata.

Las fuentes de nitrógeno estudiadas fueron:

Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -----	1%
Nitrato de Potasio KNO_3 -----	0.764%
Peptona de harina de soya con 9.3% de N -----	1.13%
Extracto de levadura con 7.4% de N -----	1.43%

Los mejores rendimientos se obtuvieron con el extracto de levadura por lo que se fermentó nejayote suplementado con diferentes proporciones de este nutriente i.e. 0.1, 0.5, 1 y 1.13%. Con el fin de observar el efecto real, se hizo un blanco fermentando en las mismas condiciones agua con extracto de levadura.

Es de importancia mencionar que de acuerdo al análisis bromatológico de nejayote, la relación C/N en este medio es de 44.48/1. De acuerdo a la bibliografía y en general, para lograr un buen desarrollo de cualquier hongo debe tenerse en el medio nutriente una relación C/N = 15/1. Con base a ésto, el nejayote debía ser suplementado con 0.018% de nitrógeno, lo que equivale a 0.2% de peptona de soya y 0.24% de extracto de levadura.

ii) Suplementación de nejayote con Vitaminas.

El nejayote se suplementó con una mezcla de vitaminas, cuya composición se presenta en el CUADRO X, en una cantidad equivalente en Niacina a la contenida en el extracto

CUADRO X

COMPOSICION DE LA MEZCLA DE VITAMINAS EMPLEADA EN SUPLEMENTACION

<u>Vitamina</u>	<u>g vit/kg mezcla</u>
Ac. p amino benzóico	11.0132
Ac. Ascórbico	101.6604
Biotina	0.0441
Vit. B ₁₂	2.9736
Pantotenato de calcio	6.6079
Citrato de colina dehidrogenado	349.6916
Ac. fólico	0.1982
l-inositol	11.0132
Menadiona	4.9559
Niacina	9.9119
Piridoxina HCl	2.2026
Riboflavina	2.2026
Tiamina HCl	2.2026
Vit. A (palmitato)	3.9648
Vit. D ₂	0.4405
Acetato de vitamina	24.2291

de levadura, lo que corresponde a 0.07% de mezcla de vitaminas.

Con el fin de observar el efecto conjunto de una suplementación con vitaminas y nitrógeno, se efectuó una fermentación para cada proporción de peptona de soya i.e. 0.2, - 0.5, 1 y 1.13% manteniendo constante la de vitaminas (0.07%).

iii) Suplementación con Glucosa.

Pensando que posiblemente parte de los azúcares presentes en el nejayote no se encontraban en una forma altamente disponibles para el hongo, se observó el efecto de suplementar nejayote que contaba 1% de extracto de levadura con -- 1% de glucosa. Paralelamente se corrió un blanco con agua -- más 1% de extracto de levadura y 1% de glucosa, fermentado en las mismas condiciones.

Es de importancia hacer notar que el estudio de -- variables ambientales, se efectuó tratando de optimizar el medio de cultivo de acuerdo a los requerimientos nutricionales para Alternaria alternata, con el fin de obtener el mayor contenido proteico intracelular en el menor tiempo posible.

3.7 Estudio del tipo de Inóculo.

Con el fin de controlar de alguna forma la cantidad de inóculo en las pruebas anteriores, se usaron 2 ml de suspensión de esporas por cada 100 ml de medio; sin embargo, se

quiso comparar el rendimiento en la fermentación inoculando nejayote con células en fase logarítmica de crecimiento.

El inóculo en fase logarítmica se preparó creciendo 100 ml de nejayote a 25°C y 250 rpm por 35 horas, cuyo inóculo había sido de 2 ml de suspensión de esporas. Una vez fermentado, el medio fue homogenizado en licuadora por 30 segundos.

El estudio se hizo con nejayote suplementado con 1% de glucosa y 1% de extracto de levadura, y nejayote suplementado con 1% de extracto de levadura, inoculados con 5% de medio prefermentado.

Durante todas las curvas de crecimiento efectuadas para el estudio de suplementación y tipo de inóculo, se hicieron determinaciones de proteína (Método de Lowry modificado), azúcares totales (Método de Antrona modificado) y pH final.

Es necesario hacer notar que el método de Lowry de termina los grupos de Tirosina y Triptofano, comparando los resultados con el contenido en el patrón de albúmina sero-bovina. Los hongos son particularmente deficientes en Triptofano y por lo tanto la determinación de proteína no es exacta. Sin embargo, es un método rápido que permite tener una idea relativa del aumento de proteína. Comparando resultados obte nidos con este método con los obtenidos por el método de Mi--

cro-kjeldahl, el segundo da valores más altos. Debemos también tomar en cuenta que éste último determina nitrógeno total y que los hongos contienen ácidos nucleicos y quitina en proporción considerable.

Por último, para dar una idea de rendimiento en peso seco, se filtró el hongo de dos fermentaciones diferentes, se lavó con agua destilada, se liofilizó y se determinaron peso seco y porcentaje de proteína por el método de Microkjeldahl especificado en el A.O.A.C. (42.014).

EQUIPO

Agitador con incubador ambiental G24. New Brunswick Sci. Co.

Potenciómetro SARGENT-WELCH.

Espectrofotómetro PYE UNICAM SP 30 UV.

Centrifuga Clínica Mod. A3076-10. International Equipment Co.

Liofilizador FREEZE DRY-3 LABCONCO

Termobalanza OHAUS Modelo 6010

Licuada Osterizer de 4 velocidades.

IV

RESULTADOS

4.1. Análisis Proximal.

A continuación se presentan los resultados del análisis proximal del nejayote:

<u>COMPONENTE</u>	<u>ANALISIS</u>
Humedad	98.5%
Sólidos Totales	1.5%
Proteína	3.87%(B.S.)
Fibra Cruda	13.52%(B.S.)
Extracto etéreo	0.27%(B.S.)
Cenizas	15.37%(B.S.)
Carbohidratos	66.97%(B.S.)

El nejayote de maíz nixtamalizado obtenido en las condiciones descritas en el capítulo anterior, presentó un contenido de calcio de 0.46% W/V.

4.2. Aislamiento e Identificación de Microorganismos.

De acuerdo a la caracterización macroscópica y --microscópica, los hongos aislados de nejayote con pH inicial de 11 e inoculado con suelo y aire, se identificaron con los siguientes géneros:

MICROORGANISMO	PROCEDENCIA
Penicillium	Aire
Cladosporium	Aire
Mucor	Aire
Phoma	Suelo
Humícola	Suelo
Alternaria alternata	Suelo
No identificado (Asporógeno)	Suelo

Se aislaron también bacilos G(-) y Cocos G(+), de los cuales no se hizo mayor caracterización debido a que no formaron parte del estudio.

Las características macroscópicas de los hongos - identificados, usando como medio de cultivo Sabouraud-agar e incubados a temperatura ambiente durante 5 días, se presentan en el CUADRO XI.

Las características morfológicas de la estructura observada en el microscopio (40X) para cada hongo, son las siguientes:

Penicillium.- Pertenece al orden Moniliales o Hyphomycetales y a la familia Moniliaceae. Presenta micelio vegetativo incoloro y tabicado. Las ramas fértiles (conidióforos) que - arrancan del micelio sumergido y más o menos perpendiculares

MICROORGANISMOS	FORMA COLONIA	MICELIO		DIAMETRO COLONIA	HUMEDAD COLONIA	COLOR		CAMBIO DE COLOR EN MEDIO
		TIPO	LARGO			ARRIBA	ABAJO	
Penicillium	Redonda	Compacto	Corto	2.5cm	Seca	Amarillo, azul, verde	Amarillo mostaza	NO
Cladosporium	Redonda	Atercio-pelado	Corto	2cm	Seca	Verde olivaceo	Negro verdoso	NO
Mucor (a)	-	Algodonoso abierto	Largo	--	Seca	Blanco, gris	Blanco	NO
Phoma	Ovalada	Algodonoso	Corto	5x4 cm	Seca	Rosado	Rosa-canela	NO
Humicola	Redonda	Algodonoso	Corto	2.7 cm	Húmeda	Café-grisáceo	Café grisáceo	NO
Alternaria	Redonda	Algodonoso	Corto	4 cm	Seca	Verde olivaceo	Verde olivaceo	NO
No Identificado	Redonda	Algodonoso	Corto	4 cm	Seca	Blanco-rosado	Café crema	NO (b)

(a) No se tiene forma ni diámetro porque el hongo se desarrolló en toda la superficie de la caja.

(b) A los 15 días, el medio cambia a color naranja.

al mismo, están reunidas en fascículos, son septadas, lisas y terminan en un verticilo de ramas en forma de pincel (el penicillus). La ramificación está de 2 a 4 veces verticilada, simétrica, con ramas terminales denominadas fiálides. -- Los conidios se producen por escisión y forman cadenas no ramificadas, son globosos, lisos y de color verde pálido. En el último estudio taxonómico del género se reportan 237 especies y algunas variedades.

Cladosporium.- Pertenece al orden Hyphomycetales y a la familia Dematiaceae. Todas las partes del hongo presentan color pardo verdoso. Las esporas se forman por germinación, de un modo parecido a las levaduras, produciendo masas arborescentes de cadenas muy ramificadas. Las esporas jóvenes son por lo regular unicelulares, las viejas tienen 2 ó 3 - células. El micelio vegetativo está septado.

Mucor.- Pertenece a los Zygomycetes, orden Mucorales. Las esporas son formadas en esporangios globosos portados en - esporangióforos. La pared del esporangio es delgada y -- las esporas se liberan mediante su ruptura o disolución. - Las esporas tienen forma ovoide. Se observa formación de clamidosporas. El micelio vegetativo no está septado. No se observa presencia de columela en el esporangio.

Phoma.- Pertenece al orden Sphaeropsidiales, familia Sphaeropsidiaceae. Las conidias o esporas se forman dentro de un picnido ostiolado de color café oscuro. Las conidias son expulsadas a través del ostiolo, El picnidio tiene forma de botella y a veces es irregular, más o menos ovoide. Las esporas son hialinas, entre ovales y alargadas y unicelulares. El micelio vegetativo está septado.

Humicola.- Pertenece al orden Hyphomycetales, familia Dematiaceae. Presenta hifas vegetativas hialinas y septadas. La colonia es algodonosa, al principio blanca y después café grisáceo. Presenta formación de clamidosporas y conidióforo no ramificado, incoloro y liso. Las conidias son de color café oro, con pared más bien delgada, típicamente esféricas y ocasionalmente ovoides lisas y no septadas. El género Humicola presenta también un estado de fiálide, el cual no fue observado en la colonia aislada.

Hongo no identificado.- Presenta micelio vegetativo septado y no produce estructuras reproductoras o conidias. Se trató de inducir a la formación de estructuras de reproducción, variando los medios de cultivo, pero no se logró. Presenta esclerotios o agrupaciones de micelio, por lo que se piensa que podría ser clasificado como Mycelia sterilia.

Muchos de los hongos así clasificados son parásitos Ascomycetes o Basidiomycetes que no producen esporas en

los medios artificiales corrientes. Existen también especies de Fusarium que cuando se aislan por primera vez, únicamente producen micelio vegetativo (51). Puede ser que este hongo - corresponda a uno de estos casos.

Alternaria alternata.- De este hongo se determinó género y especie, debido a que fue el que presentó mejor crecimiento en nejayote y por lo tanto el seleccionado para efectuar el estudio de fermentación aerobia, por lo que se da una mayor descripción de las estructuras microscópicas.

El micelio vegetativo es hialino y septado. Los conidióforos y conidias son de color café dorado. Los conidióforos son por lo regular rectos, lisos, presentan de 1 a 3 septos, con un largo hasta de 50 micras y un ancho de 3- a 6 micras, con una o varias cicatrices conidiales, las cuales quedan después de la separación de la conidia del conidióforo. Las conidias se forman en cadenas largas, frecuentemente ramificadas, su forma es por lo general ovoide pero puede ser elipsoidal, clavada o piriforme, con un pico cilíndrico o cónico de un largo no mayor a un tercio del largo de la conidia y de 2 a 5 micras de ancho, presentando un color usualmente más claro. La conidia tiene una longitud de 10 a 63 micras con un promedio de 37 micras y un ancho de 5 a 18 micras con un promedio de 13 micras en la parte más ancha. Presenta de 1 a 8 septos transversales, con un promedio de 3 septos. Por cada 1-6 divisiones transversales,-

hay uno o dos septos longitudinales. La pared de la conidia es lisa o ligeramente rugosa (FIG 1).

La prueba de cromogénesis en arroz dió como resultado, después de dos meses de incubación a temperatura ambiente, la producción de un color café claro sobre el arroz, característico de la especie alternata, descrita también como tenuis (52 y 53)

4.3 Selección del microorganismo.

Con base en los resultados presentados a continuación, el hongo seleccionado para efectuar las pruebas de fermentación fue Alternaria alternata, debido a que fue el que presentó las mejores características de crecimiento en nejayote con pH inicial de 11. TABLA I.

T A B L A I

Hongo Miceliar	pH final	Peso seco/100 ml de nejayote (96 horas)	Diámetro de colonia gigante(10 días)
Penicillium	7.8	0.43 g	4 cm
Cladosporium	7.9	0.39 g	3.5 cm
Mucor	8.2	0.26 g	-(a)
Phoma	8.1	0.47 g	4.1 cm
Humícola	8.0	0.46 g	4 cm
No Identificado	7.9	0.36 g	3 cm
Alternaria alternata	8.2	0.48 g	4.5 cm



Fig. I

(a) Este hongo presentó crecimiento restringido en nejayote sólido. Se observó algo de micelio sobre el medio, pero no hubo formación de colonia gigante.

Observaciones:

- 1) El hongo no identificado produce una coloración roja sobre el medio nejayote-agar.
- 2) Después de la fermentación el nejayote se observa claro - y sin sólidos en suspensión.

4.4 Estudio de Variables Ambientales.

4.4.1 pH

i) Efecto de solubilización de CO₂ del aire en la disminución de pH.

Se hicieron curvas de neutralización para los siguientes medios:

- 1.- Nejayote estéril con agitación de 200 rpm.
- 2.- Nejayote estéril con agitación de 600 rpm.
- 3.- Patrón de agua-cal 1%.

Los resultados de este estudio se presentan en la GRAFICA No. 1, encontrándose una disminución de 3 a 4 unidades de pH en un intervalo de 40 a 45 horas y comportamientos similares de neutralización para los dos niveles de aereación.

El patrón de agua-cal presenta dos etapas de neutralización, una lenta y otra rápida, que difieren considerablemente con las pruebas de nejayote estéril.

ii) Efecto de crecimiento en la neutralización del medio.

El resultado se encuentra expresado también en la GRAFICA No. 1, con el objeto de compararse con el resultado anterior. La disminución de pH en este caso fue de 3 unidades en un intervalo de 45 a 50 horas de fermentación.

De estos resultados se observa que el crecimiento "per se" no tiene un efecto detectable en la neutralización. Por lo tanto, domina la neutralización por solubilización de CO₂ del aire sobre la microbiológica.

Según se verá posteriormente, Alternaria alternata crece en condiciones óptimas a un pH de 7.7 y a pesar de que este microorganismo por sí no neutraliza el medio, se desarrolla preferentemente a un pH cercano a la neutralidad. Por otro lado, se observa también que la rapidez de agitación no influye en la rapidez de solubilización de CO₂ en el medio.

iii) Efecto de pH inicial en el crecimiento de A. alternata.

Los resultados se presentan en la GRAFICA No. 2, en los cuales se observa la disminución de azúcares totales y producción de protefna durante el crecimiento del hongo en nejayote con diferentes pH's iniciales hasta la hora 30, ob-

tenidos para cada condición inicial.

De acuerdo con los resultados, el crecimiento del hongo depende del pH inicial del medio, ya que su capacidad de neutralización es limitada. Asimismo, se observa que la cantidad de proteína se mantiene constante en el intervalo de pH de 8 a 10, por lo que las diferencias en rendimiento son debidas a una variación en la eficiencia de consumo de carbohidratos.

Cabe mencionar que el pH final de todos los medios (35 horas), incluyendo el que tenía $pH_i=7$, fue de 7.7, por lo que se pensó que éste podría corresponder al pH óptimo del hongo. Debido a esto se realizó un estudio fermentando nejayote con pH_i de 7, 7.7 y 11 durante un tiempo de 60 horas. Los resultados se presentan en las GRAFICAS No. 3 y 4, donde se observa una curva de crecimiento con tendencia a una diauxia y una fase lag intermedia de aproximadamente 25 horas. Este fenómeno justifica la presencia de dos tipos de carbohidratos asimilables en el medio. Conjuntamente, se observa el mayor rendimiento a un pH_i de 7.7. Las curvas asociadas se presentan en la GRAFICA No. 5, en donde se observa un aumento considerable en proteína y por lo tanto en rendimiento, al compararse con las fermentaciones con pH_i de 7 y 11. Los carbohidratos sufren una reducción desde 600 hasta 200 mg/100 ml, por lo que el potencial contaminante del efluente es reducido en una tercera parte en relación al nejayote original. Adicionalmente, el líquido sobrenadante --

es translúcido y sin presencia de sólidos suspendidos. El nejayote por el contrario, es sumamente turbio y con gran cantidad de material en suspensión.

La biomasa miceliar obtenida presentó un alto grado de sedimentación y una agregación adecuada para fines de filtración.

4.4.2. Suplementación del medio

i) Efecto de suplementación con diversas fuentes de Nitrógeno en la producción de protefna por A. alternata.

A pesar de los resultados promisorios obtenidos-- de producción de protefna, los máximos niveles ocurrían a -- tiempos de fermentación excesivamente largos para merecer -- un interés industrial. Se procedió entonces a probar el efec-- to de la suplementación del medio con diversas fuentes de -- nitrógeno.

Los resultados se presentan en las GRAFICAS 6 y 7, obteniéndose el mejor rendimiento al suplementar con extracto de levadura aumentando la cantidad de protefna producida - en relación directa a la cantidad agregada. El rendimiento por lo contrario presentó una disminución debido a que al -- aumentar el porcentaje de extracto de levadura, se aumenta - también el porcentaje de carbohidratos. El único caso en -- que se mejoró el rendimiento ocurrió al agregar 1.43% de --

extracto de levadura, tal vez debido a que la relación C/N obtenida (5/1 aproximadamente) correspondió a la mejor para el desarrollo de A.alternata o bien a que el extracto de levadura tiene algún compuesto que promueve el desarrollo del hongo.

Se observa que la participación del nejayote es esencial en el crecimiento del microorganismo. En la GRAFICA No. 8 se presentan los resultados de una fermentación --- efectuada usando como medio extracto de levadura en agua y - el porcentaje de protefna obtenida es mucho menor que cuando se suplementa nejayote con extracto de levadura.

El porcentaje de protefna obtenido al agregar pep- tona, resultó muy similar al del nejayote sin suplementar, -- obteniéndose un rendimiento menor debido a que al agregar -- peptona, aumenta la cantidad de carbohidratos iniciales.

En el caso de suplementar con nitrógeno inorgánico, se obtuvo un porcentaje de protefna menor que el del nejayote solo. De este resultado podemos concluir que el sulfato de - amonio y el nitrato de potasio resultaron tóxicos para A.al- ternata.

De acuerdo con la bibliografía la mayoría de los - hongos pueden utilizar amonio como única fuente de nitrógeno así como nitritos y nitratos. La asimilación de estos últi- mos, se lleva a cabo mediante su reducción a amonio. La ca- pacidad de los hongos para utilizar el nitrito o nitrato de-

pende de su resistencia a la toxicidad que estos iones pueden presentar.

Por otro lado, las protefnas deben ser hidrolizadas hasta aminoácidos por proteasas extracelulares antes de ser usadas como fuente de nitrógeno. En el caso de Aspergillus nidulans, se aisló una proteasa extracelular que es inhibida con el ión amonio. En el caso de este hongo, las protefnas son unicamente usadas como fuente de nitrógeno cuando no existen iones amonio en el medio (27).

Puede ser que A. alternata no tenga la capacidad de utilizar nitrógeno inorgánico como fuente de nitrógeno y que además el amonio impida el uso del nitrógeno proteico presente, por lo que el crecimiento del hongo resultó menor en comparación al presentado por nejayote sin suplementar.

La asimilación de nitrato se efectúa mediante la reducción de éste a amonio y por lo tanto, se produce el mismo efecto en el crecimiento aunque menor que en el caso de utilizar sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

11) Efecto de suplementación con vitaminas en la producción de protefna por A. Alternata.

El resultado de este estudio se presenta en la GRÁFICA No. 9, observándose que el rendimiento es casi igual que

en el caso de nejayote sin suplementar, siendo un poco mayor el efecto cuando el pH_i del najayote es de 11.

Al observar que la suplementación con peptona y vitaminas por separado no causaban un efecto considerable en la producción de protefna, efecto presentado por el extracto de levadura, se consideró la posibilidad de que juntas ejercieran un efecto benéfico. Para ello se efectuó el estudio correspondiente variando la proporción de peptona para una cantidad constante de vitaminas. Estas pruebas se efectuaron a un tiempo de fermentación de 35 horas y los resultados se -- muestran en la GRAFICA No. 10.

Para cubrir el tiempo total de fermentación, se efectuó una prueba a 60 horas, cuyos resultados se presentan en la GRAFICA No. 11, observándose que la suplementación con Nitrógeno y vitaminas, surte efecto hasta después de 30 horas, obteniéndose un aumento considerable en la producción - de protefna a las 48 horas y mejorándose el rendimiento.

Como se puede observar, estos resultados se aplican a medios no neutralizados previamente, los valores de pH reportados en la GRAFICA No. 11 corresponden a los obtenidos -- por la suplementación.

iii) Efecto de suplementación de najayote con glucosa.

Debido a la presencia de una fase "lag" o en contra posición a un alto en todas las fermentaciones anteriores, se consideró la posibilidad que los carbohidratos se encontraran en una forma de difícil asimilación para el hongo. Para ello se efectuó este estudio. El resultado se presenta en la GRAFICA No. 12. Se observa una disminución en el tiempo de la fase "lag", mejorándose el rendimiento y el porcentaje de proteína a las 30 horas. Sin embargo, a las 60 horas, el porcentaje de proteína es prácticamente el mismo al de najayote sin suplementar con glucosa y el rendimiento menor.

Se deduce por lo tanto que el najayote cuenta con - carbohidratos de fácil asimilación, similares a la glucosa.

4.4.3. Efecto del tipo de Inóculo en la producción de proteína por A. alternata en najayote.

Para efectuar este estudio se contó con dos tipos de inóculo:

- 1.- 2% de suspensión de esporas.
- 2.- 5% de medio previamente fermentado durante 35 horas.

Ambos fueron comparados bajo las mismas condiciones de operación.

En las GRAFICAS No. 13 y 14 se presentan los resultados, obteniéndose un porcentaje de proteína mayor en el caso de usar como inóculo un medio prefermentado durante 35 horas.

El efecto del tipo de inóculo para el caso de nejayote suplementado con 1% de extracto de levadura se observa a la hora 30, en donde se tiene un aumento en el porcentaje de proteína del triple y en el rendimiento del doble. Sin embargo, a la hora 55 el tipo de inóculo ya no presenta diferencias importantes en la producción de proteína y rendimiento.

El efecto global estudiado se observa en la TABLA II, donde se presentan los resultados de peso seco, porcentaje de proteína obtenido por el método de Microkjeldahl y rendimiento en mg de proteína (determinado por Lowry) por gramo de carbohidrato (determinado por antrona).

TABLA II
EFFECTO DEL TIPO DE INOCULO

Fermentación	Peso Seco Total (a)	% Proteína (microkjeldahl)	Rendimiento mg prot./g carbohidrato (Lowry)
1	0.5g	8.3%	53.5
2	1.0g	24.85%	110.6

1.- Se fermentó nejayote (100 ml), $\text{pH}_i=7.0$, el inóculo fue de 2 ml de suspensión de esporas y el tiempo de fermentación de 60 horas.

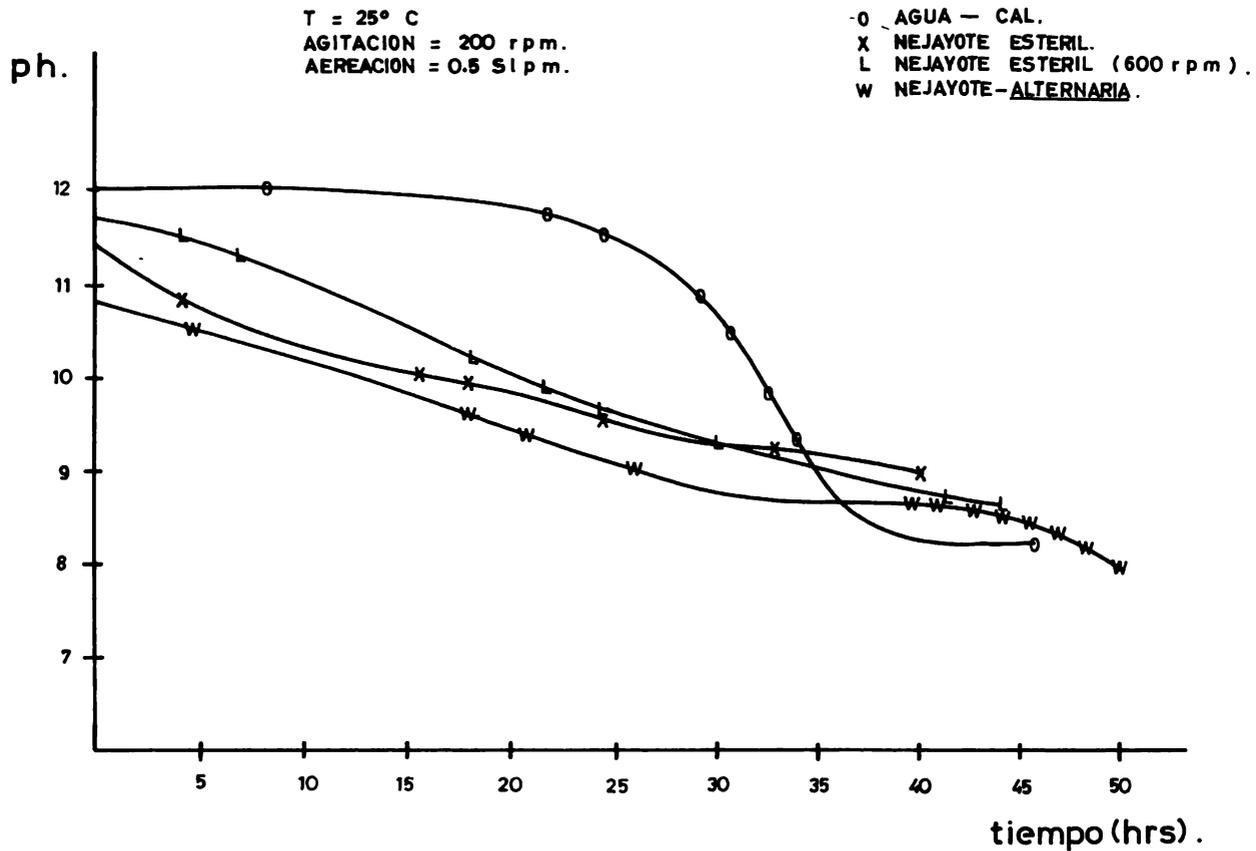
2.- Se fermentó nejayote (100 ml) suplementado con 1% de extracto de levadura, $\text{pH}_i=8.4$, el inóculo fue de 5 ml de medio-prefermentado durante 35 horas y el tiempo de fermentación -- fue de 48 horas.

(a) El peso seco total corresponde a una mezcla de biomasa y sólidos arrastrados al sedimentar el hongo o por una acción adsorbente por parte del hongo. No se determinó la cantidad de cada uno de los componentes de esta mezcla. Este punto es muy importante en cuanto a la clarificación del nejayote, lo cual se comprueba al quedar un líquido translúcido después de la fermentación.

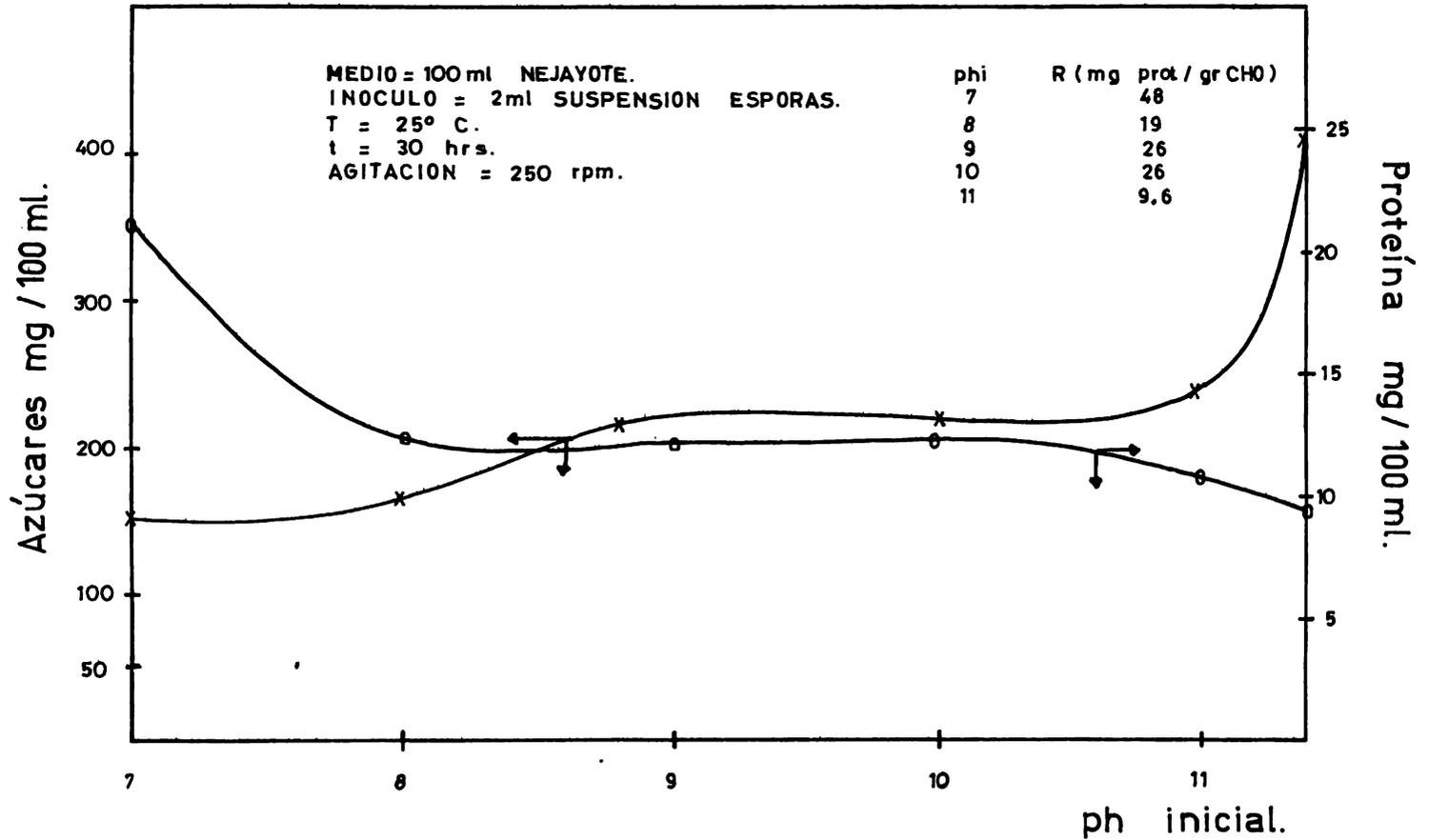
En la GRAFICA No. 15, se presentan los resultados de estas fermentaciones, observándose la producción de protefina y la degradación de carbohidratos.

De estos resultados podemos concluir que es más eficiente suplementar el medio con 1% de extracto de levadura e inocular con medio prefermentado que neutralizar el nejayote.

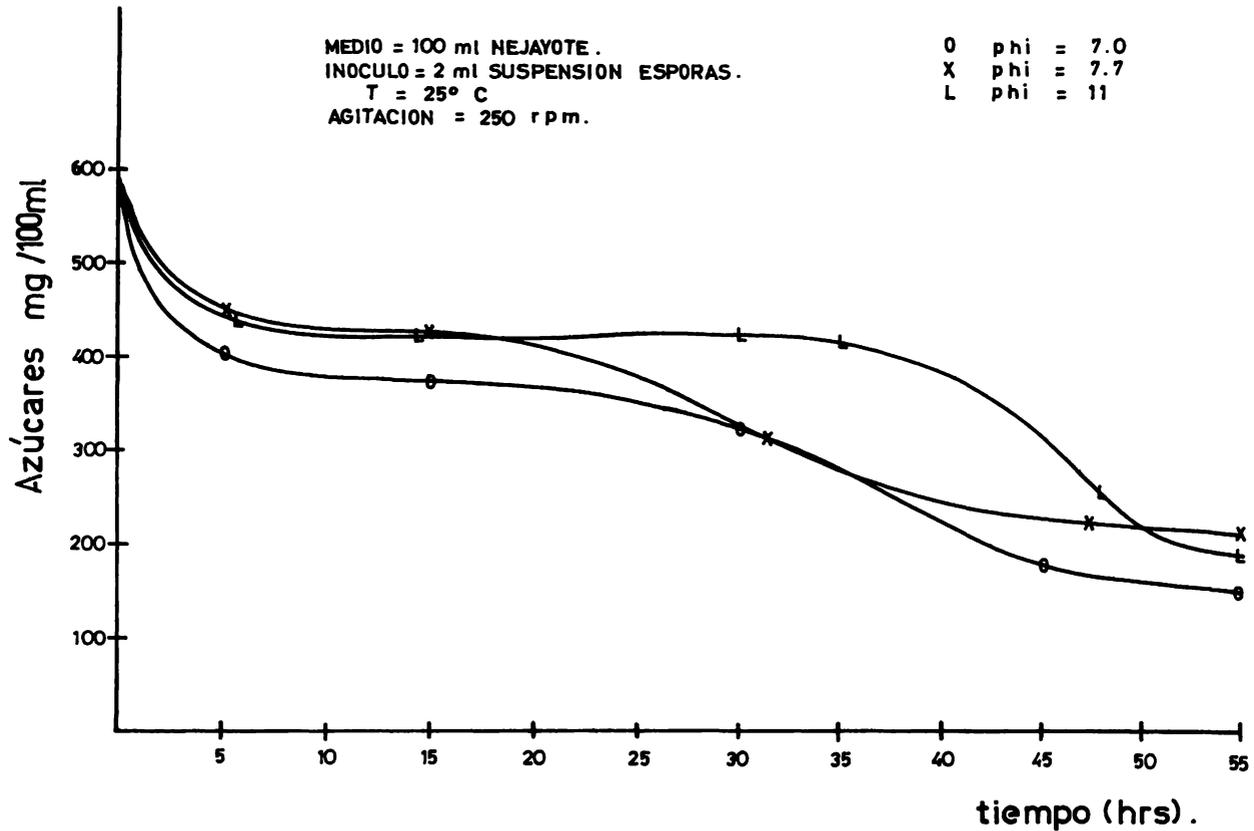
Graf no 1 Efecto de solubilización de CO₂ en disminución de ph.



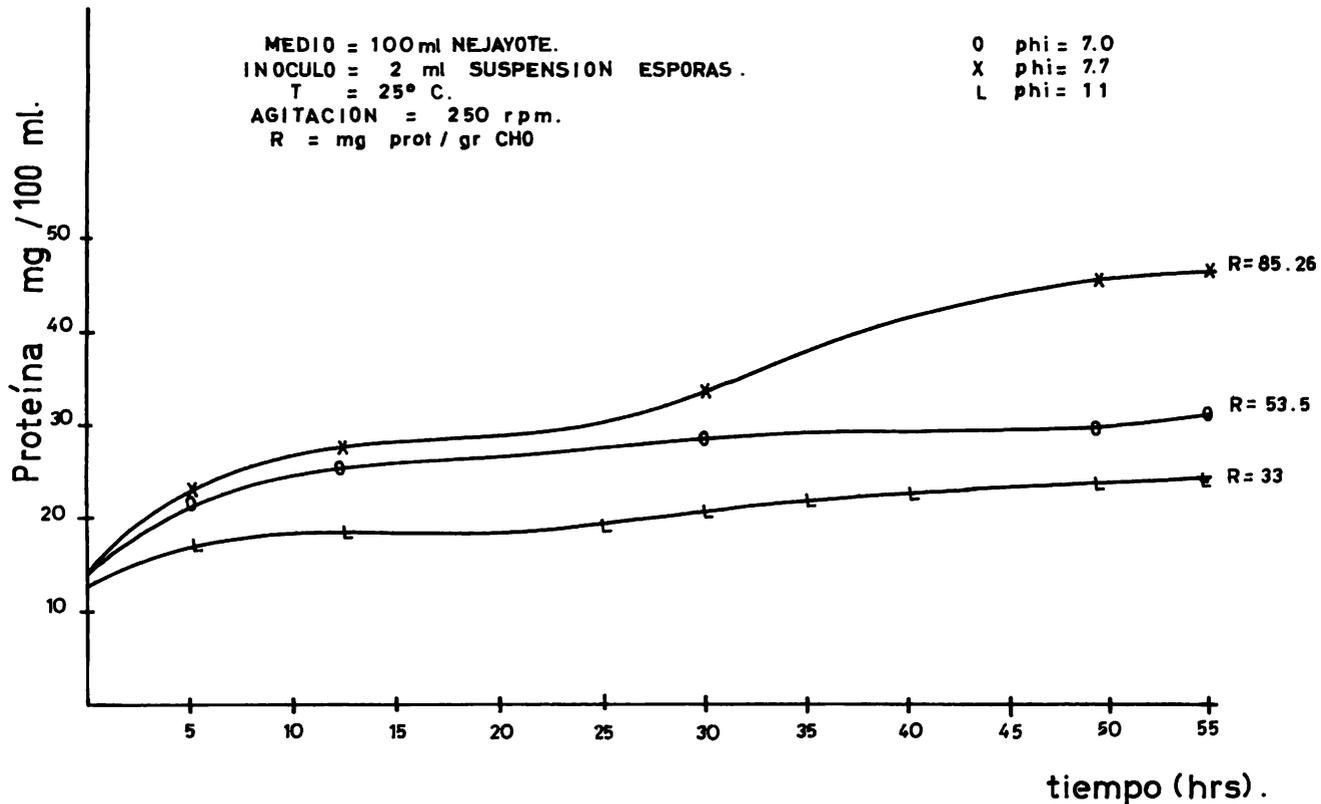
Graf no 2 Efecto del ph inicial en el crecimiento de A. alternata.



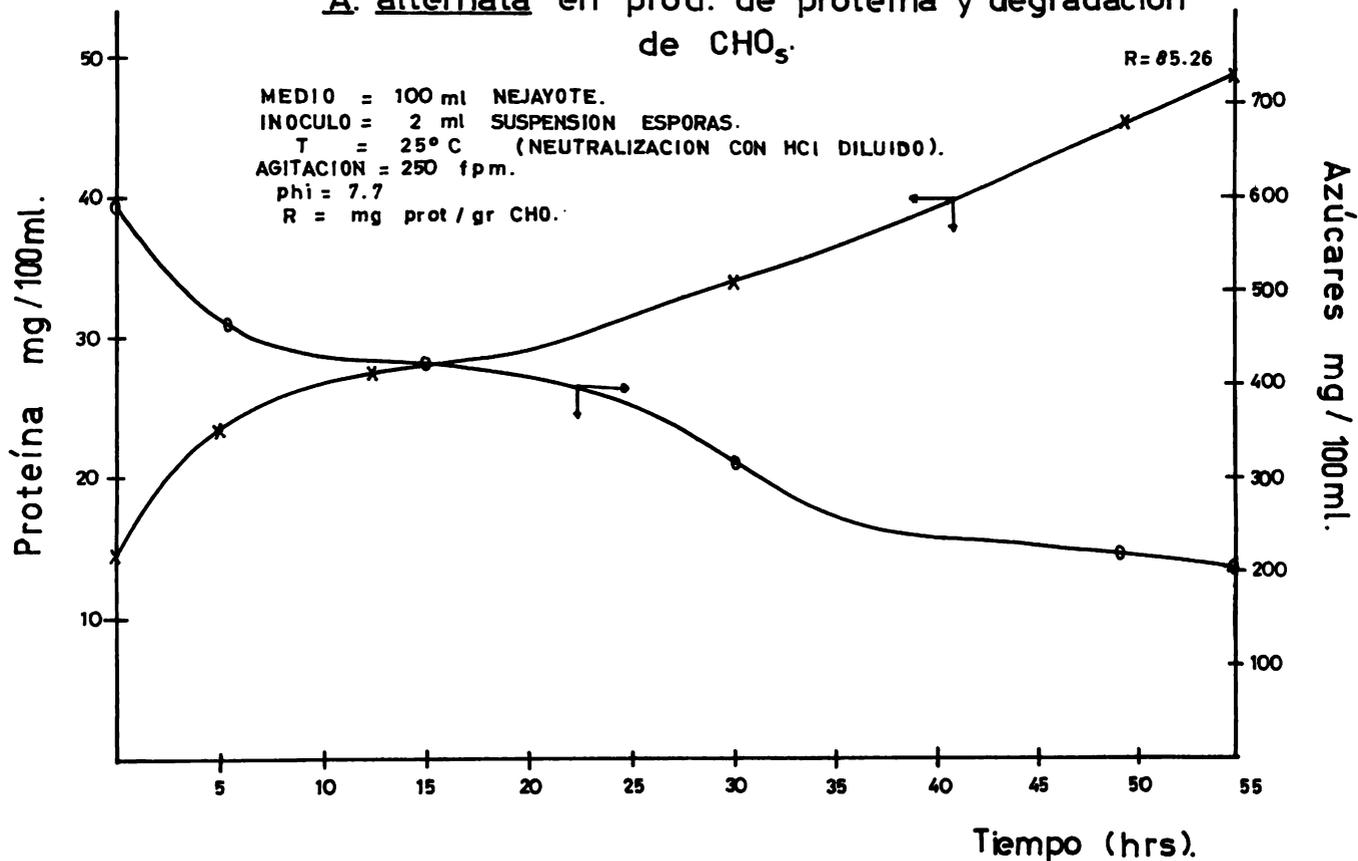
Graf no 3 Efecto de ph inicial en la degradación de carbohidratos del Nejayote por Alternaria alternata.



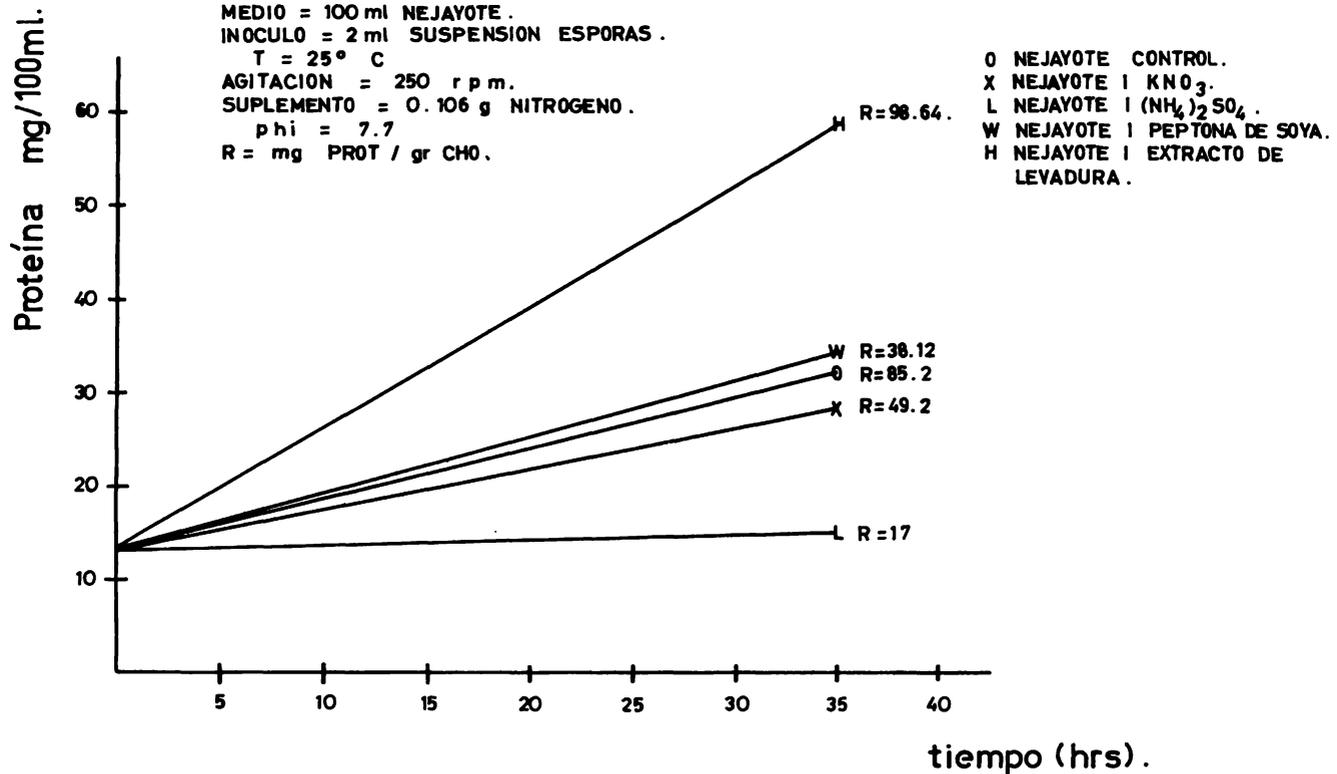
Graf no 4 Efecto de ph inicial en la producción de proteína por Alternaria alternata en Nejayote.



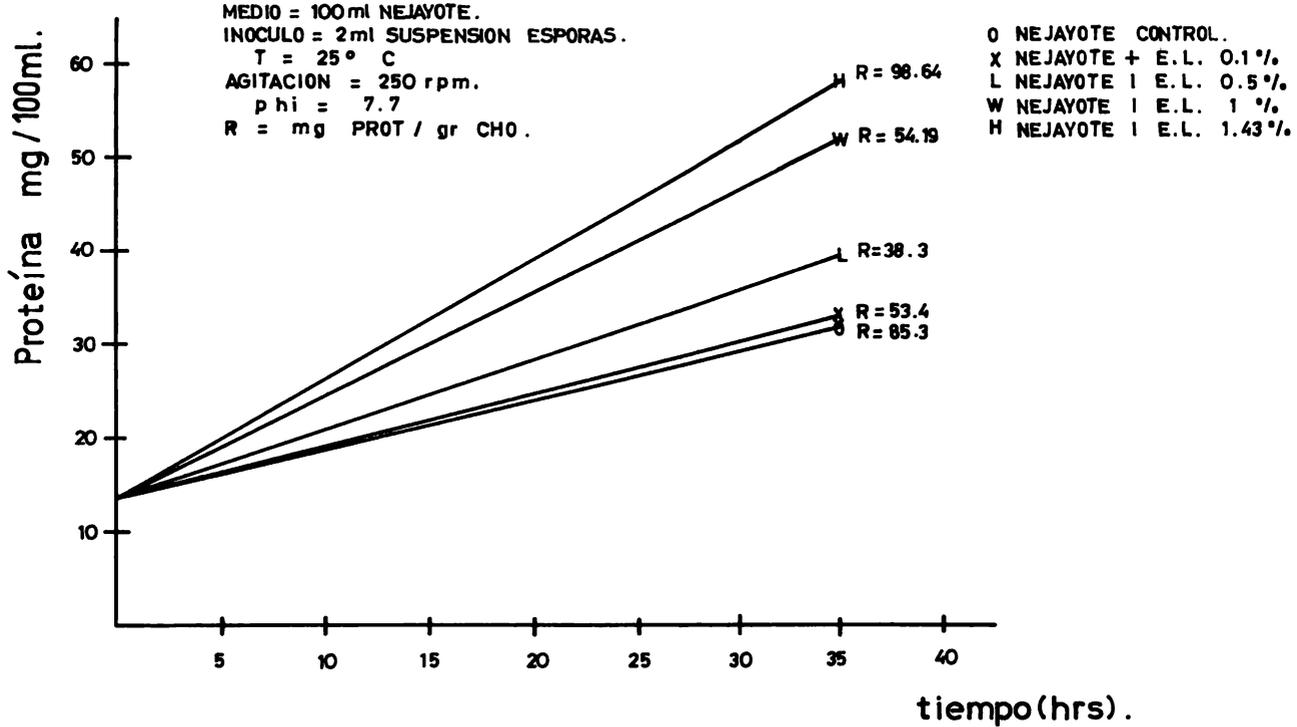
Gráf no. 5 Efecto de neutralizar Nejayote al ph óptimo de A. alternata en prod. de proteína y degradación de CHO_5 .



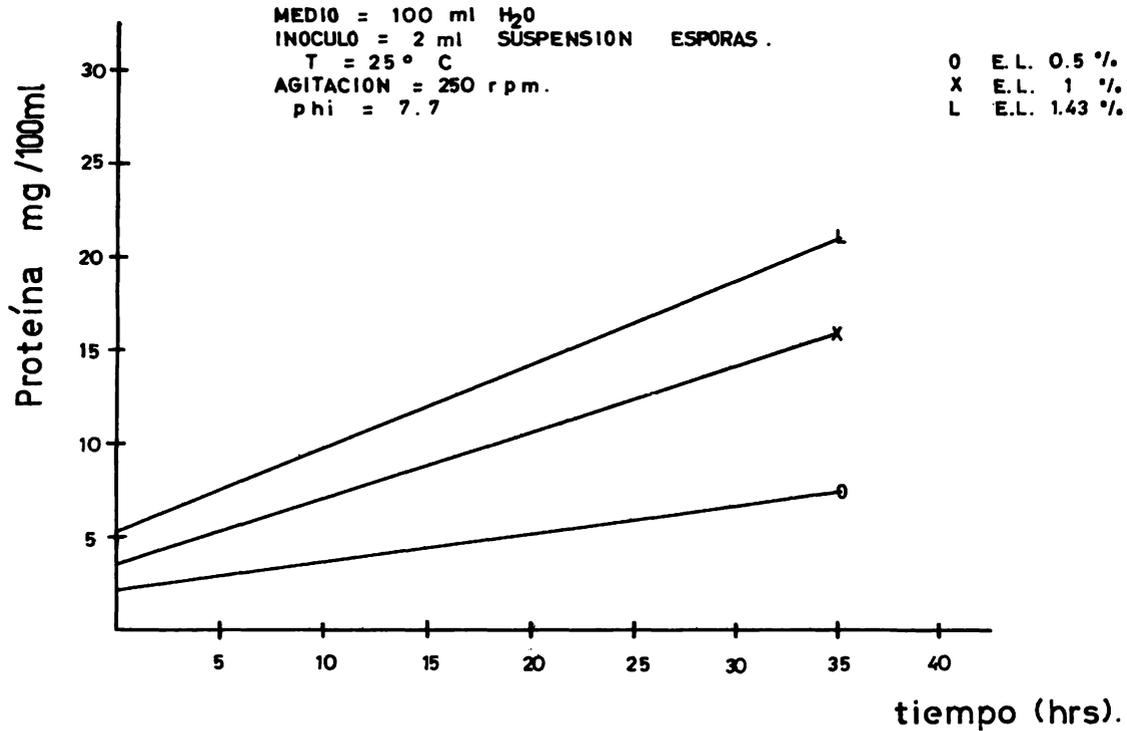
Graf no 6 Efecto de suplementación del Nejayote con nitrógeno en la producción de proteína por Alternaria alternata.



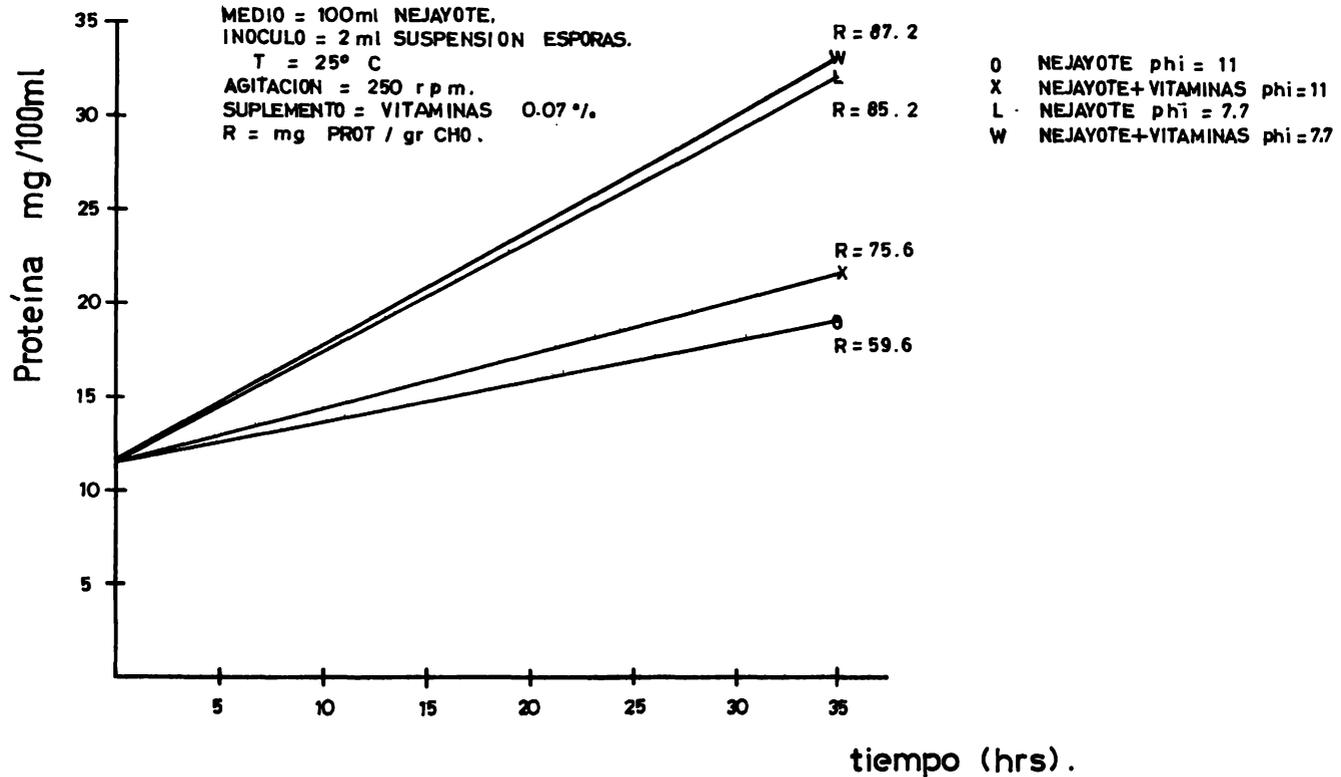
Graf no 7 Efecto de suplementación del Nejayote con extracto de levadura en la producción de proteína por Alternaria alternata.



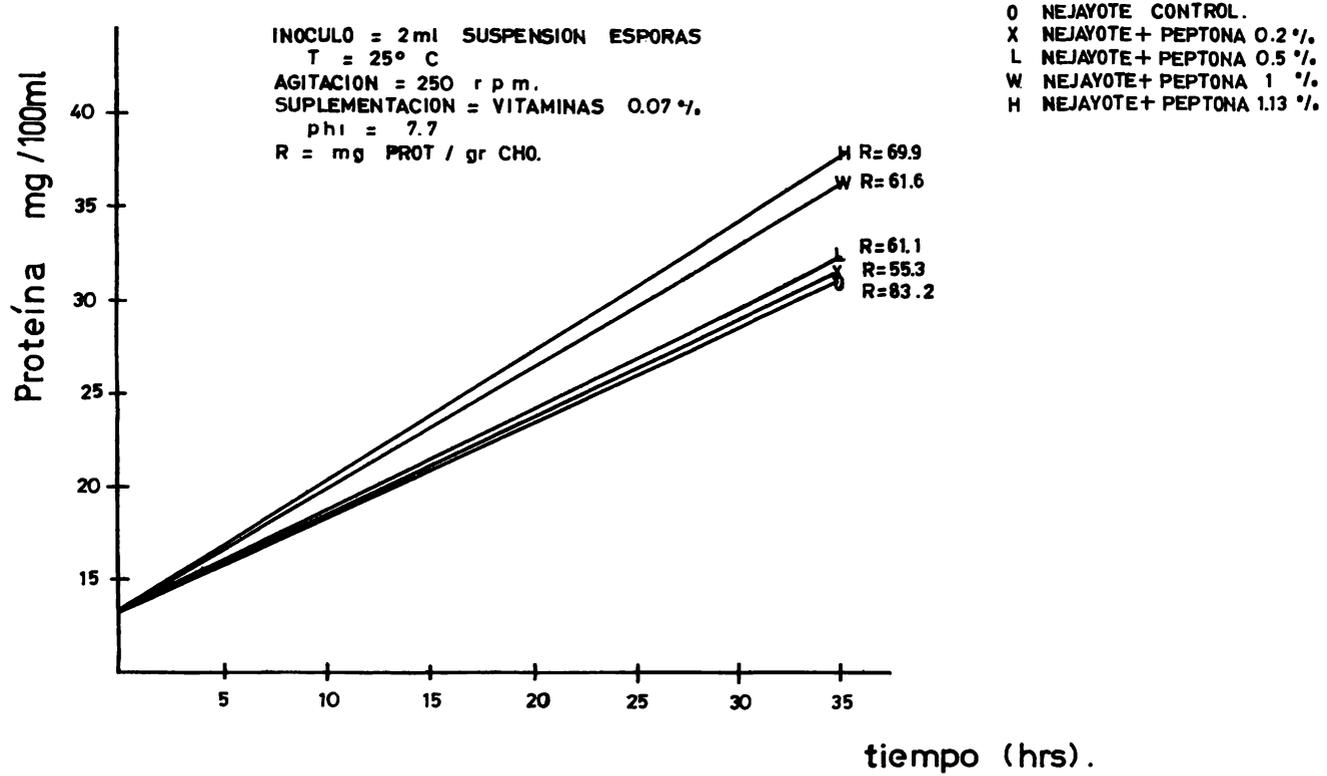
Graf no 8 Producción de proteína en agua-extracto de levadura por A. alternata.



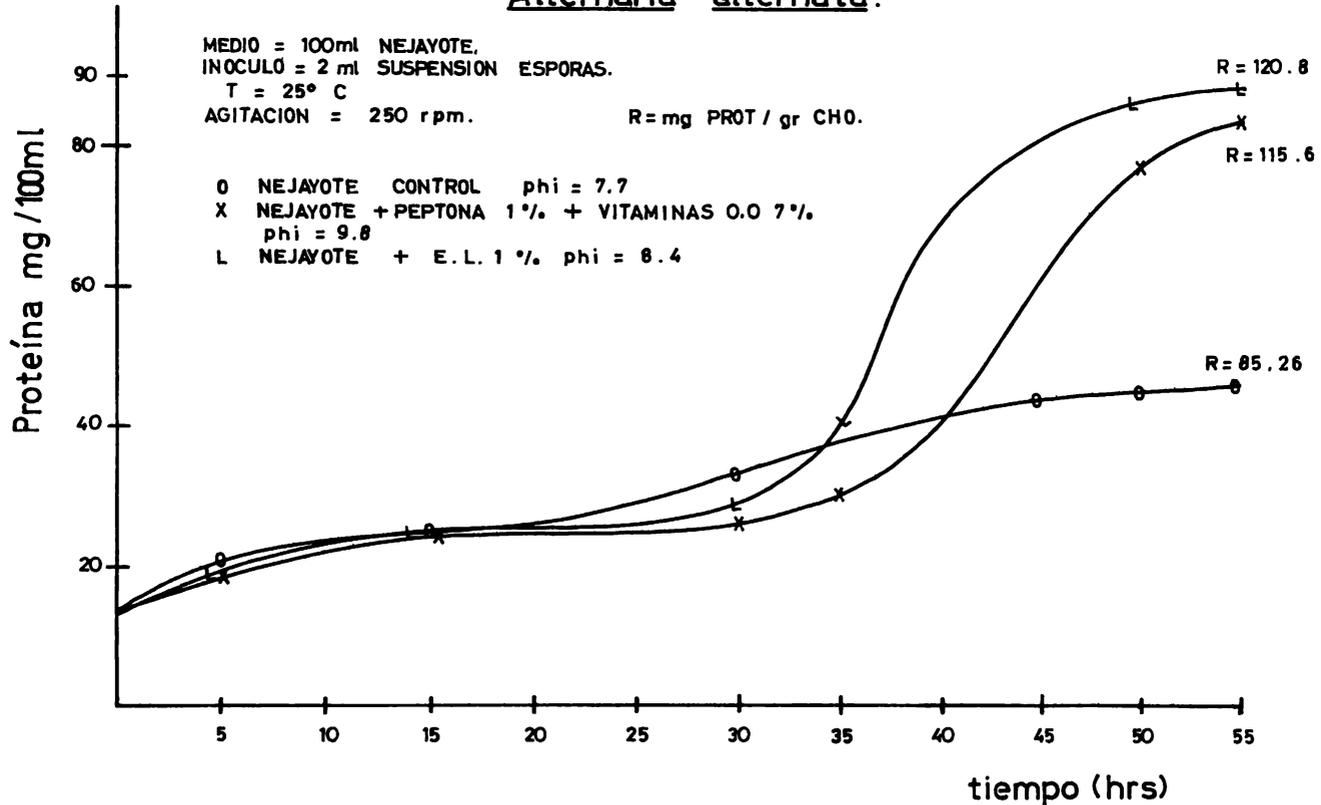
Graf no 9 Efecto de suplementación del Nejayote con vitaminas en la producción de proteína por Alternaria alternata.



Graf no 10 Efecto de suplementación del Nejayote con peptona y vitaminas en la producción de proteína por Alternaria alternata.

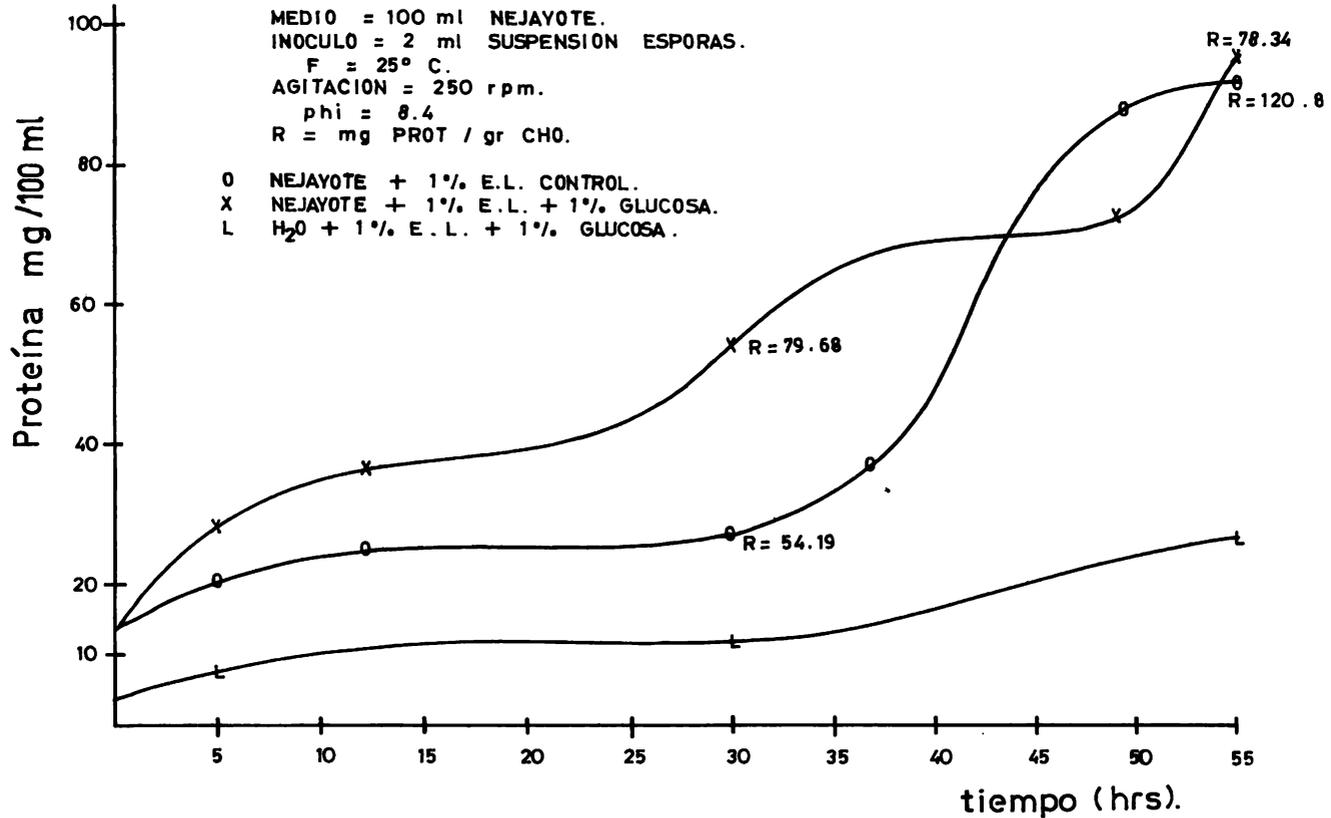


Graf no 11 Efecto de suplementación del Nejayote con nitrógeno y vitaminas en la producción de proteína por Alternaria alternata.

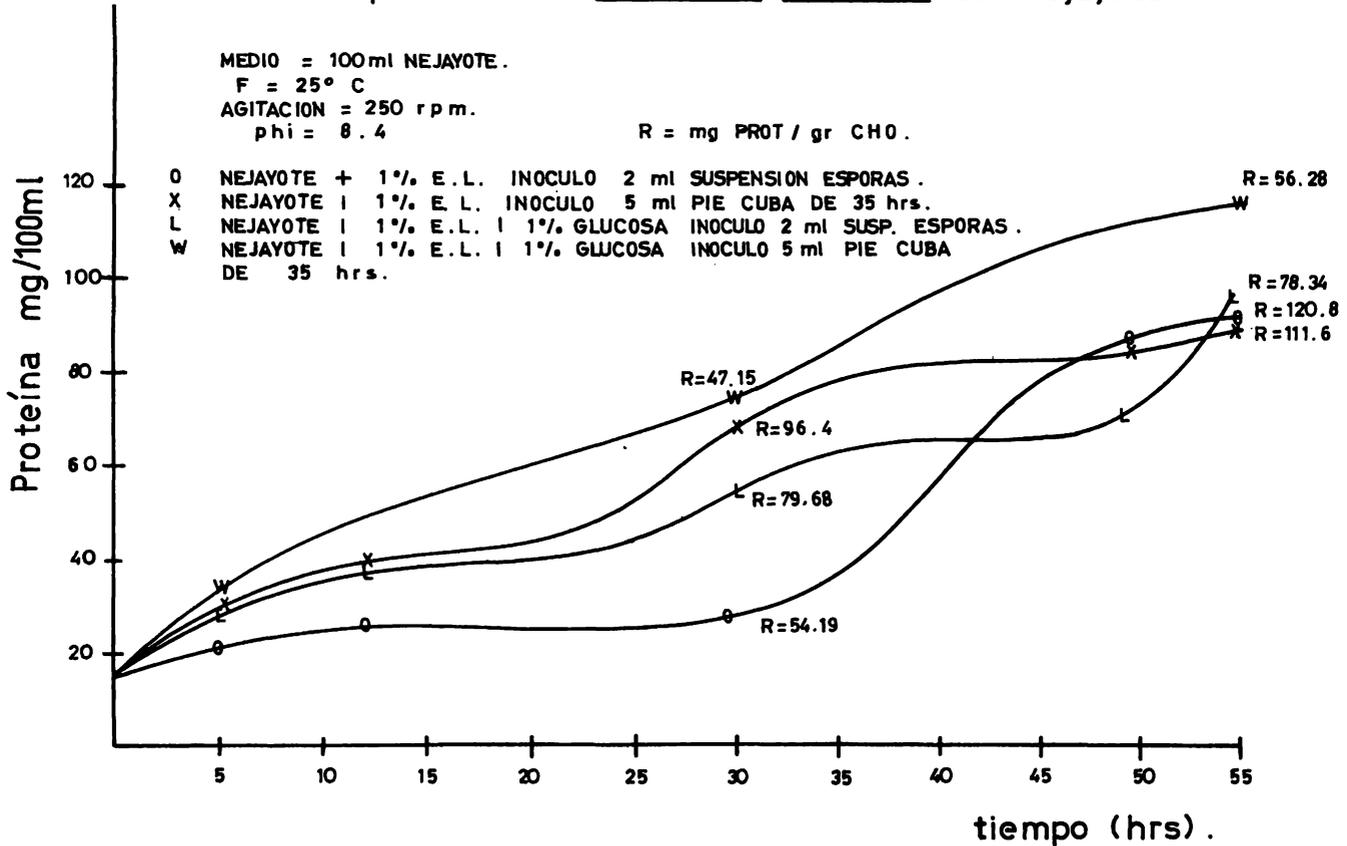


Graf no 12

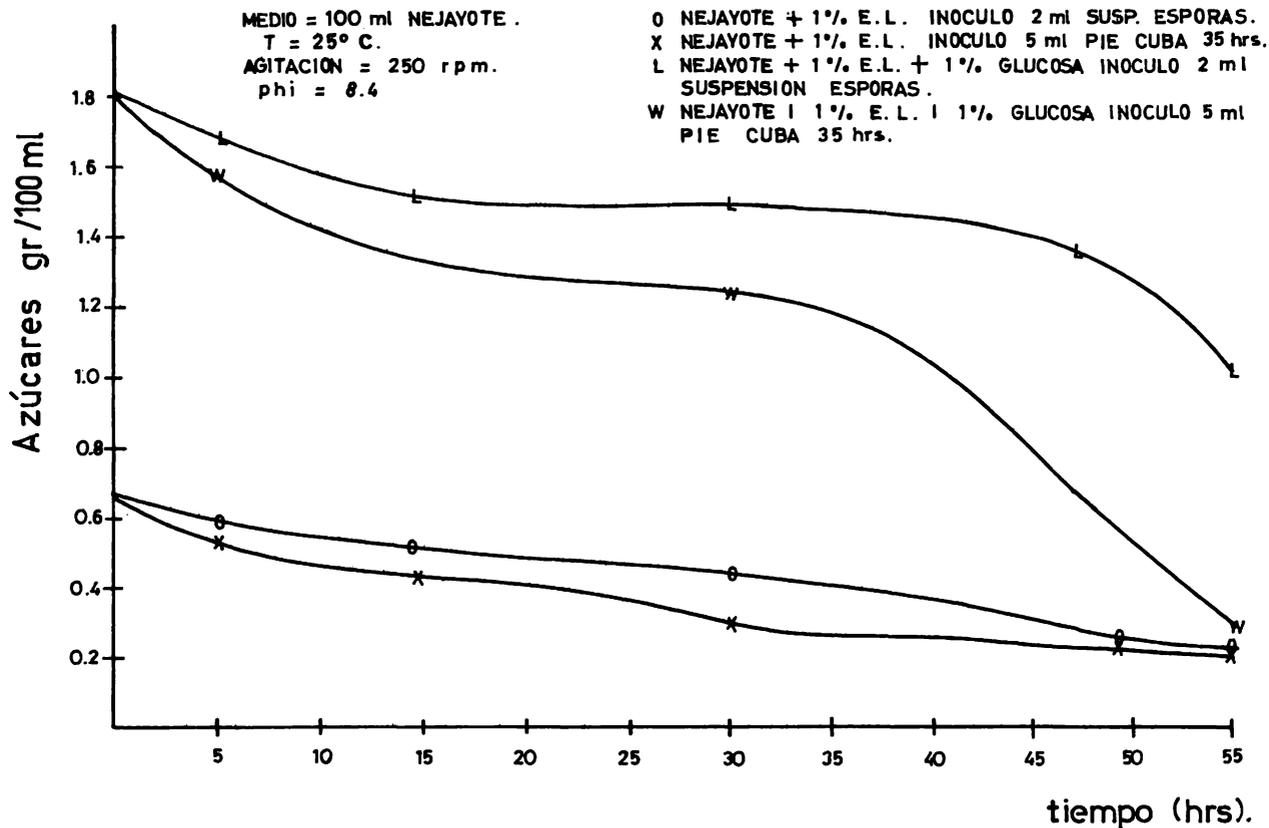
Efecto de suplementación de nejayote con glucosa en la producción de proteína por A. alternata.



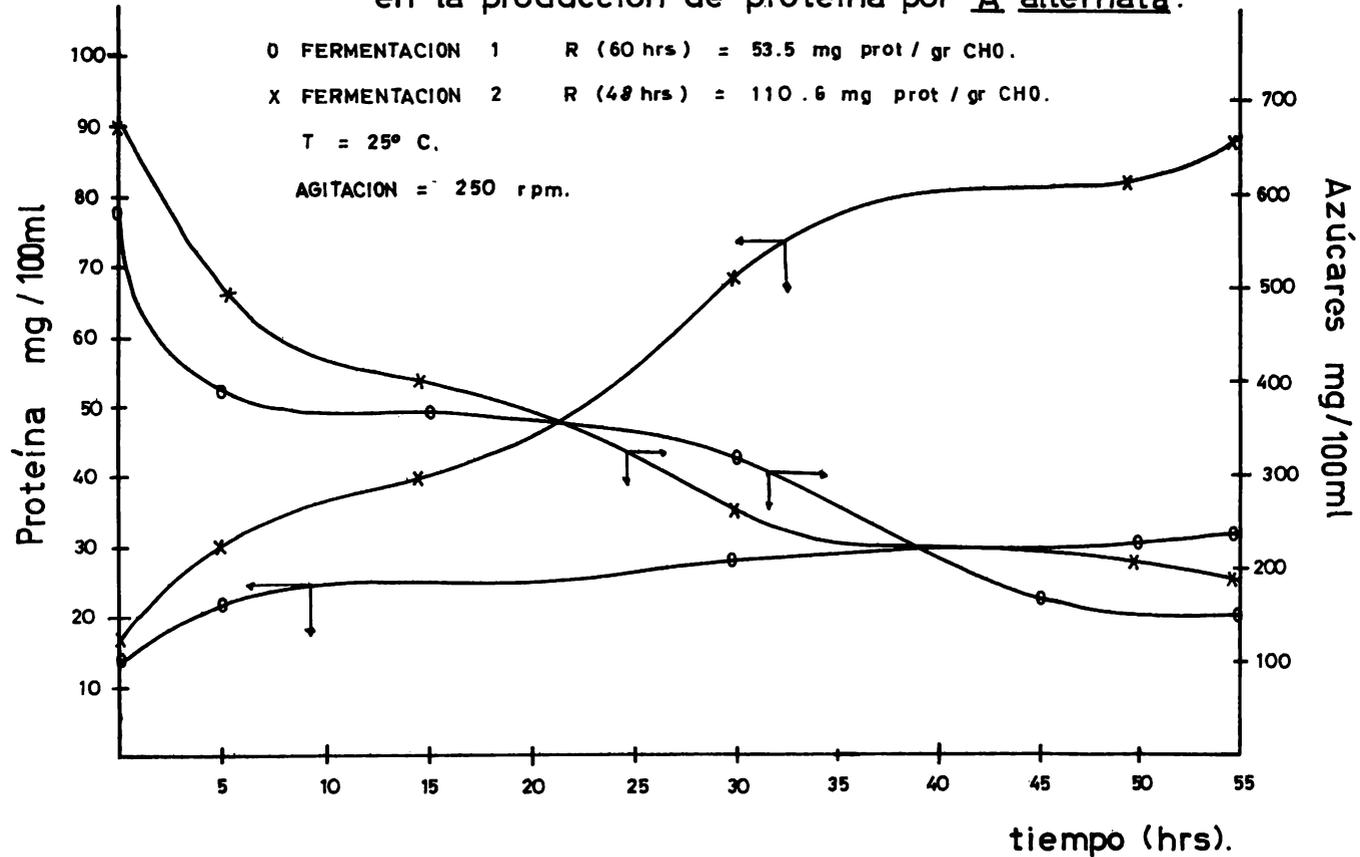
Graf no 13 Efecto del tipo de inóculo en la producción de proteína de Alternaria alternata en Nejayote.



Graf no 14 Efecto del tipo de inóculo en la degradación de carbohidratos de Nejayote por Alternaria alternata.



Graf no 15 Efecto global del estudio-variables ambientales en la producción de proteína por A alternata.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que este estudio logró cumplir parte del objetivo trazado, encontrando una forma de llevar a cabo la degradación de los sólidos presentes en el nejayote y disminuyendo, por consiguiente, la demanda biológica de oxígeno del efluente, logrando al mismo tiempo la neutralización del mismo. Por otro lado, no se tuvo un éxito completo en cuanto a la producción de proteína unicelular. Sin embargo, se logró obtener información acerca de las características del nejayote como medio nutriente, dejando un campo abierto para investigaciones posteriores.

En general, podemos concluir que el nejayote de maíz contiene nutrientes suficientes para soportar el crecimiento de microorganismos, algunos de los cuales podrían ser fuente de proteína unicelular. Esto no significa que el balance de nutrientes sea adecuado y comparable con el presentado por sustratos industriales de reconocida calidad como melazas de caña, líquido sulfitado de papelería u otros similares.

Lo antes mencionado se basa en el hecho de que, dentro de las especies microbiológicas aisladas en nejayote y presentes en el suelo y aire, varios hongos miceliares crece

ron relativamente bien. Las mejores características de crecimiento y por lo tanto de producción de proteína, correspondieron a Alternaria alternata. Por problemas operativos, no se realizaron pruebas biológicas que permitieran evaluar su potencial toxigénico al utilizarse como alimento.

Por otro lado, sus características morfológicas -- permitieron una separación facilitada del micelio formado -- por simple filtración.

En cuanto a las condiciones de alcalinidad del nejayote, se concluye que la neutralización de este medio durante la fermentación, ocurre fundamentalmente por solubilización de CO₂ del aire. La rapidez con que se lleva a cabo este proceso no es dependiente de la velocidad de agitación, por lo menos en el intervalo de 200 a 600 rpm. Los hongos estudiados parecen no ejercer una neutralización efectiva por emisión de metabolitos extracelulares, manteniéndose en un estado de latencia hasta que el sistema alcanza un pH favorable para su crecimiento. En el caso de Alternaria alternata, este límite parece ubicarse en la región de pH de 9.5 a 10, presentándose el máximo crecimiento a un pH de 7.7.

Con respecto a la fuente de carbono, podemos concluir que los carbohidratos presentes en el nejayote pueden clasificarse en dos categorías, i.e. de fácil y difícil asimilación. Lo anterior se basa en lo siguiente: las esporas de

Alternaria presentan un tiempo de germinación muy corto; el cultivo sin embargo, tiende a estabilizarse en el contenido de proteína entre las horas 10 y 25, dependiendo del pH y de la suplementación de nutrientes. El empleo de un inóculo en fase logarítmica de crecimiento, reduce apreciablemente este intervalo. Sin embargo, la tendencia a una diauxia no desaparece totalmente. El agregar glucosa al medio, complica aún más el patrón de respuesta, llegándose a definir una triaúxia.

En lo referente a los requerimientos nutricionales de Alternaria alternata, concluimos que las fuentes inorgánicas de nitrógeno son adversas para su crecimiento, principalmente en la forma de sulfato de amonio. La suplementación con fuentes orgánicas como extracto de levadura y una mezcla de peptona y vitaminas mejoró apreciablemente los rendimientos de proteína. Sin embargo, su presencia no logra reducir la fase estacionaria entre las horas 10 y 30, produciendo hasta entonces un verdadero crecimiento logarítmico. Esto último es válido para medios inoculados con suspensión de esporas.

En consecuencia, el cambio en la relación C/N por adición de nitrógeno orgánico, mejora el rendimiento hasta niveles de 120 mg de proteína/gr de carbohidrato. El tiempo neto de fermentación sin embargo, no es reducido a un número de horas que puedan considerarse con posibilidades de contar con un proceso de aplicación industrial. El empleo de un inóculo

con micelio vegetativo reduce unicamente en 10 horas el tiempo total de fermentación.

En términos generales, se puede considerar a la relación C/N, tipo de fuente de nitrógeno y pH como los factores reguladores de la rapidez de crecimiento de Alternaria alternata en nejayote. Bajo la combinación óptima de estas variables, i.e. pH=7.7 y 1% de extracto de levadura, la producción de proteína verdadera alcanza por lo menos niveles de 85-90 mg/100 ml a las 50-55 hrs. de fermentación. El rendimiento correspondiente se encuentra en la vecindad de 110 mg de proteína verdadera/gr de carbohidrato.

Los valores antes señalados no se pueden considerar como muy alejados de los comúnmente obtenidos en producción de PUC. Al utilizar metanol o glucosa como sustrato, los rendimientos promedio se encuentran en la vecindad de 500 mg de células/gr de sustrato. Considerando un contenido aproximado de 50% de proteína, se tendrá un rendimiento de 250 mg de proteína/gr de sustrato, valor 2.2 veces mayor que el obtenido en este estudio.

Por otro lado y desde el punto de vista económico, la neutralización con reactivos y la suplementación de nutrientes con fuentes naturales, resultan altamente desventajosas. La neutralización por solubilización de CO₂ del aire puede caer bajo la misma caracterización debido a la lentitud con que ocurre y por ende, a los costos energéticos asociados.

Con base en las conclusiones anteriormente discutidas, a continuación se plantean las recomendaciones inmediatas a este estudio.

1.- Estudio de los azúcares presentes en el nejayote, con lo cual se contaría con mayor información sobre su disponibilidad y facilidad de asimilación.

La selección microbiológica estaría dictada en gran parte por esta distribución.

2.- Estudio de la capacidad amortiguadora del sistema nejayote-CO₂ del aire a diferentes pH's, con el fin de saber que papel juega la posible formación de bicarbonatos u otros compuestos buffers en la neutralización del nejayote y su relación con el desarrollo de los hongos.

3.- Aislamiento de microorganismos nativos de otras fuentes con pH superior a 7.

4.- Estudio del crecimiento de otros hongos en nejayote. Se conocen ya otros 6 géneros capaces de soportar las condiciones proporcionadas por este medio. Es posible encontrar dentro de éstos, un hongo que además tolere las sales inorgánicas como fuente de nitrógeno.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Martfnez Herrera and Lanchance. "Corn (Zea mays) Kernel hardness as an index of the alkaline cooking time for tortilla preparation". J. of Food Science. 44(2) p.---377-380, 1979.
- 2.- Bressani, R., Paz R. and Scrimshaw N. "Chemical Changes in Corn during preparation of Tortillas". J. of Agric.-Food Chem. 6(10) p. 770-773, 1958.
- 3.- Katz S.H., Heidiger M.L. and Valleory L.A. "Traditional Maize Processing Techniques in the New World". Science Vol. 184 p. 765-773, 1974.
- 4.- Sternberg M., Kim C. and Plankett R. A. "Lysinoalanine Determination in Proteins". J. of Food Science 40 p.-1168-1170, 1975.
- 5.- La Industria del Mafz 1973-1976. CONAIM, México, 1976
- 6.- Bressani, Braham and Béhar. Mejoramiento Nutricional del Mafz. INCAP, Guatemala 1972. Del Valle R. Francisco.- Producción Industrial, distribución y mercadeo de la --harina para tortillas en México.
- 7.- Milner, Scrimshaw and Wang. Protein Resources and Technology. AVI Pub. Co. Westport Connecticut, 1978.
- 8.- Tannenbaum and Wang, Single Cell Protein II. The Mit Press. Massachusetts, 1975.
9. Blakenbrough N. Biochemical and Biological Engineering Science. E. Academic Press. London, 1967.

- 10.- Echnenfelder W. Water Pollution Control. Jenkins Book Pub. Co., 1970.
- 11.- Fair G., Geyer J. and Okin D. Water Purification and Wa
Tewater Treatment and Disposal. Wiley-Toppan, 1968.
- 12.- Morales de León Josefina, Fuentes Protefnicas no Con-
vencionales. La experiencia en México. Cuadernos de
Nutrición. Vo. 4(3) p. 253-261, 1979.
- 13.- Dfaz J., Uribe M. y de la Vega J. "Evaluación Nutritiva
de Leguminosas Silvestres". Tesis UNAM. Fac. Qufmica,
1976.
- 14.- Pérez-Gil F. "Avances recientes en el empleo de nuevas
fuentes protefnicas. Leguminosas no tradicionales". -
Cuadernos de Nutrición. Vol. 4(3) p. 263-171, 1979.
- 15.- Zardain C. Morales de León J. y Bourges H. "Evaluación
de diversos tratamientos del frijol soya para inhibir
la actividad de los factores antinutritivos e increment
tar su consumo directo a nivel rural". Rev. Tecnol. --
Aliment. (Méx) XII, 133, 1977.
- 16.- Berra, R. "Efecto del Remojo en algunas propiedades --
físicas, bioqufmicas y organolépticas de la soya". Rev.
Tecnol. Aliment. (Méx) IX, 2, 76, 1974.
- 17.- Pérez Villaseñor J., Del Valle F. y Saleme M. "Enrique-
cimiento de las tortillas con protefnas de soya por me-
dio de la nixtamalización de mezclas de maíz y frijol -
de soya". Rev. Tecnol. Aliment. (Méx) IX, 4, 29, 1974.

- 18.- Bourges R. "Utilización directa de la soya en alimentación humana." Cuadernos de Nutrición. 4p. 69, 1979.
- 19.- Báez M. "Elaboración de una harina de ajonjolí, evaluación biológica y su posible uso como alimento humano. - Tesis UNAM. Fac. Química, 1975.
- 20.- Hernández R. "Obtención de harina y concentrado proteínico a partir de semillas de girasol". Tesis UNAM. Fac de Química, 1978.
- 21.- Trejo A. "Incorporación de concentrados y aislados proteínicos de semillas de girasol y coco a refrescos y - bebidas con pulpa de frutas". Trabajo presentado en el certamen "Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de -- Alimentos" Méx, 1977.
- 22.- Torres M., Castellanos R, Casasas C. y Olgún E. "Elaboración de un concentrado proteínico de hojas de yuca" Rev. Tecnol. Aliment. (Méx) Vol. XV(2) p. 4-15, 1980
- 23.- Parada E. y Hope P. "La alfalfa alimento como fuente de proteínas para alimento humano". Rev. Tecnol. Aliment. (Méx) V, 1 y 2, 36 y 4, 1970.
- 24.- Parada E. y Alcantara-González E. "Estudio preliminar del lirio acuático como alimento humano". Rev. Tecnol. Aliment.(Méx.) X,2, 68, 1975.
- 25.- Parada E. y Lara García E. "Separación térmica de las fracciones proteicas de hojas". Rev. Tecnol. Aliment. IX, 6, 269, 1976.
- 26.- Parada E. "Elaboración rural e industrial de concentrados proteicos de hojas". Rev.Tecnol.Aliment. XI, 6,269 1976.

- 27.- Conconi J. y Bourges H. "Valor nutritivo de ciertos insectos comestibles de México y lista de algunos insectos comestibles del mundo. Am. Inst. Biol. Univ. Na. -- Auton. México 48 Ser. Zoología: 165, 1977.
- 28.- Bourges H. y Mendoza E. "Diseño de un producto lácteo para la alimentación infantil". Cuadernos de Nutrición 1: 99, 1976.
- 29.- Raccotta V. "Posibilidades de aprovechamiento del suero Lácteo". Rev. Tecnol. Aliment. (Méx), 1979.
- 30.- Lara F., Ramírez F. y Sánchez N. "Estudio para la obtención de protefnas de sangre de bovino". Rev. Tecnol. Aliment. (Méx) XII, 4 y 5, 141, 1977.
- 31.- Monroy R., Chávez A. y Hope P. "El valor nutritivo del sedimento del pulque" VII Reunión Anual Soc. Méx. de -- Nutr. y Endocr. Guadalajara, Jal., 1977.
- 32.- Bourges, H., Sotomayor A., Mendoza E. y Chávez A. "Utilization of the alga Spirulina as a protein source". - Nutrition Reports International 4: 1, 31-43, 1971.
- 33.- Casas Campillo C. "Protefnas alimenticias de origen -- unicelular". Rev. Technol. Aliment. (Méx) XI, 3: 124, 1976.
- 34.- Porter. Bacterial Chemistry and Phisiology. Ed Wiley and Son Inc. New York, 1974.
- 35.- Souza K., Deal P., Mack H. and Turnbill C. "Growth and Reproduction of Microorganisms under extremely alkaline conditions". Applied Microbiology. 28(6) p. 1066--1068, 1975.

- 36.- Sismuk W., Ismail M. and Collins J. "Bacterial Fermentation of High Alkaline wastes from Irish potatoes" J. of Food Science 44(2) p. 439-442, 1979.
- 37.- Kosaric N., Nguyen H. and Bergougnou M. "Growth of -- Spirulina maxima Algae in effluents from secondary -- waste-water treatment plants". Biotechnology and Bioengineering. Vol. XVI p. 881-896, 1974.
- 38.- Official Methods of Analysis of the Association of -- official analytical chemists. (AOAC). Eleventh Edition, 1970.
- 39.- Flaschka and Barnard. Quimica Analitica Cuantitativa Ed. Continental S.A. México, 1973.
- 40.- Ulloa M. y Hanlin R. Atlas de Micología Básica. Ed.- Concepto S.A. México, 1978.
- 41.- Gilman J. A Manual of Soil Fungi. Ed. Iowa State Univ. Press. Second Edition E.U.A., 1957.
- 42.- Elliot J. "Taxonomic Characters of Alternaria and Macrosporium" Am. J. Bot. 4 p. 439-476, 1917.
- 43.- Dubois M. and Gilles K. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". Anal. Chem. 28 p. 350, 1956.
- 44.- Fales F.W. "The Assimilation and Degradation of Carbohydrates by yeast cells". J. of Biolog. Chem. 193 p. -- 113-124, 1951.
- 45.- Freywood Roman. "Qualitative Test for Carbohydrate -- Material". Ind. and Eng. Chem. Anal. Ed. Vo. 18 p. 499, 1946.

- 46.- Hebert D., Phipps P.J. and Strange R.E. "Determinación de proteína con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Determinación del contenido total de proteína en microorganismos". *Methods in Microbiology* 58 p. 249, 1971.
- 47.- Peterson G.L. "A simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is more generally applicable". *Analytical Biochem.* 83 p. 346-356, 1977.
- 48.- Colowick and Kaplan. *Methods in Enzymology III*. Academic Press Inc. Pub. p. 450 New York, 1957.
- 49.- Litchfield H. John. "Comparative Technical and Economic Aspects of Single Cell Protein Processes". *Advances in Applied Microbiology Vol. 22* p. 267, 1977.
- 50.- "Studies on the Relationship between Specific Growth Rate and concentration of Nitrogen Source for Heterogeneous microbial populations of sewage origin". *Biotechnology and Bioengineering Vol XI* p. 67-68, 1969.
- 51.- Smith George. *Introducción a la Micología Industrial*. Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1963.
- 52.- Simmons E.G. "Typification of Alternaria, Stemphylium and Ulocladium". *Mycologia Vol. 59* p. 67, 1967.
- 53.- Ellis M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. England, 1971.